



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Ciencias
Biología Experimental

**Actividad insecticida y citotóxica contra líneas tumorales
humanas de extractos y compuestos de *Pachyrhizus ferrugineus* y
Pachyrhizus erosus (Fabaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Edgar Antonio Estrella Parra

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Reyes Chilpa (Instituto de Química, UNAM)

COMITÉ TUTOR: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes (Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Zenón Cano Santana (Facultad de Ciencias, UNAM)

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DEL 2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Ciencias
Biología Experimental

**Actividad insecticida y citotóxica contra líneas tumorales
humanas de extractos y compuestos de *Pachyrhizus ferrugineus* y
Pachyrhizus erosus (Fabaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. Edgar Antonio Estrella Parra

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Reyes Chilpa (Instituto de Química, UNAM)

COMITÉ TUTOR: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes (Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Zenón Cano Santana (Facultad de Ciencias, UNAM)

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE DEL 2015



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/470/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **8 de junio de 2015**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **ESTRELLA PARRA EDGAR ANTONIO** con número de cuenta **92061619** con la tesis titulada: "**Actividad insecticida y citotóxica contra líneas tumorales humanas de extractos y compuestos de *Pachyrhizus ferrugineus* y *Pachyrhizus erosus* (Fabaceae)**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO REYES CHILPA:**

Presidente:	DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal:	DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
Secretario:	DR. ZENÓN CANO SANTANA
Suplente:	DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
Suplente:	DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 17 de agosto de 2015.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/mnm



Agradecimientos

Agradecimientos Institucionales

Estoy agradecido con el Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (PCB-UNAM) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 220355) por proporcionar una beca para mis estudios de doctorado.

Agradezco al personal de RMN, espectrometría de masas y las secretarías del Instituto de Química por su valiosa colaboración. En especial a la Química María de los Ángeles Peña González, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, a las secretarías: Raquel Feregrino Curiel, Mónica Rosas Guerrero, Dulce María Lozano Martínez, Arturo García Martínez, C.P. María Guadalupe Morales Ramírez y al Ing. Pucheta y al demás personal de IQ.

Agradezco al M. en C. Alberto Reyes García, Técnico Académico Titular A del Herbario Nacional de México (MEXU), por las facilidades tanto en la colecta como en la identificación de las plantas.

Agradezco a la Química Georgina Artemisa Duarte Lisci (USAI-UNAM) por su asistencia técnica.

Agradecimientos personales

Agradezco a DIOS por darme la perseverancia y la tenacidad.

Ami madre, hermanos por aguantarme y doña Chabe soportar mis estadias fuera de casa.

A mis abuelos, tios, tias, primos y primas por las palabras de aliento.

Al Doc Reyes Chilpa por su asesoría y paciencia, ya que lo considero mi padre académico.

Al Doc Cerbon, Guillermo, Zenon por su asesoría a lo largo de mis estudios.

Al Doc Céspedes, Alarcón, Banboltin, Julio Becerra y a los Wayos por su valiosa amistad en Chile, así como a Doña Mary y amigos de natación de la U del Biobio por su apoyo y amistad,

A mis valedores JC Gómez, Ricardo, Nacho, Oscar; JJ, por las fiestas y reuniones académicas en la Roma o donde alla ocurrido.

A Chio por su amistad y apoyo administrativo, Laura, Jodelina, Karlita, Griss, George, Julio, y toda la demás manada del chilpalab.

Al laboratorio de la Dra Marta Macías y el laboratorio del Dor. Cerbon por acompañarme en todo este trayecto estudiantil.

A TODOS GRACIAS

A la memoria de mi padre y de mi amigo Yemin

Indice

Resumen (Abstract).....	I
1. Introducción.....	1
1.1 <i>Pachyrhizus erosus</i> y <i>P. ferrugineus</i>	1
1.1.2. Química.....	5
1.2. Insecticidas de origen vegetal.....	6
1.2.1 <i>Pachyrhizus erosus</i> y los rotenoides como agentes insecticidas.....	7
1.3. <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>Plodia interpunctella</i>	8
1.4. El cáncer.....	10
1.4.1. El cáncer en el mundo y en México.....	11
1.4.2. Los rotenoides como agentes anticancerígenos.....	12
2. Objetivos y justificación.....	14
3.- Preguntas científicas.....	15
4. Hipótesis.....	15
5. Materiales y Métodos.....	16
6. Resultados y Discusión.....	32
6.1. Aislamiento e identificación de compuestos de <i>P. erosus</i> y <i>P. ferrugineus</i>	32
6.1.2. Análisis por CLAR/UV-ESI-EM.....	41
6.2. Actividad biológica.....	44
6.2.1. Actividad insecticida de extractos y compuestos.....	44
6.2.2. Actividad citotóxica de extractos y compuestos.....	45
6.3. Mecanismos de acción de citotoxicidad de la rotenona en las células K562.....	46
6.3.1. Ensayo cometa.....	46
6.3.2. Ensayo en plásmido.....	47
6.3.3. Ensayo de fragmentación de ADN.....	48
6.3.3.1. Ensayo TUNEL.....	48
6.3.3.2. Ensayo de actividad de la caspasa-3.....	49
7. Conclusiones.....	51
8. Bibliografía.....	52
9. Apéndice.....	66

Indice de Tablas y Figuras

- Figura 1. Raíz tuberosa, morfología de las hojas y semillas de *P. erosus*
- Figura 2. Raíz tuberosa, morfología de las hojas, fruto y semillas de *P. ferrugineus*
- Figura 3. Isoflavonoides presentes en las semillas de *P. erosus*.
- Figura 4. CCF del extracto de acetona de las semillas de *P. erosus*
- Figura 5. CCF de las fracciones reunidas por similitud cromatográfica de la CC
- Figura 6. CCF de la subfracción 13
- Figura 7. CCF de las 26 subfracciones obtenidas del sobrenadante de la fracción 56-59
- Figura 8. CCF de las 26 subfracciones obtenidas del sobrenadante de la fracción 56-59 (UV)
- Figura 9. Fracciones obtenidas del segundo extracto de las semillas de *P. erosus*
- Figura 10. CCF de compuestos aislados de manera simultánea de las semillas de *P. erosus*
- Figura 11. Preparación del alimento con las concentraciones experimentales de los extractos y compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus*
- Figura 12. Esqueleto básico de un rotenoide
- Figura 13. Esqueletos de una isoflavona y una 3-arilcoumarina
- Figura 14. Datos de RMN¹H de la rotenona
- Figura 15. RMN¹H de la paquirizina
- Figura 16. Datos de RMN¹H de la paquirizona
- Figura 17. Datos de RMN¹H de la dehidroneotenona
- Figura 18. Datos de RMN¹H de la dolineona
- Figura 19. Datos de RMN¹H de la erosona
- Figura 20. Datos de RMN¹H de la 12a-hidroxi paquirizona
- Figura 21. Cromatograma de los extractos de hojas y semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* mediante la técnica HPLC-UV (244 nm).
- Figura 22. Reareglo Retro Diels-Alder de los rotenoides.
- Figura 23. Genotoxicidad inducida por rotenona en las células K562
- Figura 24. Ensayo en plásmido de la rotenona en ADN
- Figura 25. Fragmentación del ADN en células K562 evaluada mediante el ensayo TUNEL
- Figura 26. Actividad de la caspasa-3 después del tratamiento con rotenona
- Tabla 1. Biología de *P. erosus* y *P. ferrugineus*
- Tabla 2. Lugar, fecha y peso (g) de las colectas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*
- Tabla 3. Rendimiento de los extractos de hexano, acetona y/o AcOEt y MeOH, de las semillas y hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*

Tabla 4. Isoflavonoides identificados en las hojas y semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*, analizados por espectrometría de masas

Tabla 5. Concentración letal media (CL₅₀) de extractos y compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus* en *D. melanogaster*

Tabla 6. Ensayo de citotoxicidad hacia cinco líneas celulares tumorales humanas de extractos y compuestos de las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*

RESUMEN

El genero *Pachyrhizus*, está compuesto por cinco especies. Dos de ellas, *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban y *P. ferrugineus* (Piper) (Fabaceae), se encuentran en México. La primera es cultivada y la segunda silvestre. Las semillas de *P. erosus* han sido usadas por su actividad como insecticida, piscicida y acaricida, debido a su contenido de rotenona y otros isoflavonoides que poseen propiedades insecticidas y fungicidas, así como efectos citotóxicos. A la fecha solo se han realizado estudios químicos con las semillas y hojas de *P. erosus*, mientras que para *P. ferrugineus* no existe ningún estudio ni químico ni biológico. Se colectó el material biológico de ambas especies, en Morelos y Chiapas en 2012. Se prepararon los extractos por maceración (hexano, acetona y/o acetato de etilo y metanol). De las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* se aislaron e identificaron por CC, HPLC-UV-EM y RMN¹H siete isoflavonoides: rotenona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona, erosona, dolineona y la 12a-hidroxi paquirizona, esta ultima solo en *P. erosus*. Las hojas de *P. erosus* presentaron rotenona y dolineona, mientras las hojas de *P. ferrugineus* presentaron seis compuestos: rotenona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona, erosona y dolineona. Se observó actividad insecticida de los extractos de acetona de las semillas de ambas especies, así como de la rotenona y dolineona contra *Drosophila melanogaster* (Diptera). No se observó actividad insecticida de los extractos de ambas plantas, ni de los seis isoflavonoides contra *Plodia interpunctella* (Lepidoptera). Los extractos de las semillas de *P. erosus*, así como la rotenona mostraron actividad citotóxica en células K562 y HeLa, pero no en las otras tres líneas tumorales examinadas. Con respecto a los mecanismos de acción, la rotenona provoco daño al ADN en las células K562, observándose vía el ensayo cometa y plásmido. La rotenona indujo muerte celular tipo apoptosis, de acuerdo a los resultados del ensayo TUNEL y caspasa-3.

Abstract

Pachyrhizus spp., comprises five species. Two of them, *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban and *Pachyrhizus ferrugineus* (Piper) are in Mexico. The first is cultivated and wild, while the second is only wild type. *P. erosus* seeds have been used as insecticides, acaricides, piscicides and cytotoxic effects, due to it contains rotenone and other isoflavonoids, which possesses insecticidal and fungicidal activities, as well as cytotoxic effects. To date, only chemical studies have been performed with *P. erosus* seeds and leaves, while *P. ferrugineus* has not been done any chemical and biological studies.

The biological material of both species was collected in Morelos and Chiapas in 2012. Extracts were obtained by maceration (Hx, Acetona, AcOEt and MeOH). *P. erosus* and *P. ferrugineus* seeds were isolated and identified by CC, HPLC-UV-MS and NMR¹H seven isoflavonoids, namely: rotenone, pachyrhizine, pachyrhizone, dehydroneotone, erosone, dolineone and 12a-hydroxypachyrhizone, this last was only present in *P. erosus*. *P. erosus* leaves presented two compounds (rotenone and dolineone), while *P. ferrugineus* leaves presented: rotenone, pachyrhizine, pachyrhizone, dehydroneotone, erosone and dolineone. Insecticidal activity in *Drosophila melanogaster* were observed in acetone extracts of seeds of both species as well as rotenone and dolineone against *Drosophila melanogaster* (Diptera). Meanwhile, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera) not insecticidal activity were observed of both plants, as well as six isoflavonoids. *P. erosus* acetone extract seeds and rotenone showed cytotoxic activity in K562 and HeLa cell lines, but not with other three cell tumor lines tested. Respect to the mechanisms of action, rotenone caused DNA damage in K562 cells, being observed by comet and plasmid assay. Rotenone induced apoptosis cell death type, according to the TUNEL and caspase-3 assay.

1. Introducción

1.1. *Pachyrhizus erosus* y *Pachyrhizus ferrugineus*

Botánica

El género *Pachyrhizus*, está ubicado taxonómicamente en la subtribu Diocleinae, tribu Phaseoleae en la familia Fabaceae. Está compuesto por cinco especies, todas ellas con distribución en el continente americano. Dos de ellas, *P. erosus* (L.) Urban y *P. ferrugineus* (Piper) (Sörensen, 1996), se encuentran en México desde nivel de mar hasta los 1,600 msnm, aunque su distribución llega hasta Colombia (Fuccillo *et al.*, 1997). La primera especie se encuentra tanto en forma silvestre como cultivada, mientras que la segunda solo se encuentra en estado silvestre. Las otras tres especies son *P. tuberosus*, *P. panamensis* y *P. ahipa*, que se encuentran en Centro y Sudamérica (Sörensen, 1996).

Las plantas del género tienen las siguientes características: enredadera de tipo herbácea y en algunas ocasiones como plantas perennes lignificadas con una o más raíces tuberosas; hojas trifoliadas con estípulas, pinnadas y con estípulas caducas; inflorescencia en un simple racimo; las flores poseen un cáliz tubular y una corola papilionácea; el ovario posee un nectario con un estigma subgloboso y un estilo ciliado ventralmente. La legumbre es septada entre las semillas; estas últimas son cuadradas más o menos aplanadas dorso ventralmente, y con un color que va de verde oliva a marrón profundo (Sörensen, 1996).

Pachyrhizus erosus es una especie cultivada que posee gran variedad en la morfología de las hojas (figura 1), que va de dentada a palmada; no posee pelos en los pétalos; el número de flores es de 4 a 11 en una florescencia lateral; la inflorescencia es en forma de racimos, y el largo de esta es de 8 a 45 cm; la legumbre es de tipo dehiscente de 80-140 mm × 8-17 mm, con constricciones o surcos entre semillas en frutos maduros; con una forma de aplanada de cuadrada a redondeada pero nunca reniforme (figura 1); la raíz es tuberosa de forma oblonga a forma de trompo (figura 1). La especie cultivada se diferencia de las especies silvestres en que estas últimas las hojas son más pequeñas; poseen mayor cantidad de pelos en las

legumbres y en las hojas; su raíz es más irregular y más pequeña, con un color café en la superficie del tubérculo (Sörensen, 1996).

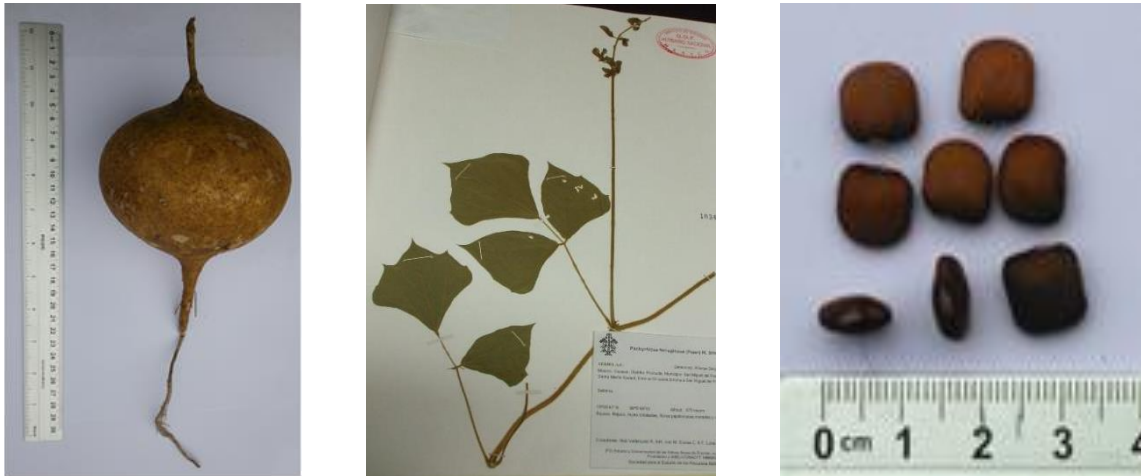


Figura 1. Morfología de la raíz tuberosa, hojas y semillas de *P. erosus*. Semilla adquirida en “El Semillero”. Hojas colectadas en San Andrés Tepepan, Tlalquitenango, Morelos, México.

Pachyrhizus ferrugineus por su parte es la única del género que es perenne; posee raíces poco tuberosas pero perennes; y tanto las raíces como las ramas son lignificadas más que las otras especies del género (figura 2); el borde de las hojas es muy variado como *P. erosus*; la hoja es subcoriácea, y ocasionalmente pubescente, con pelos estrigosos de color café; la pubescencia es reducida; el haz de la hoja es de color verde oscuro y el envés es de color verde claro; el largo de la inflorescencia es de aproximadamente 86 cm y esta posee de 8 a 21 flores; las alas y los pétalos son ciliados; la legumbre es de 80 a 130 mm de largo, y de 12 a 23 mm de ancho; poseen pelos estrigosos de color café y no posee constricción entre las semillas; las cuales son redondeadas (13×13 mm) y lateralmente comprimidas (figura 2). La especie esta asociada a bosques lluviosos con suelos pobres en fósforo (2 a 4 ppm), se encuentra en las orillas de los ríos y tiene resistencia a la humedad. *Pachyrhizus ferrugineus* se distribuye en la costa del Atlántico de América Central, Veracruz, Panamá, Colombia y Guatemala (Sörensen, 1996).



Figura 2. Raíz tuberosa, morfología de las hojas, fruto y semillas de *P. ferrugineus*. Especie colectada en la Reserva Natural “La Sepultura”; municipio de Villaflores, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Planta colectada en septiembre del 2012.

Tabla 1. Comparación de los rasgos de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.

<i>Pachyrhizus erosus</i>	<i>Pachyrhizus ferrugineus</i>
Ampliamente distribuida en el Centro-Sur de México.	Distribuida en la vertiente del Pacífico, Chiapas, así como Yucatán y Veracruz.
Principalmente en selva baja caduci-folia y vegetación secundaria derivada de la primera.	Principalmente a lo largo de ríos en regiones con selva alta y selva baja, en suelos con bajo contenido de fósforo.
Hierba.	Con partes leñosas.
Fascículos laterales en la inflorescencia con 4-11 flores, y la inflorescencia generalmente no pasa de los 45 cm.	Fascículos laterales en la inflorescencia con 8-21 flores, y la inflorescencia es muy larga.
Sin pelos en los pétalos.	Pétalos con pelos notables.
Legumbre 80-140 mm × 8-17 mm, con constricciones o surcos entre semillas en frutos maduros.	Legumbre 80-130 mm × 12-23 mm, sin constricciones o surcos entre semillas.

Basado en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/pachyrhizus-erosus/fichas/ficha.htm>.

El conocimiento y uso agrícola de *P. erosus* ha sido reportado desde épocas prehispánicas. En la era precolombina tardía y postcolombina hay referencias al cultivo de la *P. erosus*, llamada comúnmente “jícama”, “mehen-chikam” (náhuatl) y “guyati” (zapoteca) (Sörensen, 1996). Existen evidencias que durante el período precolombino se cultivó por las civilizaciones toltecas, mayas y aztecas (Sörensen, 1996). De acuerdo con Phillips-Mora *et al.* (1993), los aztecas cultivaban dos variedades de jícama, conocidas actualmente por los campesinos como *kctoztol* (jícama de leche) y *coentric* o *coentic* (jícama de agua). Así mismo, no existen evidencias de que *P. ferrugineus* haya sido domesticada y cultivada (Sörensen, 1996).

En el siglo XVI, el protomédico Francisco Hernández anotó en su *Historia de las Plantas de la Nueva España* (1571-1577) que las vainas del “segundo coen o coentic” se empleaban contra la sarna. Esta planta ha sido interpretada como si se tratase de *P. erosus* (Valdés y Flores, 1985). En la época contemporánea, las aplicaciones medicinales de *P. erosus* hacia afecciones en seres humanos han perdurado. Se ha reportado que los polvos de las semillas de *P. erosus* han sido usados para tratar afecciones en la piel, flujo, prurito y sarna, mientras que el tubérculo de *P. erosus* era usado para curar la fiebre (Sörensen, 1996). Sin embargo, no son las únicas aplicaciones terapéuticas de *P. erosus*. Esta especie se emplea en la medicina tradicional, como terapia purgativa, contra la disentería, hemorroides, antiinflamatoria, de efecto analéptico, dolores de garganta, enfermedades en la piel, vermífugo, laxante y para la resaca alcohólica, en China, Taiwán, Vietnam, Brasil, Cuba y México (Martínez, 1977; Sörensen, 1996).

En cuanto a los usos de *P. ferrugineus* existen pocos reportes en la literatura. Sörensen (1996) menciona que es usada por los campesinos en Guatemala como vermífugo. El mismo autor reporta que *P. ferrugineus* se encuentra en las orillas de los ríos, en suelos pobres en fósforo. Así mismo, esta especie no origina descendencia híbrida fértil al cruzarse con otras especies de *Pachyrhizus*. Dentro de las especies silvestres del género es la única que presenta resistencia al virus del mosaico (BCMV).

1.1.2. Química.

A la fecha solo se han realizado estudios químicos con las semillas, hojas y tubérculos de *P. erosus* (Sörensen, 1996), mientras que para *P. ferrugineus* no existe ninguno. El principal uso de *P. erosus* (jícama) a nivel mundial es el consumo de sus tubérculos como vegetal fresco (Phillips-Mora *et al.*, 1993). El tubérculo posee un alto contenido en almidón (Martínez, 1959; Montaldo, 1983). Las semillas maduras de *P. erosus* contienen gran cantidad de aceite (20-28%) (Hansberry *et al.*, 1947), el cual contiene, entre otros compuestos; ácido palmítico (27%), ácido esteárico (5.7%), ácido oleico (33.4%) y ácido linoléico (34.2 %) (Broadbent y Shones, 1963), mientras la porción no saponificable representa solo el 1% (Phillips-Mora *et al.*, 1993). Diversos autores han reportado los siguientes isoflavonoides en las semillas: rotenona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona, erosona, dolineona, 12a-hidroxi paquirizona, 12a-hidroxi rotenona, (Norton y Hansberry, 1945; Chandrashekar *et al.*, 1967; Krishnamurti y Seshadri, 1966, Sörensen, 1990; Alavés-Solano *et al.*, 1996; Barrera Necha *et al.*, 2004; Estrella-Parra *et al.*, 2014) (figura 3). Por otra parte, Duke reportó (1981) el contenido de rotenona en tallos (0.03 %), hojas (0.11 %), vainas (0.02%), semillas (0.66%) y raíz (0%).

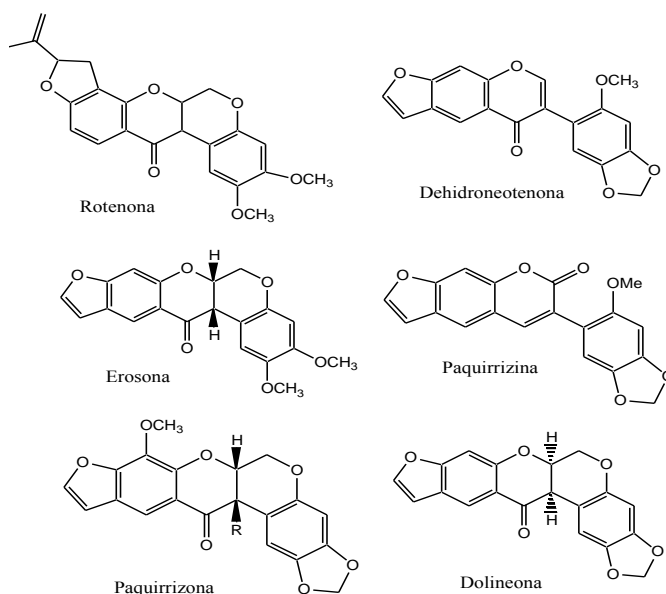


Figura 3. Isoflavonoides presentes en las semillas de *P. erosus*.

1.2. Insecticidas de origen vegetal.

Desde tiempos remotos el hombre descubrió las propiedades insecticidas de algunas plantas. The Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) de los Estados Unidos de Norteamérica define como insecticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier insecto, declarada como plaga (Larramendy y Soloneski, 2014). Se conoce que los antiguos romanos utilizaban el falso heleboto (*Veratrum viride*) (Melanthiaceae) como un rodenticida e insecticida (Donald, 1966). *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) y *Derris* spp. (Fabaceae) han sido usados por los chinos durante cientos de años como insecticidas (Donald, 1966). Los plaguicidas de origen natural, como la rotenona, la nicotina y el piretro se utilizaron a gran escala en el control de plagas hasta la primera mitad del siglo XX; sin embargo, después de la Segunda Guerra Mundial perdieron su importancia con la introducción de los plaguicidas orgánicos sintéticos, los cuales pueden ser producidos en grandes cantidades y a bajo costo (Berger, 1994).

En la actualidad, el uso de pesticidas químicos sintéticos en la agricultura, industria y hogares ha creado un impacto negativo en la salud humana, la vida silvestre y en el ambiente en general (Neupane, 2001). Así, el uso de plaguicidas sintéticos ha dado lugar a efectos negativos como la contaminación de vegetales para consumo humano y la disminución de especies benéficas (Dibiyantoro, 2005). Además, el mal uso de productos químicos no selectivos afecta negativamente a las poblaciones de enemigos naturales de las plagas e inducir problemas con el desarrollo de la resistencia hacia los mismos. Se sabe que cerca de 450 especies de plagas de insectos y ácaros han desarrollado resistencia a uno o más plaguicidas de origen sintético (Berger, 1994), y en otros países como Nepal, representa un grave problema la deposición final de pesticidas obsoletos que se han ido acumulado (Neupane, 2001).

Por otra parte, Cork *et al.* (2009) mencionan la ventaja de usar pesticidas de origen vegetal. Estos autores reportaron que en Malawi y Zambia del 2007 a 2008 los granjeros que empleaban pesticidas de origen vegetal en sus cultivos observaron menor daño al ambiente, así como un costo económico más bajo que si se usaran pesticidas de origen sintético.

Además, mencionan que en naciones en desarrollo, la comercialización de pesticidas de origen vegetal traerá grandes beneficios en especial a naciones ubicadas en zonas tropicales y subtropicales.

1.2.1 *Pachyrhizus erosus* y los rotenoides como agentes insecticidas.

El protomédico Francisco Hernández hizo referencia en su *Historia de las Plantas de la Nueva España* (1571-1577) a los tubérculos comestibles de la “xícama” (*Pachyrhizus erosus*) y, además registró el uso de las vainas de otra planta similar llamada segundo coén o coentic” contra la sarna, una planta que podría tratarse también de *P. erosus* (Alavés-Solano *et al.*, 1996), o bien de *P. ferrugineus*.

Se sabe que las semillas de *P. erosus* contienen rotenoides, y otros compuestos (Norton y Hansberry, 1945; Chandrashekar *et al.*, 1967; Krishnamurti y Seshadri, 1966; Sörensen, 1990; Alavés *et al.*, 1996; Barrera Necha *et al.*, 2004; Estrella *et al.*, 2014). Los rotenoides son metabolitos secundarios de origen vegetal, sintetizados exclusivamente por especies de la subfamilia Papilonoideae (Fabaceae), históricamente conocidos por sus propiedades insecticidas, acaricidas y piscicidas (Nawrot *et al.*, 1986).

Diversos autores han señalado la actividad insecticida de las semillas contra insectos y ácaros ectoparásitos del hombre y animales domésticos, así como contra plagas agrícolas. Paramonov (1953) por ejemplo, menciona que las semillas de *P. erosus* es un insecticida efectivo contra la plaga del arroz *Aulacuphura femoralis chinensis* (Chrysomelidae). Norton y Hansberry (1945) por su parte, encontraron que los extractos de las semillas de *P. erosus* mostraron mayor toxicidad a insectos comparadas con los de las raíces de *Derris* y *Lonchocarpus* (Fabaceae). Grainge *et al.* (1984) adicionalmente, encontraron que los extractos de las semillas de *P. erosus* tienen efectos insecticidas y antialimentarios hacia *Plutella xylostella* (Lepidoptera), considerado el insecto plaga más importante en el sureste de Asia, actuando como un veneno al contacto provocando daños gástricos al insecto. También se ha reportado que el aceite de las semillas de *P. erosus* es un excelente insecticida hacia el áfido de la caña de azúcar, (*Oregma lanígera Zehntner*) (Hemiptera: Aphididae) (Sörensen, 1996). Finalmente, Scramin (1994) señaló que la presencia de rotenoides en las

semillas y hojas de *P. tuberosus* les proporcionan protección contra sus insectos depredadores.

Continuando, Madrigal (1995) evaluó la toxicidad hacia *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) de la rotenona aislada de *P. erosus* y de la delta-endotoxina obtenida por fermentación de *Bacillus thuringiensis*, tanto por separado como en manera combinada; encontrando una mortalidad del 90%, aun cuando la concentración de la delta-endotoxina se redujo al 25% en comparación con la rotenona. Alavés-Solano *et al.* (1996) estudiaron las semillas de cuatro genotipos de jícama, observando que químicamente son similares entre sí, presentando actividad antialimentaria sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Curculiónidae), adjudicándole el efecto insectida a los rotenoides: erosona, paquirizona, dolineona y paquirizina. Barrera Necha *et al.* (2004), por su parte mencionan que los polvos de la semilla de *P. erosus*, así como los compuestos presentes en la semilla rotenona, erosona, paquirizona, dolineona, paquirizina y dehidroneotenona inhibieron el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer*.

1.3. *Drosophila melanogaster* y *Plodia interpunctella*

Drosophila melanogaster

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) es un subgrupo que consiste de nueve especies, poseen ojos compuestos localizadas en la cápsula, tienen un abdomen segmentado de color negro a pálido (Chyb y Gompei, 2013). La embriogénesis se produce dentro del huevo que es depositado en la comida, y en menos de 24 h eclosiona (Dahmann Christian, 2008). El ciclo de vida es de 1 día como embrión, 1 día en el primer y segundo estadio larval y de 2 a 3 días en el tercer estadio larval, 5 días de estadio de prepupa y pupa y finalmente eclosiona como adulto al día 10 (Curtis y Schneck, 2008). Cabe mencionar que la larva aumenta aproximadamente 200 veces en peso (Dahmann Christian, 2008). Esta acumulación de masa es debido al rápido crecimiento de los tejidos larvarios (Dahmann Christian, 2008). Las moscas adultas son emergentes de unos 3 mm de

longitud (Dahmann Christian, 2008). Las hembras pesan sobre 1.4 mg, mientras que los machos pesan alrededor de 0.8 mg (Dahmann Christian, 2008). Las hembras son receptivas en menos de 12 horas después de la eclosión, y empiezan a poner sus huevos poco después del apareamiento (Dahmann Christian, 2008). Por lo tanto, dos semanas son suficientes para cada generación. La producción de huevos alcanza hasta 100 huevos por día. (Dahmann Christian, 2008). Siete especies son restringidas en Africa, mientras las otras dos son cosmopolita (Klowden, 2013). Debido al ciclo de vida rápido y su fácil manejo de *D. melanogaster*, que es usada como modelo biológico en estudios científicos experimentales (Dahmann Christian, 2008).

Plodia interpunctella

La polilla india de la harina, *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera) es una de las principales plagas de insectos de productos almacenados, encontrándose en todos los continentes excepto en la Antártida (Mohandass *et al.*, 2007). Los huevos son de color blanco grisáceo, comprendidos entre 0.3 y 0.5 mm de longitud, las larva miden de 9 a 19 milímetros (Hamlin, 1931). Las alas anteriores son de color blanco plateado o gris con manchas oscuras; la porción externa es de color bronce con bandas oscuras irregulares (Hamlin, 1931). Las antenas son ligeramente cónicas y delgadas, miden casi dos tercios de la longitud del cuerpo (Hamlin, 1931). El adulto presenta venación alar (Hamlin, 1931). Hay cinco estadios larvales (Hamlin, 1931). Los huevos de *P. interpunctella* son pequeños, con excrescencias redondeadas y carenas prominentes (Hamlin, 1931). El comportamiento de ovoposición en *P. interpunctella* está influenciada por el olor de los alimentos, y los huevos son puestos sobre o cerca de la superficie del alimento (Mohandass *et al.*, 2007). Las larvas generan hilos para formar una especie de alfombra y las hembras ponen los huevos en los alimentos, paredes y techos de los edificios de almacenamiento de alimentos procesados (Mbata y Shapiro-Ilan, 2010).

La diapausa ocurre en el 5° estadio, debido a que ha pasado el periodo de la alimentación o a la prevalencia de las bajas temperaturas. El tiempo requerido de *P. interpunctella* para

completar una generación es una compleja interacción de la temperatura y la dieta (Mohandass *et al.*, 2007).

Además, *P. interpunctella* es una plaga en máquinas de fresado y otras plantas procesadoras de alimentos, almacenes, panaderías, entre otros (Mohandass *et al.*, 2007). Contribuye de forma significativa a las pérdidas causadas en productos almacenados como: cacahuete, cereales y alimentos procesados (Mbata y Shapiro-Ilan, 2010).

1.4. El cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por un crecimiento celular desregulado, acompañado por la invasión y la proliferación de células fuera de su sitio original, destruyendo toda la colonia celular (Pecorino, 2012). Cualesquiera de los 200 o más tipos celulares del cuerpo humano puede transformarse en un tejido maligno (Curtis y Barnes, 2006) y la metástasis en el cáncer, es la causa de muerte en pacientes con esta enfermedad. La metástasis ocurre través de múltiples pasos que consisten en la invasión de un tumor primario dentro del torrente sanguíneo, su posterior inmigración a otros órganos, la adhesión a las células endoteliales y la infiltración dentro de los tejidos (Hisashi *et al.*, 2007).

El cáncer es clasificado de acuerdo al tejido y al tipo celular en que se encuentre: si el cáncer surge de células epiteliales es denominado carcinoma; si se origina de tejido conectivo o células musculares es llamado sarcoma, y si este no pertenece a ninguna de las categorías mencionadas se denomina leucemia (Bruce *et al.*, 2002).

Diversos estudios sugieren que los daños al material genético de las células originan el cáncer (Pecorino, 2012). Se reconoce una etapa de *iniciación*, la cual está representada por daños al material genético; otra etapa corresponde a la *promoción*, en donde algunas células con material genético dañado se dividen y se expanden el número de clonas con capacidad para producir células tumorales; finalmente se reconoce la etapa de *progresión*, donde se generan algunas células que han acumulado suficiente daño para formar ahora un tumor (Jiménez y Merchant, 2003). Se dice que un cáncer es benigno cuando el tumor es localizado en el sitio de origen; y es maligno cuando las células tumorales invaden otros tejidos vecinos

desplazándose a sitios distantes formando tumores secundarios (metástasis) (Norman y Lodwick, 2007). Las células cancerígenas invaden tejidos entrando a la circulación sanguínea vía linfática o directamente, transportándose y llegando a otro tejido donde se establecen (Bertino, 1997).

1.4.1. *El cáncer en el mundo y en México*

La Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos registrados, lo cual equivale al 13% del total, entre los que destacan los de pulmón, estómago, hígado, colon y mama.

El cáncer está presente en algunos de los textos médicos Novohispánicos más importantes del Siglo XVI. Textos como la *Summa y recopilación de Chirurgia* de Alonso López de Hinojosos, en las obras del protomédico Francisco Hernández, en la *Glossa de las llagas viejas* de Juan Frago y otros en el cual coinciden en señalar que uno de los cánceres más frecuentes de la época era el de mama, al que se refieren como *de los pechos de las mujeres* (Pérez-Tamayo, 2003). En muchos de estos textos se menciona el uso de plantas medicinales como contra los tumores o expresamente contra el cáncer, pero no se incluye a la jícama (*P. erosus*).

INEGI (2012), reporta que en México el porcentaje de letalidad por tumores malignos durante 2009 fue de aproximadamente 6 por cada 100 personas hospitalizadas. Entre los hombres, las principales causas de morbilidad hospitalaria se presentaron en órganos hematopoyéticos (22.8%), órganos digestivos (17.5%), y del tejido linfático (9.8%) (INEGI, 2012). En las mujeres, el cáncer de mama constituye la principal causa de morbilidad hospitalaria (22.0%), seguida de los tumores de los órganos hematopoyéticos (14.1%); y de los órganos genitales femeninos (13.5%), siendo la tasa de mortalidad de 65.49 por cada 100 mil mujeres (INEGI, 2012).

En la población menor de 20 años, se observó que principalmente se manifiestan como leucemias (linfoide, mieloide, monocítica y otras de tipo celular no especificado) (INEGI, 2012). Los niños de 5 a 9 años tienen los porcentajes más altos de incidencia (37.8%) de casos, seguido por los niños menores de 5 años (26.5%) (INEGI, 2012).

Las células cancerígenas han desarrollado resistencia contra la gran mayoría de los fármacos actualmente utilizados en la terapéutica hacia el cáncer, además representa un alto costo económico para el paciente muchos de estos tratamientos. Adicionalmente, dichos tratamientos conllevan efectos secundarios nocivos para el enfermo (INEGI, 2012). En este entorno, los metabolitos secundarios de plantas pueden representar una fuente potencial para el desarrollo de nuevos fármacos novedosos con un índice terapéutico aceptable y una menor cantidad de efectos secundarios.

1.4.2. *Los rotenoides como agentes anticancerígenos*

Se sabe que las semillas de *P. erosus* contienen rotenoides, entre otros compuestos (Norton y Hansberry, 1945; Chandrashekar *et al.*, 1967; Krishnamurti y Seshadri, 1966, Sørensen, 1990; Alavés-Solano *et al.*, 1996; Barrera Necha *et al.*, 2004; Estrella *et al.*, 2014). Los rotenoides son metabolitos secundarios de origen vegetal, sintetizados exclusivamente por especies de la subfamilia Papilonoideae (Nawrot *et al.*, 1986). Históricamente, han sido conocidos por sus propiedades insecticidas, acaricidas y piscicidas (Nawrot *et al.*, 1986); sin embargo, en los últimos veinte años los rotenoides han adquirido interés farmacológico por sus propiedades antitumorales (Kardano *et al.*, 1990) ya que muchos de ellos poseen citotoxicidad contra varias líneas tumorales humanas (Leiping *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2010), constituyendo una fuente como agentes anticancerígenos (Ito *et al.*, 2004). De esta manera, Gosalvez (1973) observó el efecto de la rotenona en células cancerígenas mamarias como un inhibidor de la respiración mitocondrial de dichas células. Wolvetang *et al.* (1994) por su parte, reportaron que la rotenona indujo el fenómeno de apoptosis en células linfoblastoides y otras células mamarias en humanos de 12 a 18 h después de ser aplicado. Wang *et al.* (1999) señalan que la rotenona disminuyó la incidencia y la proliferación del carcinoma hepatocelular mediante la muerte celular por apoptosis.

En épocas más recientes, Amstrong *et al.* (2001) señalaron que la rotenona indujo la apoptosis en el complejo mitocondrial I de células de linfoma humano B. Chun *et al.* (2003), por su lado, reportaron a la deguelina como inhibidor del crecimiento celular de cáncer de pulmón, pero con efectos mínimos nocivos en células no cancerígenas, proponiéndolo como un agente quimiopreventivo en los primeros estadios de cáncer de pulmón. Ito *et al.* (2004) al respecto discuten en general que los rotenoides pueden ser prototipos de agentes antitumorales. En este mismo sentido, Lee *et al.* (2005) observaron que la deguelina reduce el volumen de los tumores de pulmón sin afectar las células sanas, proponiéndolo como un agente quimiopreventivo en fases tempranas de la carcinogénesis pulmonar. Finalmente, Yan *et al.* (2005) encontraron que la deguelina, redujo en un 56% la formación y crecimiento del adenoma pulmonar en ratones, reduciendo en un 78% el tamaño del tumor, proponiendo a la deguelina como un agente preventivo para el cáncer pulmonar.

Los hallazgos anteriores despertaron el interés de estudiar los mecanismos de acción a nivel molecular de diversos rotenoides. Lee *et al.* (2008) reportaron que la deguelina tuvo un efecto quimiopreventivo sobre cáncer de piel, mama, colon y pulmón. Deng *et al.* (2010), por su parte señalaron que la rotenona mostro un fuerte efecto inhibitorio sobre células cancerosas de la mama.

Asimismo, Lee *et al.* (2010) encontraron el efecto quimioterapéutico de la deguelina sobre células gástricas cancerosas, deteniendo las fases G2/M y desembocando en la muerte celular por apoptosis. Choi *et al.* (2010) encontraron que la tefrosina tiene efecto antitumoral, ya que induce la internalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) provocando la degradación de receptores en células del colon cancerígenas, así como la apoptosis, lo que constituye la primera evidencia del efecto anti cancerígena de este compuesto. Regan *et al.* (2010) por otro lado, reportaron que la deguelina tiene efectos inhibitorios sobre células epiteliales cancerígenas de los bronquios, inhibiendo la proliferación de estas células mediante la muerte celular por apoptosis, provocando un decrecimiento del volumen del tumor. En este mismo sentido, Goncalves *et al.* (2011) reportaron que la rotenona detuvo el crecimiento de diferentes células cancerosas y el arresto del ciclo celular en la fase de mitosis, sugiriendo que la rotenona tiene efectos múltiples sobre diversas células cancerosas como una droga antimitótica.

2. Objetivos y Justificación

Objetivo general

Determinar la composición química de las semillas y hojas de *Pachyrhizus ferrugineus* y *P. erosus*, y evaluar su citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas, así como el efecto insecticida de los extractos ambas especies.

Objetivos particulares

- 1.- Identificar los metabolitos secundarios presentes en las semillas y hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.
- 2.- Determinar el efecto insecticida de los metabolitos secundarios aislados contra dos *Drosophila melanogaster* y *Plodia interpunctella*.
- 3.- Determinar la citotoxicidad de los metabolitos secundarios aislados contra diferentes líneas celulares tumorales humanas.
- 4.- Determinar los mecanismos de acción molecular citotóxica de los compuestos en las líneas celulares tumorales humanas.

Justificación

Estos objetivos se justifican debido a que se desconoce la composición química y las propiedades biológicas de los compuestos de las semillas y hojas de *Pachyrhizus ferrugineus*, así como de las hojas de *P. erosus*. Por otro lado, se desconoce si otros rotenoides presentes en las semillas de *P. erosus* y posiblemente en *P. ferrugineus* como: paquirizina, dolineona, dehidroneotenona y 12a-hidroxi paquirizona, poseen propiedades citotóxicas en líneas

celulares tumorales humanas, así como si presentan actividad insecticida en las dos especies de insectos mencionados.

3. Preguntas científicas

- 1.- ¿La composición química de las semillas y hojas tanto de *P. erosus* como de *P. ferrugineus* son similares?
- 2.- ¿Otros isoflavonoides, diferentes a la rotenona, tendrán efecto insecticida en *D. melanogaster* y *P. interpunctella*?
- 3.- ¿Otros isoflavonoides diferentes a la rotenona, tendrán efecto citotóxico en líneas celulares tumorales humanas?
- 4.- ¿Qué mecanismos de acción molecular explican la actividad citotóxica de los rotenoides en las líneas tumorales humanas?

4. Hipótesis

- 1.- Las semillas y hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* presentarán una composición química semejante dada su estrecha relación taxonómica.
- 2.- Las semilla y hojas de *P. ferrugineus* presentará una mayor cantidad de compuestos en comparación con *P. erosus*, debido a la condición silvestre de la primera especie.
- 3.- Los compuestos de tipo rotenoide presentarán actividad insecticida hacia *Drosophila melanogaster* y *Plodia interpunctella*.
- 4.- Los compuestos de tipo rotenoide presentarán actividad citotóxica hacia diversas líneas celulares tumorales humanas.

5. Material y Métodos

Colecta del material Biológico

Colecta de semillas de Pachyrhizus erosus

Se adquirió 1 kg en peso seco de las semillas de *P. erosus* en julio del 2011, en la tienda “El Semillero” (Av. 5 de Mayo No. 10-b Col. Centro, c.p. 06000 México, D. F., tel 01 (55) 55 10 90 15 y 55 10 11 96).

Colecta de hojas de Pachyrhizus erosus

Se colectaron 102.7 g de hojas en la parte trasera (jardín) de la casa ubicada en calle 20 de Noviembre casi esquina con calle Nicolás Romero s/n en el ejido de San Andrés Tepepan, Tlalquitenango, Morelos, México, el día 17 de julio del 2012. Las hojas estaban libre de insecticidas ya que crecieron en la parte posterior de su casa de manera libre y no propiamente en el cultivar de jícamas del propietario de la casa (tabla 1). Un ejemplar fue depositado en el herbario del MEXU-UNAM (138292).

Colecta de hojas y semillas de Pachyrhizus ferrugineus

Se colectó esta especie en la Reserva Natural “La Sepultura” en el municipio de Villaflores, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, del 5 al 9 de septiembre del 2012 (16° 08' 11.3" N, 93° 35' 54.6" O, 1145 m.s.n.m) con las siguientes coordenadas: N 16° 08' 11.3'', WO 93° 35' 54.6'' a una altura de entre 1140 a 1150 msnm.. La colecta se realizó en selva mediana subperenifolia en un sendero poco transitado de la zona núcleo de esta reserva. Se colectaron tres especímenes, bejucos, los cuales no mostraba partes leñosas y presentaba frutos y semillas. Los especímenes presentaron tres tipos de morfología de las hojas (figura 1). El tubérculo presentó forma cónica como una zanahoria, o en forma de “L” con una elongación aproximada de 10 cm (figura 1). La especie es poco abundante, pues solamente se observaron cerca de 30 ejemplares a lo largo del sendero desde 1100 a 1400 msnm. Se colectaron 227 g

de hojas y 4.64 g de semillas (tabla 2). Un ejemplar fue depositado en el herbario del MEXU-UNAM (106089).

Tabla 2. Lugar, fecha y peso (g) de las colectas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.

Especie	Órgano	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Peso seco (g)	Observaciones
<i>Pachyrhizus erosus</i>	Semillas	Tienda "El Semillero"	Julio 2011	1000	
	Hojas	San Andrés Tepepan, Tlaquitenango, Morelos, Méx.	Julio 2012	102.68	Hojas sin herbivoría
<i>Pachyrhizus ferrugineus</i>	Semillas	Reserva Natural "La Sepultura", Villafloraes, Chiapas, Méx.	Septiembre 2012	4.64	Presentó un herbívoro
	Hojas			227.0	Hojas con poca herbivoría

Obtención y rendimiento de extractos a partir de solventes

Las hojas y las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se prepararon los extractos de las semillas y hojas de ambas especies. Las hojas secas se trituraron con unas tijeras. Al mismo tiempo, las semillas secadas a la sombra (con excepción de las semillas de *P. erosus*, las cuales se adquirieron secas), se trituraron mediante la acción mecánica de un molino. Enseguida los triturados fueron macerados, por separado, en solventes de menor a mayor polaridad: hexano, acetona y/o AcOEt, MeOH; respectivamente. En el caso de las hojas, en lugar de usar acetona se maceraron en AcOEt (tabla 3). Finalmente se concentraron los extractos mediante la eliminación de los solventes a presión reducida usando un roto-evaporador. Lo anteriormente se llevo a cabo *en ca.* 60 días. Se calcularon los rendimientos de las hojas y semillas de ambas especies.

Tabla 3. Rendimiento (Rto) de los extractos de hexano, acetona y/o AcOEt y MeOH, de las semillas y hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.

Especie	Órgano	Peso seco (g)	hexano	Rto (%)	Acetona** y/o AcoEt (g)	Rto (%)	MeOH (g)	Rto (%)
<i>P. erosus</i>	Semilla	1000	*250 mL	25	3.17	11.7	13.01	16.56
	Hoja	102.68	1.45 g	1.41	3.0	2.92	17.01	16.56
<i>P. ferrugineus</i>	Semilla	4.64	*2 mL	43.1	0.1	2.15	0.52	11.20
	Hoja	227.0	4.23 g	1.86	7.63	3.24	28.66	12.62

*Aceite de color amarillo

**Las semillas fueron maceradas en acetona y las semillas en AcoEt

Aislamiento e identificación de compuestos

Fracciones totales del extracto de acetona de P. erosus. El extracto de acetona de las semillas de *P. erosus* (3.17 g) se sometió a cromatografía en columna (CC) (sílica gel malla 70-230; fase móvil: hexano-AcOEt) en noviembre del 2012 (figura 4). Se obtuvieron 77 fracciones de 25 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica (CCF: sílica gel grado 60; fase móvil (fm): hexano/AcOEt 8:2; revelador: CeSO₄). De las fracciones reunidas se aislaron e identificaron por RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS δ 0 ppm) siete compuestos, en su mayoría rotenoides: **(1) dolineona** (fracciones 34-38); **(2-3) paquirizona** (fracciones 43-48 y 49-55 pp); **(2) 12a-hidroxi paquirizona** (fracciones 43-48 sb); **(4) dehidroneoteona** (fracciones 56-59 pp); **(4) paquirizina** y **rotenona** (fracciones 56-59 sb); y **erosona** aislada de otra CC, purificada posteriormente (fracciones 16-27).

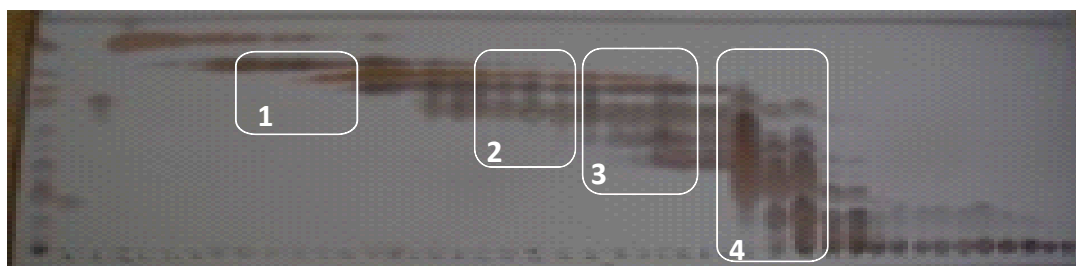
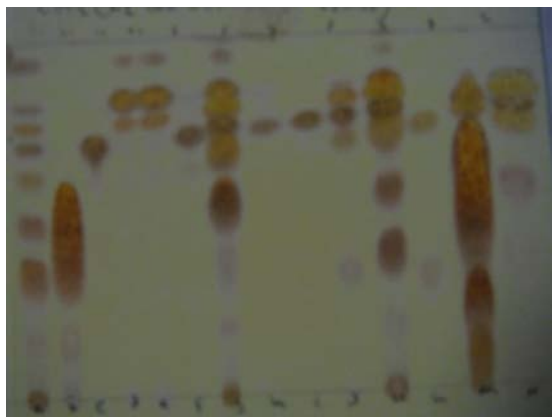


Figura 4. CCF del extracto de acetona de las semillas de *P. erosus* (sílica gel 60. fase móvil: hexano/AcOEt 8:2, revelador: CeSO₄). En el cromatofólio se muestran desde la fracción 31 hasta la 77, las cuales fueron reunidas por similitud del cromatograma.

Posterior al fraccionado y a la reunión por similitud cromatografica, se procedió a la purificación de las fracciones reunidas (figura 4). Las cuales, se purificaron de manera consecutiva e independiente las fracciones reunidas: 34-38, 43-48, 49-55 y 56-59 (figura 5).



- a. extracto de acetona de las semillas de *P. erosus* .
- b. rotenona (estándar)
- c. paquirizona (estándar)
- d. 34-38 pp.
- e. 34-38 sb.
- f. 39-42 pp.
- g. 39-42 sb.
- h. 43-48 pp (primer pp.)
- i. 49-55 pp.
- j. 43-48 pp (segundo pp.)
- k. 43-48 sb.
- l. 56-59 pp.
- m. 56-59 sb.
- n. 59-62 pp.

Figura 5. CCF de las fracciones reunidas por similitud cromatográfica de la CC (FM 100% diclorometano; revelador: CeSO_4).

Fracción 34-38. Se reunieron las fracciones 34-38 por su similitud cromatográfica (figura 4), de ellas se obtuvo un precipitado y un sobrenadante (figura 5). Después, se reunió tanto el precipitado como el sobrenadante de dichas fracciones. Para purificar esta mezcla de compuestos, se realizó una cromatografía en placa preparativa (CPP) fase normal, usando como fase móvil CH_2Cl_2 100%, eluyendo la placa dos veces, obteniendo 11 subfracciones de las cuales se obtuvo un precipitado en forma de polvo blanco, que fue identificado como el rotenoide dolineona.

Fracciones 43-48 y 49-55. Se reunieron por similitud cromatográfica las fracciones 43-48 y 49-55 (figura 4). Ambas fracciones se purificaron de manera independiente. De las fracciones reunidas (43-48 y 49-55) se obtuvieron, de manera independiente, tanto precipitados como sobrenadantes y el precipitado se presentó en forma de polvo blanco. En el caso de la fracción 43-48 se obtuvieron dos precipitados (figura 5). El primer precipitado se obtuvo con MeOH, mientras el segundo precipitado se obtuvo con acetona. Como se puede observar en el cromatofólio, los precipitados de las fracciones 43-48 y 49-55 fueron similares (figura 5), así que se procedió a reunirlos. El sobrenadante de la fracción 49-55 se perdió debido a un

error en el manejo de la muestra. De la reunión de ambos precipitados se obtuvo un precipitado en forma de polvo blanco, que fue identificado como el rotenoide paquirizona.

Fracción 43-48 sb. Se reunieron por similitud cromatográfica las fracciones 43-48 (figura 4). De las fracciones reunidas, se obtuvieron dos precipitados y un sobrenadante. En el sobrenadante de esta fracción se observa, de acuerdo al cromatofólio, varios analitos (figura 5). Para purificar el sobrenadante, se realizó una CPP fase normal (FM: dicloro-metano 100% eluyendo dos veces) obteniendo cuatro subfracciones. En la subfracción tres se obtuvo unos cristales de color café pardo, mientras en la subfracción dos se obtuvo un precipitado de color café pardo. A la subfracción dos se le realizó una CPP bajo las mismas condiciones experimentales anteriores, obteniendo siete subfracciones. De estas últimas subfracciones, la subfracción tres se obtuvo un compuesto en forma de cristales de color café pardo. Así, la subfracción tres de ambas CCP fueron muy similares, por lo que se reunieron en una sola fracción, obteniendo unos cristales de color café pardo, que fue identificado como el rotenoide 12a-hidroxi paquirizona.

Fracción 56-69 pp. Se reunieron por similitud cromatográfica las fracciones 56-59 (figura 4). Esta fracción reunida tuvo un precipitado y un sobrenadante. El precipitado se presentó en forma de polvo blanco, pero con algunas impurezas, tal como se observa en el cromatofolio (figura 5). Para la purificación del precipitado, se realizó una CC (FM: hexano/AcOEt) obteniendo 18 fracciones de 25 mL cada una. Se puede observar en el cromatofolio (figura 6) la subfracción 13 (enmarcada en cuadro blanco), que corresponde a un precipitado en forma de polvo blanco, pero aún presentaba ciertas impurezas.



Figura 6. CCF de la subfracción 13 (en recuadro blanco), el cual precipitó en forma de polvo blanco aun con ciertas impurezas.

Para la purificación de esta última subfracción se decantó este precipitado obteniendo un precipitado y un sobrenadante. El precipitado se limpió con acetona; posteriormente el precipitado, y ya sin impurezas, se obtuvo un precipitado blanco, que fue identificado como la isoflavona dehidroneotenona.

Fracción 56-59 sb. Se reunieron por similitud cromatográfica las fracciones 56- 59 (figura 4). Estas fracciones reunidas tuvieron un precipitado y un sobrenadante (figura 5). En este caso, se procedió a trabajar con el sobrenadante.

Posteriormente, se realizó una CC (FM: hexano/AcOEt) al sobrenadante de la fracción 56-59 obteniendo en total 26 fracciones de 25 mL cada una observándose que la subfracción 25 (figura 7) precipitó en forma de polvo blanco al parecer con cierta impureza, la cual, sin embargo, no se hace notar en el cromatofólio.

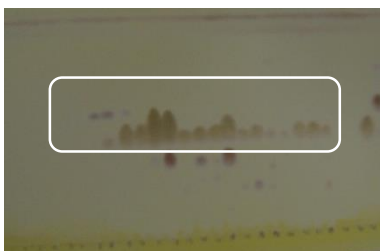


Figura 7. CCF de las 26 subfracciones obtenidas del sobrenadante de la fracción 56-59. En la mayoría de la subfracciones se obtuvieron unos cristales de color naranja, que correspondían a la paquirizina.

En la mayoría de las subfracciones se obtuvo un compuesto de color naranja, el cual fue identificado como paquirizina (figura 7). Mientras en las fracciones 15, 16, 18 y 20 (figura 8) se reunieron por similitud cromatográfica, y posteriormente se le realizó una CCP fase normal (FM: CH₂Cl₂ 100% eluyendo dos veces, observadas bajo luz UV=254 nm) obteniendo cinco subfracciones. La subfracción cuatro precipitó un polvo de color blanco identificado como rotenona (figura 8).

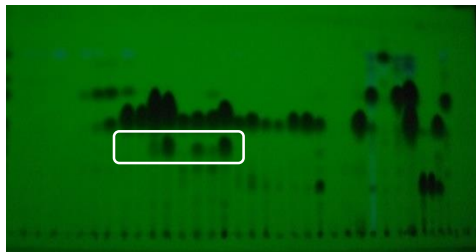


Figura 8. CCF de las 26 subfracciones obtenidas del sobrenadante de la fracción 56-59. Enmarcadas en recuadro blanco se observan cuatro subfracciones con la presencia de un analito, que corresponde a la rotenona (UV= 254 nm).

Aislamiento del rotenoide erosona

Posteriormente, y debido a que los compuestos previamente purificados eran insuficientes para realizar los ensayos biológicos, se procedió la purificación de los compuestos antes mencionados de las semillas de *P. erosus* a partir de 2.29 Kg de semillas adquiridas en la tienda “El Semillero”. Se trituraron en un molino de semillas; posteriormente se maceraron en hexano y en acetona, respectivamente. Enseguida, se eliminó el solvente mediante la acción de un rotoevaporador obteniéndose 100.59 g de extracto crudo de acetona de las semillas de *P. erosus*, el cual se procedió a fraccionarlo. Para ello se usó la técnica de cromatografía en columna (CC) (sílica gel malla 70-230; fase móvil: hexano-AcOEt), de la cual se obtuvieron 60 fracciones (figura 9). De este fraccionamiento se obtuvieron los mismos compuestos antes mencionados (rotenona, dolineona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona y 12a-hidroxi paquirizona); además se logró obtener el rotenoide erosona, el cual no había sido aislado previamente.

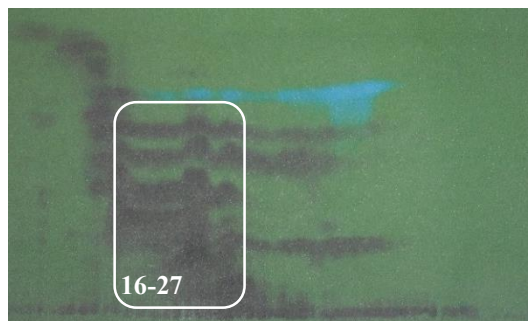


Figura 9. Fracciones obtenidas del segundo extracto de las semillas de *P. erosus*. En recuadro blanco se señalan las fracciones reunidas 16-27 (UV= 254 nm).

De estas fracciones reunidas se obtuvo un precipitado y un sobrenadante, este último en forma de polvo blanco, aunque mostraba ciertas impurezas, por lo que se realizó una CCP (FM: dicloro-metano 100%, eluyendo dos veces y observadas bajo luz UV=254 nm), obteniendo 11 subfracciones. La subfracción 8 se obtuvo un precipitado en forma de polvo blanco, correspondiendo al rotenoide erosona (figura 10).

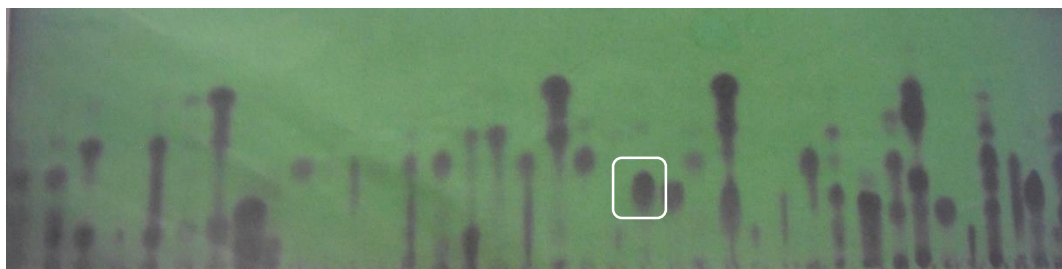


Figura 10. CCF de compuestos aislados de manera simultánea de las semillas de *P. erosus*. Enmarcado en recuadro blanco aparece la erosona (UV= 254 nm).

Análisis químico de los extractos de hojas y semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* mediante la técnica HPLC-UV-EM

Separación mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector UV (CLAR/UV)

Se utilizó un Instrumento YL CLAR-DAD (cromatógrafo de líquidos de alta resolución) (Gyeonggi-do, Corea) que consiste en una bomba binaria (YL9111S), un desgasificador, un compartimiento automático de columna termostática, un detector de diodos (DAD) y un ordenador con el software Clarity versión 5.0.5.98 (DataApex LTD, República de Checoslovaquia), esto para el análisis de los datos arrojados en el CLAR. Se usó una columna

Kromasil 100-5C18 (25 cm × 4,6 mm) (Eka Chemicals AB, Suecia). La columna se lavó con acetonitrilo (100%) durante 5 min, para estabilizar las condiciones iniciales. La lectura de los compuestos fue bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 244 nm. Se usó como estándar externo los siguientes compuestos aislados: rotenona, paquirizina, paquirizona, erosona, dolineona y dehidroneotenona. La columna se utilizó a temperatura ambiente.

La fase móvil consistió en acetonitrilo (bomba A) y agua (con ácido acético al 0.1%; bomba B). Los solventes fluyeron bajo las siguientes concentraciones: 48% (bomba A) y 52% (bomba B). El tiempo de la corrida duró 40 min. La velocidad de flujo fue 1.0 mL/min. La concentración del extracto y compuestos fue de 1,000 ppm, del cual se tomó 20 µL inyectándose al puerto de inyección del CLAR.

Análisis CLAR / ESI-EM

Para el experimento del análisis de los extractos de las semillas y hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* se usó el Cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas, mediante la técnica de electro pulverización en modo ión positivo (CLAR/ESI-EM; expresión Advión detector CMS; Advión Ithaca, Nueva York, EE.UU.). Se usó el modelo CMS expresión versión S, el cual detecta moléculas de un rango de 0 a 1,200 m/z , presentando un escaneo rápido de masas (10,000 m/z unidades/s). Igualmente presenta un analizador de masas cuadrupolo. Usa como complemento una bomba de paleta rotativa Edward RV12 y un sistema de calibración del sistema mediante una solución de mezcla de alcanos de cadena larga. Las condiciones experimentales en el sistema CMS-S fueron las siguientes: modo de ión positivo, escaneo de la molécula usando el modo de seguimiento de iones (SIM), gas de colisión, nitrógeno de alta pureza (N_2) a 80 psi, gas nebulizador (N_2), presión pirani 0.00639 torr, velocidad turbo 99.4%, temperatura de capilar: 253 °C, temperatura del gas fuente: 22 °C, voltaje del capilar: 151.3 °C; voltaje de la electropulverización: 4.03 kV, voltaje de dinodo: 10.07 V, voltaje del detector de -1.22 kV. El software usado fue Clarity versión 5.0.5.98 (DataApex LTD, República de Checoslovaquia).

Ensayos Biológicos

Bioensayo para la actividad insecticida contra larvas de Drosophila melanogaster

El bioensayo para la actividad insecticida de extractos y compuestos de *P. ferrugineus* y *P. erosus* se llevo a cabo en larvas de *D. melanogaster* (Diptera) de la siguiente manera. Para determinar la concentración letal media (CL₅₀) se prepararon cinco concentraciones experimentales (5, 25, 50, 70 y 100 ppm) disueltas en 3 mL de dieta artificial (figura 11). Los compuestos del ensayo fueron los extractos de acetona y AcOEt, tanto de las semillas como de las hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*, respectivamente. De igual manera, se probaron los compuestos: rotenona, paquirizina, paquirizona, dolineona, erosona y dehidroneotenona, los cuales habían sido previamente disueltos en la dieta. Para esto, los compuestos se disolvieron en etanol y se mezclaron en 3 mL de medio de cultivo artificial [levadura de cerveza granulada (5 g), glucosa (22 g), agar (8 g), ácido propiónico (0.5 mL), nitrato de sodio (2.1 g), nitrato de potasio (2.1 g), cloruro de potasio (0.35 g), fosfato de potasio (0.35 g), sulfato de hierro (0.00625 g)]. Estos ingredientes se disolvieron en 500 mL de agua destilada y fueron agitados mediante una placa de agitación, a una temperatura de 80 °C, durante 15 m. Finalmente, se dejaron enfriar a las cajas Petri con la dieta a temperatura ambiente durante 24 h, esto con el fin de que se evaporara el etanol de la dieta.

Para obtener el pie de cría de *D. melanogaster* se introdujeron 20 moscas adultas en un frasco de cultivo que contenía la dieta artificial. Se dejó ovopositar a las hembras y posteriormente eclosionaron como larvas, esto en una cámara de cultivo de insectos a una temperatura de 25 °C, con una humedad relativa > 60% durante 10 días. Después se tomaron 10 larvas del primer estadio y se sembraron en cada caja Petri (3 mL) previamente disueltas los tratamientos con el medio de cultivo. Estas cajas fueron mantenidas en la cámara de incubación a una temperatura de 25 °C y con una humedad relativa > 60%. El experimento tuvo una duración de 72 h, tomando la sobrevivencia de las larvas hacia los compuestos cada 24 h. La CL₅₀ se determinó mediante análisis log probit (Alarcón *et al.*, 2013). Se realizaron tres experimentos diferentes con tres réplicas por tratamiento, con 10 organismos por caja.

Bioensayo para la actividad insecticida contra larvas de Plodia interpunctella

Las larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad (14:10 h), a una temperatura en incubación de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $55\% \pm 10\%$. La crianza de *P. interpunctella* se efectuó agregando 30 g de dieta artificial (a base de trigo molido, fibra de trigo, germen de trigo, levadura, miel, glicerina y agua) en un recipiente de plástico previamente lavado. La dieta se cubrió con una tela porosa de manera que permitiera la entrada de oxígeno, pero al mismo tiempo evitara que las larvas salieran del frasco. Dos semanas después, y ya que las larvas habían alcanzado el tercer o cuarto estadio larvario, se tomaron y se colocaron tres larvas (figura 11) en las cajas Petri preparadas con el medio de cultivo usado en *D. melanogaster*, en el cual estaban disueltas los compuestos. Las concentraciones experimentales fueron: 5, 25, 50, 70 y 100 ppm. Las cajas Petri fueron mantenidas en la cámara de incubación a una temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $55\% \pm 10\%$. Se mantuvieron durante 72 h, registrando la mortalidad de los compuestos cada 24 h. La CL_{50} se determinó mediante por análisis log probit (Alarcón *et al.*, 2013; Rubio Cota, Tesis, 2012). El ciclo de vida de *P. interpunctella* es de aproximadamente 30 días. Se realizaron tres experimentos diferentes con tres réplicas por experimento, con tres organismos por caja.



Figura 11. Preparación del alimento con las concentraciones experimentales de los extractos y compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus*. Ensayos realizados en *D. melanogaster* y *P. interpunctella*.

Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas

Se calculó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) en cinco líneas tumorales humanas: HeLa (línea celular tumoral humana cervicouterina), LNCap (línea celular de adenocarcinoma de próstata humano sensible a andrógenos), K562 (línea de células de leucemia humana), PC-3 (línea celular de cáncer de próstata en humanos), SKLU-1 (línea celular de adenocarcinoma humano). Estas líneas celulares humanas se evaluaron en los extractos de acetona y/o AcOEt de las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*, respectivamente. Así también se evaluaron a los siguientes compuestos, previamente aislados: rotenona, paquirizina, dolineona y 12a-hidroxi paquirizona.

Las líneas celulares K562, PC-3, HeLa, SKLU y LNCap se cultivaron en un medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (10%), inactivado por calor. Se le agrego lo siguiente: 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de sulfato de estreptomicina y 0.25 anfotericina B (Invitrogen Carlsbad, CA, EE.UU.). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ (González-Sánchez *et al.*, 2011).

La citotoxicidad de los extractos y compuestos se evaluaron en células tumorales humanas mediante el ensayo colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], en tres experimentos independientes. Para esto, las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos, a una concentración de 7×10^3 células/pozo. Cada pozo contiene 200 μ L de medio de cultivo. Después de 24 h, las células fueron tratadas a diferentes concentraciones del extracto de acetona de las semillas de *P. ferrugineus* y *P. erosus*, así como de los compuestos rotenona, paquirizina, dolineona, y 12a-hidroxi paquirizona. Estos tratamientos fueron disueltos en el vehículo de administración DMSO (dimetil sulfóxido), en un volumen por pozo de 50 μ L. Así, se obtuvo un volumen total de 250 μ L con la concentración final indicada. La viabilidad celular se determinó 48 h más tarde, momento en el cual se retiró el medio y se agregó a cada pozo 20 μ L de una solución preparada de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), a una concentración de 2.5 mg/mL, en un

medio PBS, pH de 7.2. Después de 2 h, se retiró el MTT y se añadieron 200 μ L de DMSO a cada pozo, seguido por una agitación suave para homogeneizar la solución en cada pozo. Finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm utilizando el aparato Synergy® 2 Multi-Mode lector de microplacas, BioTek® (BioTek, Winooski, VT, EE.UU.). La cantidad de formazán detectada es proporcional al número de células vivas, y la inhibición del crecimiento celular se determinó por la fórmula:

Inhibición del crecimiento celular (%) = $(1 - \text{absorbancia de células tratadas} / \text{absorbancia de células no tratadas}) \times 100$.

Los datos presentados son el resultado de tres experimentos independientes con seis repeticiones por cada grupo experimental. Los valores de concentración inhibitoria media (CI₅₀) del crecimiento celular se determinó a partir de curvas de inhibición de concentración/viabilidad utilizando una regresión no lineal (constante de Boltzman) con el software OriginPro 7.0®; (OriginLab, Northampton, MA, EE.UU) (González-Sánchez *et al.*, 2011).

Ensayos de genotoxicidad

Electroforésis de células en gel de agarosa (ensayo cometa)

Las células cancerígenas de leucemia humana K562 se sembraron en placas de caja Petri de 60×15 mm (Corning) en un número de 2×10^4 células por placa y se trataron con rotenona, a una concentración previamente evaluada (13.05 μ M), durante 1, 3 y 12 h. El peróxido de hidrógeno (10%) se utilizó como control positivo (durante 15 m), ya que produce rompimiento en la doble cadena de ADN, aun a concentraciones milimolares (Visnja *et al.*, 2009). El ensayo cometa (version alcalina) se realizó de acuerdo a Singh *et al.* (1988). Brevemente, después del tratamiento con la rotenona las células fueron separadas, mediante una solución quelante (EDTA). Posteriormente, se tomaron 2 mL de esta suspensión y se homogeneizó con 300 μ L de gel de una agarosa de bajo punto de fusión (0.8 %), en un portaobjetos y se dejó enfriar hasta que el gel solidificó. Enseguida, se embebió en una solución de lisis (2.5 mol de NaCl₂, Na₂EDTA 100 mM, 1% de Triton X-100 y 10% DMSO),

dejándose unos 5 minutos. Después, se lavó el gel en cinco ocasiones en una solución amortiguadora (Buffer 1X). Posteriormente, en una cámara de electroforesis se vertió una solución tampón (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA pH 13.0, 4 °C), para enseguida introducir el gel de agarosa. La electroforesis se llevó a cabo a 300 mA durante 20 min. Luego se retiró el gel de agarosa y se embebió en una solución tampón de neutralización (0.4 M Tris-HCl a pH 7.5), en tres ocasiones durante 15 min para cada ocasión. Enseguida, los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 5 min antes de la tinción con 5 µL de gel red (1:50,000). Las microfotografías de los cometas se visualizaron y se fotografiaron usando un microscopio de fluorescencia de acuerdo a Lu *et al.* (2010). La medida del porcentaje de daño al ADN se determinó como el momento de la cola (cola de ADN%) y se determinó por la fórmula: 100-(% de la cabeza del ADN) (Barjhoux *et al.*, 2012). Para el procesamiento de imágenes se utilizó el software J-image (Russ, 1995).

Efecto de la rotenona en el plásmido pDEST26

Se cultivaron las células K562 junto a dos concentraciones de rotenona (13.05 y 130 µM) durante 48 h. Se usó como vehículo el solvente DMSO (0.28%). Como control positivo se utilizó el reactivo de Fenton (30 mM de H₂O₂, ácido ascórbico 50 nM y 80 nM de FeCl₃), así como la endonucleasa Eco RI (cat. 10703737001, Roche) (Athar *et al.*, 2011). Se mezclaron, de manera separada 0.5 µg de ADN del plásmido pDEST26 en un tubo de 200 mL. Posteriormente se vertió a cada tubo 12 µL de agua libre de DNasa/RNasa y se incubó durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se insertó el plásmido en un gel de poliacrilamida y se realizó una electroforesis a 80 V durante 2 h. Enseguida, el gel se tiñó con la solución gel rojo (0.5µg/L). El ADN se visualizó con un transiluminador de UV utilizando el software Biomaging (UVP) y se fotografió con el sistema Gel Doc (ultravioleta productos [UVP] Ltd, Cambridge, Reino Unido).

Evaluación de la apoptosis

Ensayo de TUNEL

La muerte celular fue evaluado mediante el ensayo TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) (fluorescein®, Roche GmbH Mannheim, Alemania), en células K562. Para ello se incubaron las células (K562) con la rotenona (13.05 μ M) durante 48 h. Posteriormente, las células fueron fijadas con ácido acético a 20 °C, y después se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL durante 1 h a 37 °C. Las muestras fueron lavadas con PBS tres veces y se analizaron por microscopía de fluorescencia, usando un microscopio Nikon E600 con una cámara digital (Nikon, Melville, NY).

Inmunocitofluorescencia

Para confirmar si existe citotoxicidad por muerte celular tipo apoptosis se evaluó mediante la actividad de la enzima caspasa-3. Para ello, se incubaron en caja Petri las células K562 (5×10^5) durante 24 h con la rotenona (13.05 μ M), taxol (25 nM) y DMSO (0.28%). Después, las células se sembraron en placas de caja Petri con cubreobjetos estériles. Luego, se fijaron con paraformaldehído (PFH) al 4% durante 30 m (4 °C). Posteriormente, se retiró el PFH y las células se lavaron tres veces con solución TBS (6.05 g de Tris, 8.76 g de NaCl, en 800 mL de agua destilada y ajustar a pH 7.6) con 0.1% de Tween. Enseguida, las células se permeabilizaron con una solución (0.1% Tritón X-100, 0.1% de Tween en solución TBS) durante 1 h, para después bloquear la reacción con albúmina de suero bovino (5%; BSA) durante 1 h. Las células se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 (forma activa) (1: 250) (3015-100, BioVisión) a 4 °C durante toda la noche. Se incubó en la oscuridad durante 1 h el anticuerpo secundario de conejo Alexa Fluor 546 anti-IgG (A11030; 1:500; Invitrogen, Grand Island, NY). Los cubreobjetos se montaron utilizando el medio de montaje 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las muestras fueron observadas en un microscopio Nikon E600 con una cámara digital (Nikon, Melville, NY). Los experimentos se realizaron por triplicado. Los cubreobjetos sin anticuerpo primario se procesaron en paralelo como controles negativos. Como control positivo fue el terpeno taxol (25 nM). Para procesar las imágenes se utilizó el software de libre acceso j-image.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como media aritmética con desviación estándar. Para saber si es una prueba paramétrica se utilizó la prueba de Levene ($P < 0.05$). Posteriormente se utilizó la prueba paramétrica Analisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Todos los datos fueron procesados utilizando GraphPad Prism ® Software versión 5.00.28 (San Diego, EE.UU., 2007).

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento e identificación de compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.

De las semillas de *P. erosus* se aislaron siete isoflavonoides. De éstos, cinco fueron rotenoides: rotenona (**1**), paquirizona (**3**), dolineona (**5**), erosona (**6**) y 12a-hidroxi paquirizona (**7**), una 3-aryl-coumarina: paquirizina (**2**) y una isoflavona: dehidroneotenona (**4**); todo estos fueron identificados por RMN¹H (figura 14-20). Las señales se compararon por las previamente reportadas (Blaskó *et al.*, 1989; Phrutivorapongkul *et al.*, 2002 y Leuner, *et al.*, 2013). De los cinco rotenoides aislados el más conocido es la rotenona. Todo rotenoide tiene como unidad estructural un sistema de cuatro anillos (A, B, C y D) formados por la fusión de un núcleo de cromano (A, B) con el núcleo de la cromanona (C, D) (figura 12). Dependiendo del grado de oxidación del esqueleto cromano-cromanona estos compuestos se clasifican en: rotenoides (carbonos 6a y 12a saturados), 12a-hidroxirotenuoides (hidroxilo en 12a) y dehidrotenuoides (doble enlace en 6a, 12a).

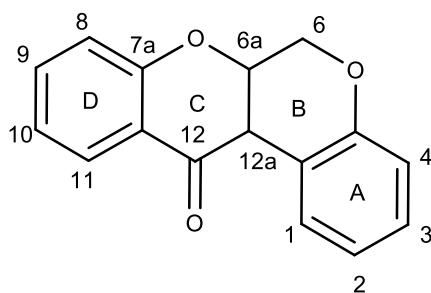


Figura 12. Esqueleto básico de un rotenoide

Para el caso de la rotenona (**1**) en su espectro de RMNP se observaron dos señales en 3.76 d (J=3.5 Hz) y 4.68 s --ancho- para el H-12a, así como dos señales en 4.61 dd y 4.17 dd para dos hidrógenos de un metileno H-6, las cuales en conjunto indicaron la presencia de los anillos A, B, C y D de un rotenoide. El anillo D está substituido por un anillo derivado de un grupo isoprenilo sobre los C-8 y C-9. El anillo A está substituido por dos metoxilos como lo indican dos señales simples en 3.78 y 3.75 ppm.

La erosona (**6**) mostró las señales características para los protones de los anillos A, B, C y D, antes indicadas para un rotenoide, pero el substituyente en el anillo D sobre C-9 y C-10 es

un furano como lo indican dos señales en 7.70 (d, J=3 Hz) y 6.83 (d, J= 2.2 Hz). La paquirizona (**3**) mostro señales similares a la de la erosona, pero el anillo A esta substituido por un grupo metilendioxi como lo indican las señales en 5.80 y 5.84 d (J =1.4 Hz, 1H c/u) y el anillo D por un grupo metoxilo en C-8 (4.14 s, 3H). La 12a-hidroxiapaquirizona (**7**) mostro un espectro similar al del compuesto **3**, pero no se observó el H-12a que para el compuesto **3** aparece en 3.89 ppm (d, J=4), indicando que en esta posición está substituido por un grupo hidroxilo. Los espectros de los rotenoides: rotenona (**1**), paquirizona (**3**), dolineona (**5**), erosona (**6**) y 12a-hidroxiapaquirizona (**7**), son similares a las reportados por Phrutivorapongkul *et al.*, 2002 y Leuner, *et al.* 2013.

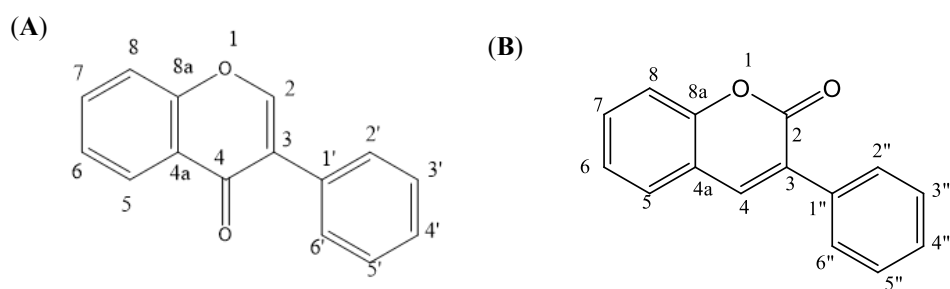
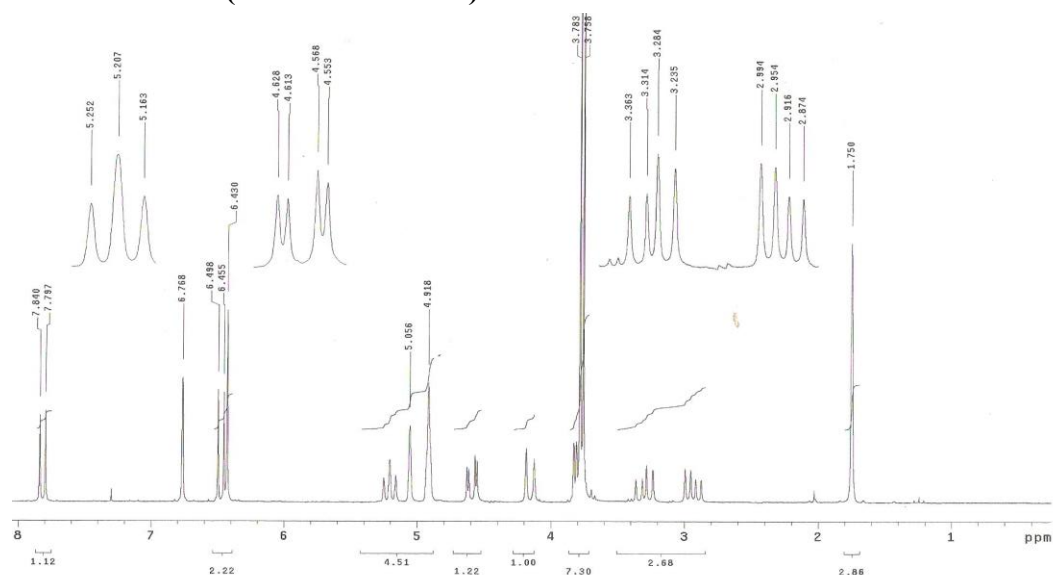


Fig. 13 Esqueletos de una (A) isoflavona y (B) 3-aryl coumarina

Las isoflavonas poseen un anillo aromático como substituyente sobre el C-3 (figura 13) y por lo tanto presentan un hidrógeno vinílico en C-2. El espectro del compuesto (**4**) indicó que se trataba de la isoflavona dehidroneotenona pues mostro una señal para un H vinílico sobre el C-2 ($\delta = 8.01$ ppm), así como 4 señales simples para 4 H aromáticos. Este compuesto esta substituido por un metoxilo en 3.74 (s, 3H) y un metilendioxi 5.97 (s, 2H) sobre el anillo C, así como por un furano en el anillo D. Finalmente la paquirizina (**2**) presento señales similares con excepción de la señal simple para el H en C-2, ya que la paquirizina presenta un carbonilo en la misma posición, indicando se trata de una 3-aryl coumarina (figura 13). Las señales para estos compuestos son semejantes a las reportadas por Phrutivorapongkul *et al.* (2002).

Rotenona (fracción 56-59 sb)



carbón	**aislado	*reportado
1	6.76 (s)	6.71 (s)
4	6.49 (s)	6.48 (s)
6	4.61 (dd, J= 9, 3) 4.16 (d)	4.61 (dd, J=12.2, 2.5) 4.17 (bd, J= 2.2)
6a	4.61 (dd, J= 3, 12 Hz)	4.68 (bs)
12a	3.75 (d, J=5)	3.76 (d, J=3.5)
10	6.43 (d, J= 8.6)	6.43 (d, J=8.5)
11	7.79 (d, J= 8.6)	7.76 (d, J= 8.5)
4'	3.31 (dd, J= 9.8, 6) 2.91 (dd, J= 8.4, 7.6)	3.30 (dd, J=15.5, 8.2) 2.92 (dd, J=15.5, 8.0)
5'	5.20 (t, J= 8.8)	5.21 (t, J= 9.2)
7'	5.05 (s) 4.91 (s)	5.01 (s) 4.88 (s)
8-Me	1.75 (s)	1.70 (s)
MeO	3.78 (s)	3.73 (s)
MeO	3.75 (s)	3.70 (s)

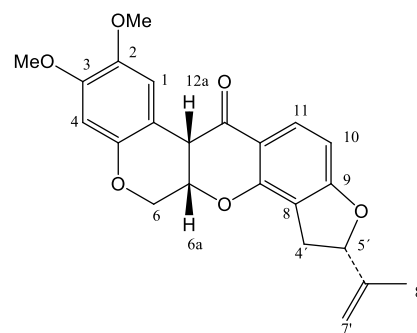
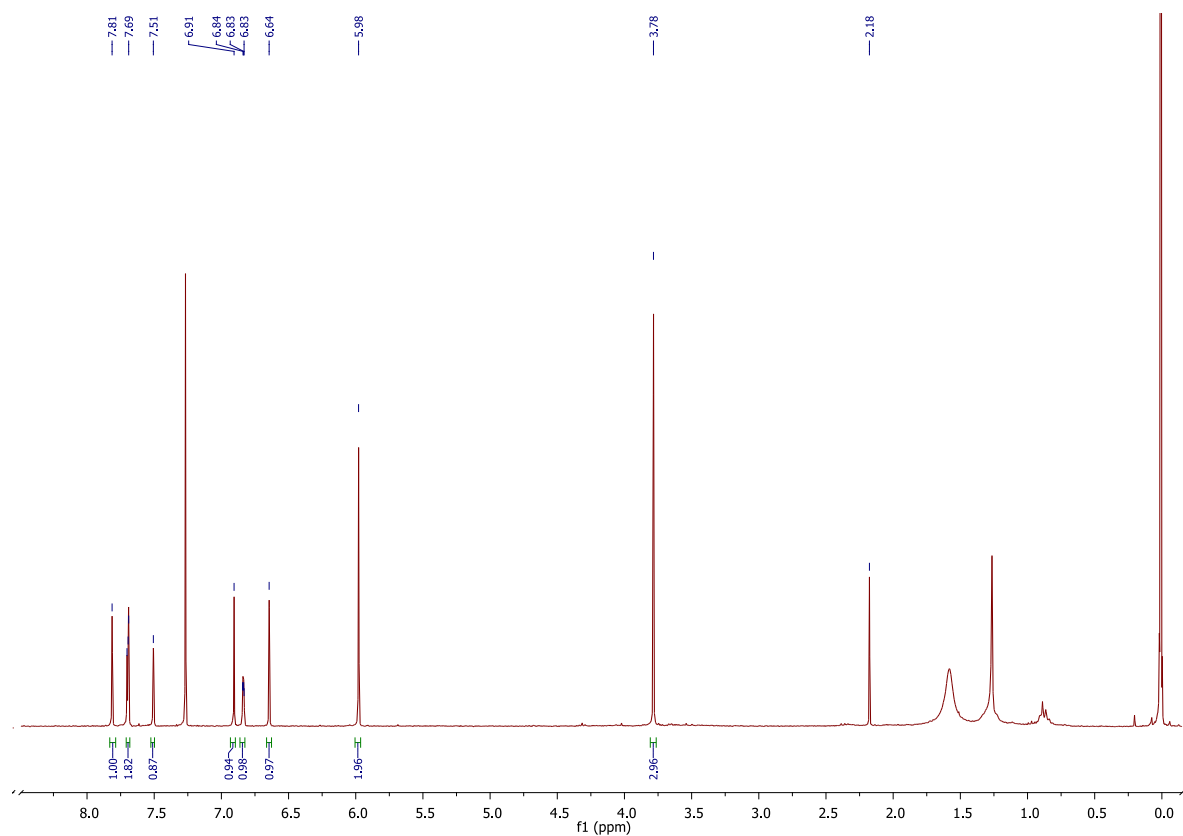


Figura 14. Datos de RMN ^1H de la rotenona. Las señales se compararon con lo previamente reportado

*Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

Paquirizina (fracción 56-59 sb)



carbón	**aislado	*reportado
4	7.81 (s)	7.80 (s)
5	7.69 (s)	7.68 (s)
8	7.50 (s)	7.49 (s)
2'	7.70 (s)	7.69 (d, J= 2.2)
3'	6.83 (d, J= 2.2)	6.82 (d, J= 2.2)
3''	6.64 (s)	6.63 (s)
6''	6.90 (s)	6.89 (s)
OMe	3.78 (s)	3.77 (s)
OCH ₂ O	5.96 (s)	5.96 (s)

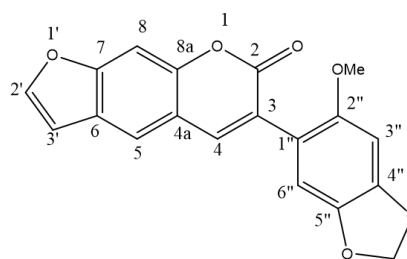
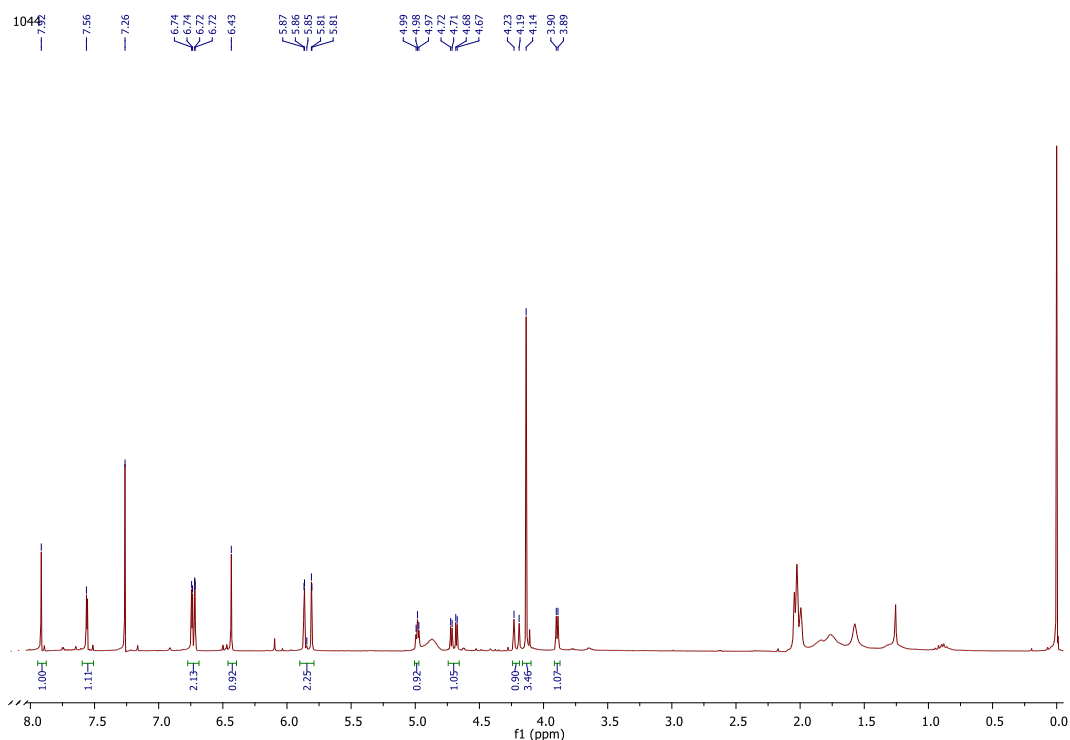


Figura 15. Datos de RMN¹H de la paquirizina. Las señales se compararon con lo previamente reportado *Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

Paquirizona (Fracciones 43-48 y 49-55)



carbón	**aislado	*reportado
1	6.72 (s)	6.71 (s)
4	6.43 (s)	6.42 (s)
6	4.19 (d, J= 12)	4.20 (d, J= 11.9)
	4.67 (dd, J=12, 3.4)	4.69 (dd, J=12.1, 2.4)
6a	4.97 (t, J=3.2, 1)	4.97 (dd, J=3.8, 3.5)
11	7.92 (s)	7.91 (s)
12a	3.89 (d, J= 4)	3.88 (d, J=3.8)
2'	7.56 (d, J= 2.3)	7.55 (d, J= 2.2,)
3'	6.74 (d, J= 2.2)	6.73 (d, J=2.2)
OMe	4.14 (s)	4.13 (s)
OCH ₂ O	5.80 (d, J= 1.4)	5.80 (d, J= 1.1)
	5.86 (d, J= 1.4)	5.85 (d, J=1.1)

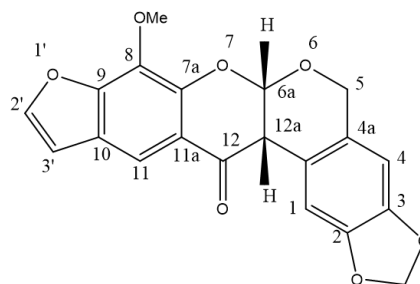
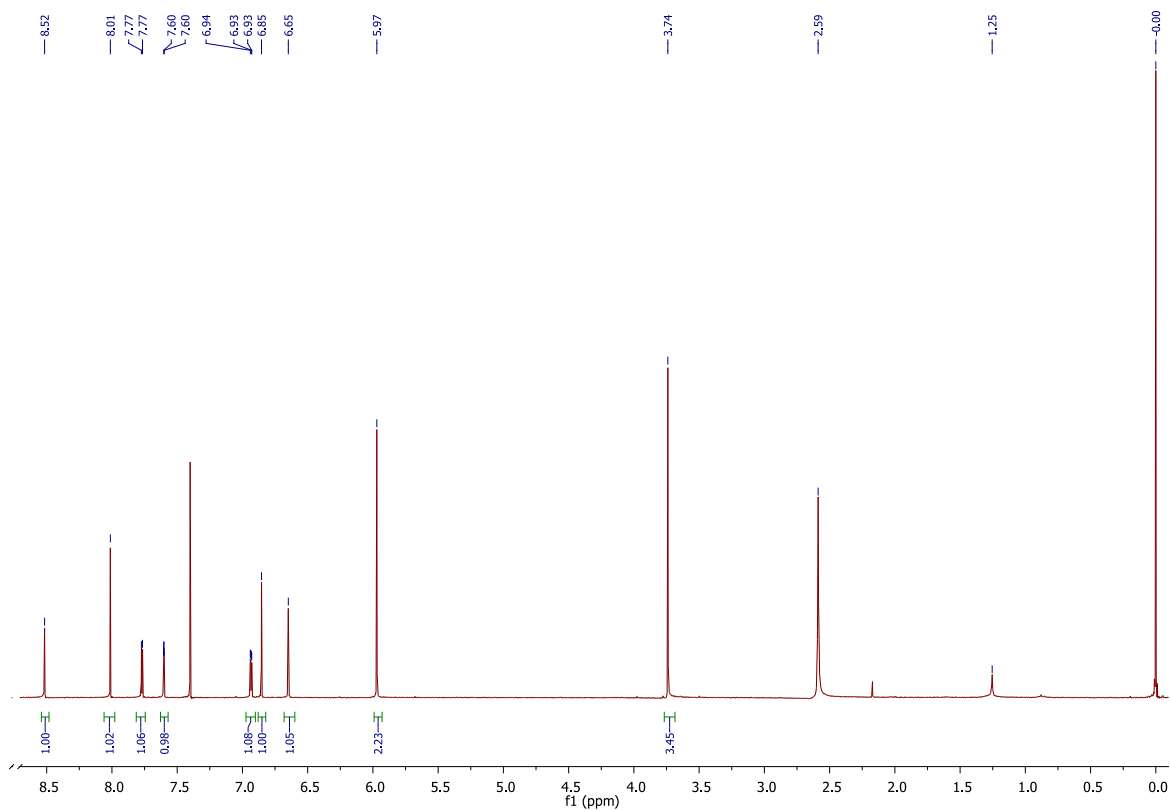


Figura 16. Datos de RMN¹H de la paquirizona. Las señales se compararon con lo previamente reportado *Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

Dehidroneotenona (fracción 56-69 pp)



carbón	**aislado	*reportado
2	8.01 (s)	7.98 (s)
5	8.52 (s)	8.54 (s)
8	7.60 (s)	7.57 (s)
2'	7.77 (d, J= 3)	7.77 (d, J= 2.2)
3'	6.93 (d, J= 3)	6.91 (d, J= 2.2)
3''	6.65 (s)	6.63 (s)
6''	6.85 (s)	6.85 (s)
OMe	3.74 (s)	3.73 (s)
OCH ₂ O	5.97 (s)	5.96 (s)

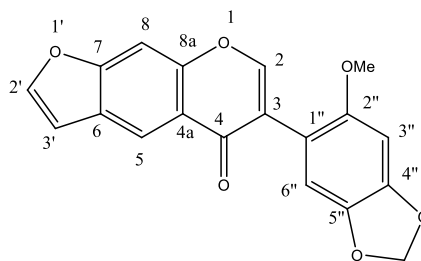
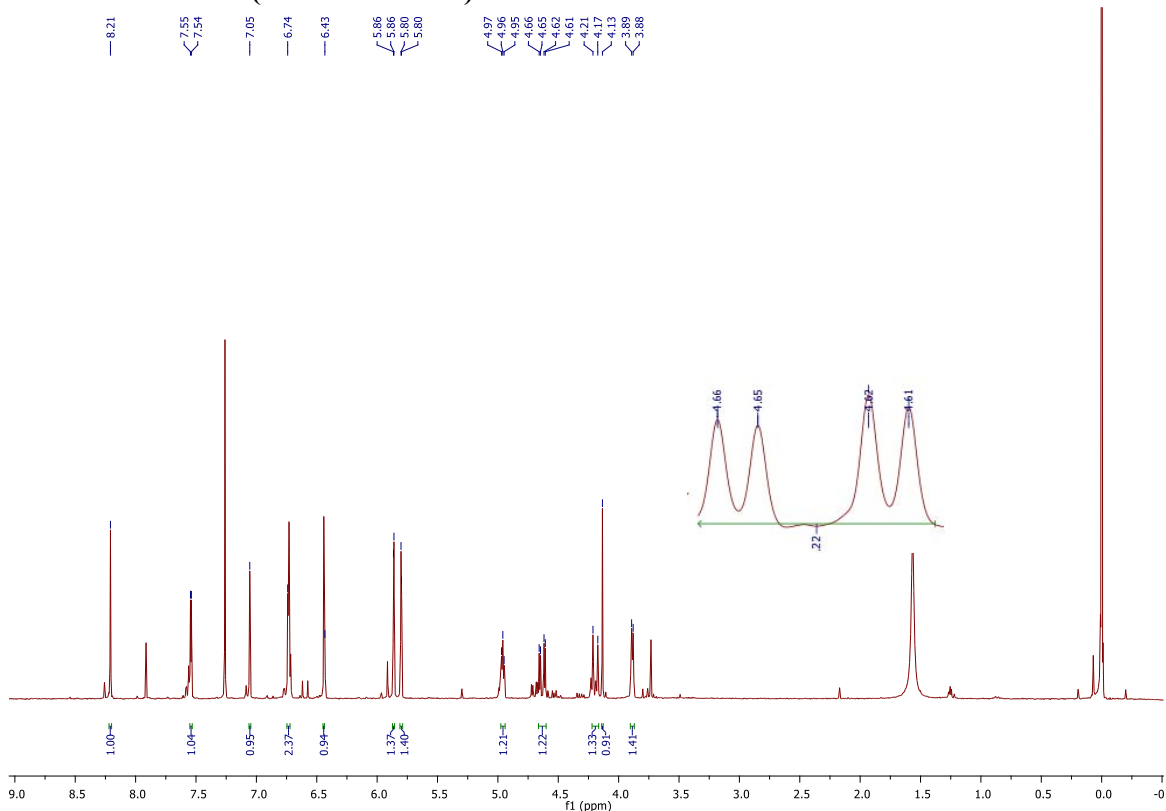


Figura 17. Datos de RMN¹H de la dehidroneotenona. Las señales se compararon con lo previamente reportado *Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

Dolineona (Fracción 34-38)



carbón	**aislado	*reportado
1	6.74 (s)	6.72 (s)
4	6.43 (s)	6.45 (s)
6	4.17 (d, J= 12)	4.19 (d, J=12)
	4.61 (dd, J= 12, 3)	4.64 (dd, J=12,3)
6a	4.95 (t, J= 3)	4.96 (dd, J=4,3)
8	7.05 (s)	7.06 (d, J=1)
11	8.21 (s)	8.21 (s)
12a	3.88 (d, J= 3)	3.89 (d, J=4)
2'	7.54 (d, J= 3)	7.54 (d, J=2.5)
3'	6.74 (d, J= 3)	6.73(dd, J=2.5,1)
OCH ₂ O	5.80 (s)	5.81 (d, J= 1.3)
	5.86 (s)	5.87 (d, J= 1.3)

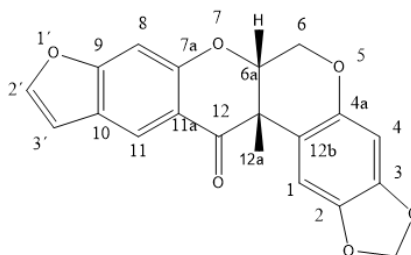
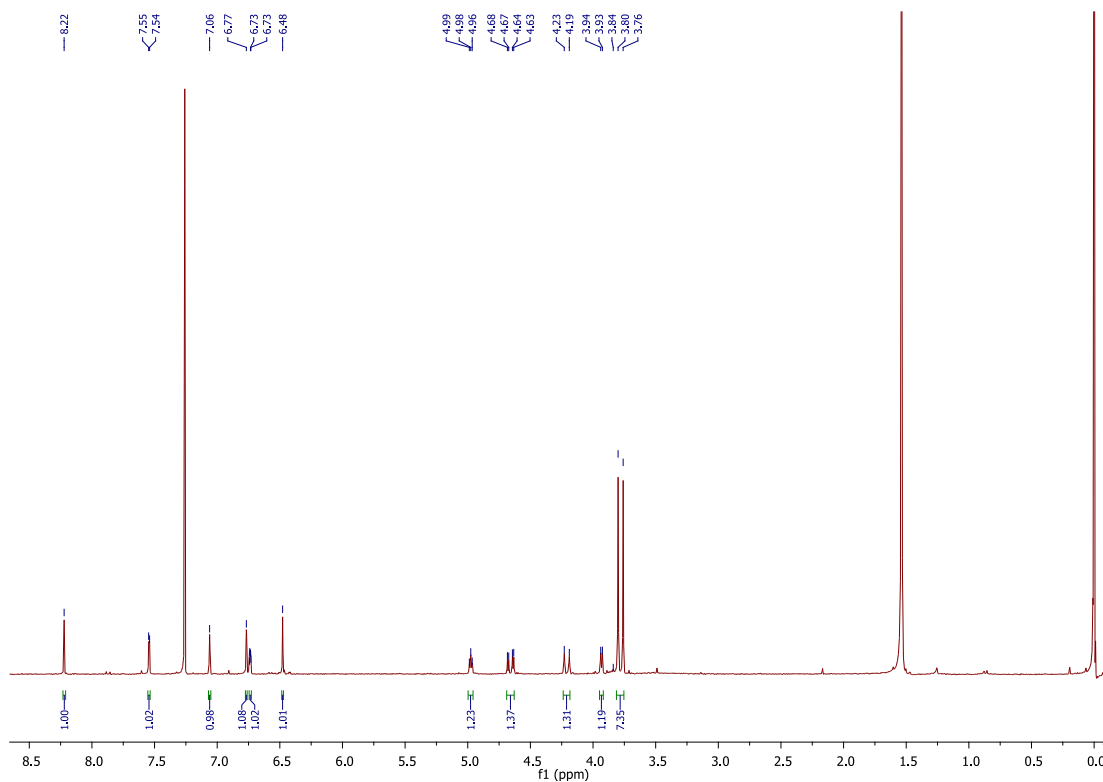


Figura 18. Datos de RMN¹H de la dolineona. Las señales se compararon con lo previamente reportado

*Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

Erosoña (fracción 16-27)



carbón	**aislado	*reportado
1	6.48 (s)	6.48 (s)
4	6.77 (d, J=3)	6.76 (d, J=1.1)
6	4.67 (dd, J= 9; 3)	4.67 (dd, J=12.1, 25)
	4.23 (d, J= 12)	4.22 (dt, J=12.1; 1.1; 0.9)
6a	4.98 (t, J= 6, 3)	4.98 (ddd, J=4; 3.1; 1.1)
8	7.06 (s)	7.07 (d, J=1)
11	8.22 (s)	8.22 (s)
12a	3.93 (d, J= 3)	3.94 (dt, J=4; 1.1; 0.9)
2'	7.55 (d, J= 3)	7.55 (d, J=2.3)
3'	6.73 (d, J= 3)	6.74 (dd, J=2.3; 1)
OMe	3.76 (s)	3.76 (s)
OMe	3.80 (s)	3.80 (s)

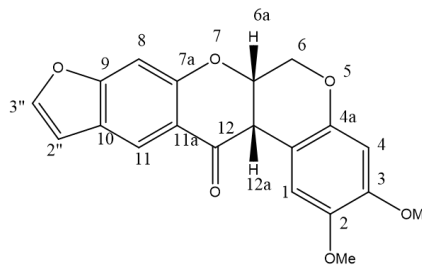
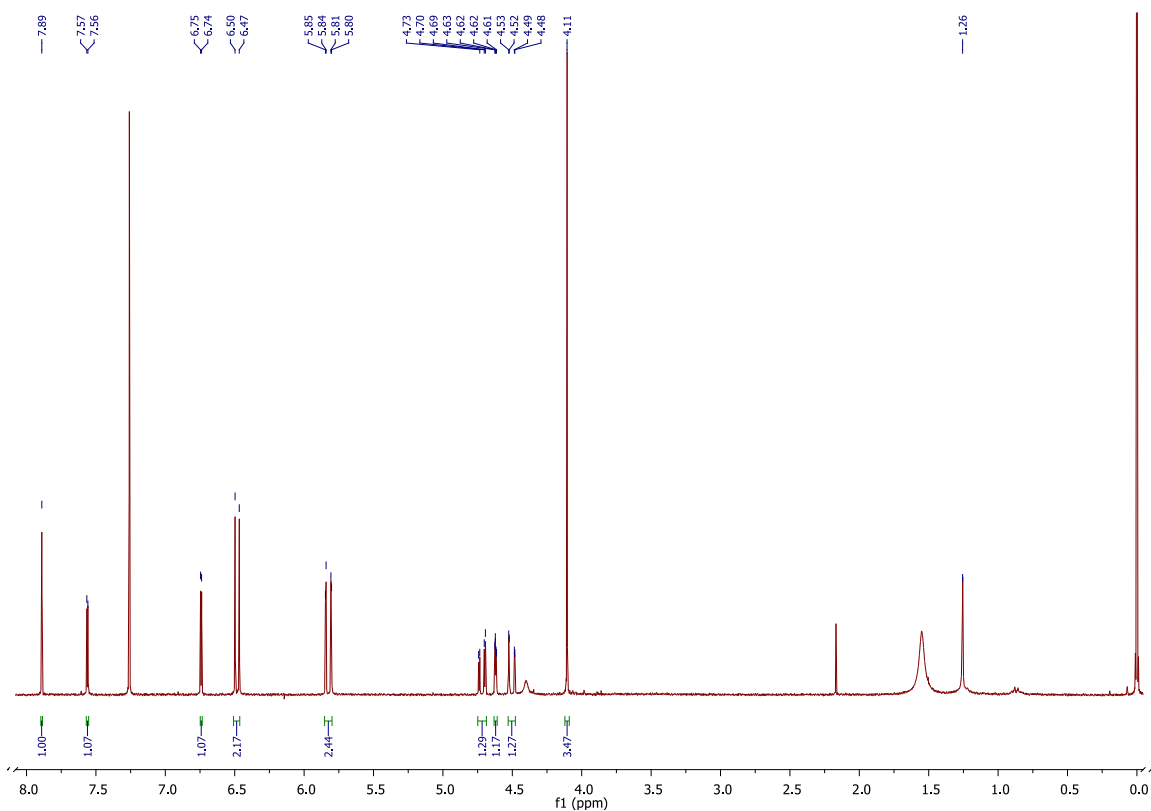


Figura 19. Datos de RMN¹H de la erosona. Las señales se compararon con lo previamente reportado
 *Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

12a-hidroxiapaquirizona (fracción 43-48 sb)



carbón	**aislado	*reportado
1	6.50 (s)	6.49 (s)
4	6.47 (s)	6.46 (s)
6	4.48 (dd; J= 12.1, 3)	4.50 (dd; J=12.1, 1)
	4.70 (dd; J=12.2, 2.5)	4.71 (dd; J=12.1, 2.4)
6a	4.62 (d, J= 3)	4.61 (dd; J=2.4, 1)
11	7.89 (s)	7.88 (s)
2'	7.56 (d, J= 3)	7.55 (d; J=2.2)
3'	6.74 (d, J= 2.3)	6.73 (d; J= 2.2)
OMe	4.11 (s)	4.10 (s)
OCH ₂ O	5.81 (d, j=3)	5.80 (d; J= 1.5)
	5.84 (d, j=3)	5.84 (d; J= 1.5)

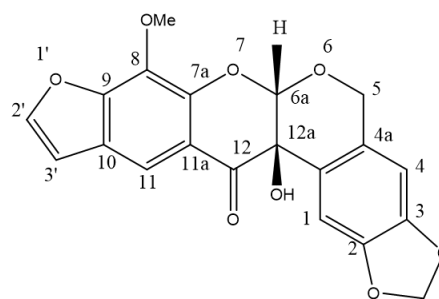


Figura 20. Datos de RMN¹H de la 12a-hidroxiapaquirizona. Las señales se compararon con lo previamente reportado *Phrutivorapongkul *et al.* (2002) (400 MHz) **Datos propios (300 MHz).

6.1.2 Análisis por CLAR/UV-ESI-EM

Nuestros resultados de CLAR/UV-ESI-EM mostraron que las semillas de *P.erosus* y *P. ferrugineus* comparten al menos seis isoflavonoides: rotenona (1), paquirizina (2), paquirizona (3), dehidroneotenona (4), dolineona (5) y erosona (6). Por otra parte, las hojas de ambas especies muestran dos compuestos en común, rotenona (1) y dolineona (5). Sin embargo, *P. ferrugineus* mostró otros isoflavonoides no presentes en las hojas de la otra especie.

A la fecha sólo se ha reportado la composición química de las semillas de *Pachyrhizus erosus*. Esta es la primera vez que se reporta la composición química de las semillas de la especie silvestre *P. ferrugineus*. De acuerdo al análisis de CLAR-UV-ESI-EM el extracto de acetona de las semillas de *P. ferrugineus* posee seis isoflavonoides: rotenona (1), paquirizina (2), paquirizona (3), dehidroneotenona (4), dolineona (5) y erosona (6) (figura 21; figura I del apéndice). Dicho extracto presentó un perfil químico similar al de las semillas de *P. erosus*, pero también se detectaron otros compuestos aún no identificados que no se encontraron en la base de datos NIST (figura 21). Queda también por determinar las diferencias cuantitativas de los isoflavonoides de ambas especies.

Solo existe un reporte previo de la química de las hojas de *P. erosus* (Duke, 1981), en el cuál se señala la presencia de la rotenona en las hojas, así como en la vaina y tallo. En este estudio, se corroboró por CLAR-UV (244 nm) que las hojas de *P. erosus* contienen rotenona pero además dolineona, la cual no había sido reportada con anterioridad.

Las hojas de *P. ferrugineus* presentaron: rotenona, dolineona, pero además con base en el cromatograma de CLAR-UV (figura 21) contienen erosona, paquirizina, paquirizona y dehidroneotenona; es decir muestra los isoflavonoides presentes en sus semillas. Es claro que la especie silvestre (*P. ferrugineus*) sintetiza más compuestos que la especie cultivada (*P. erosus*). Diversos autores han propuesto diferentes teorías sobre la síntesis de metabolitos de las plantas desde el punto de vista ecológico. Una de éstas, es la Teoría de la Defensa Óptima propuesta por Fenny, Rhoades y Coates (1976). Estos autores postularon que el tipo de

defensa de las plantas refleja su historia de vida y su estructura en la comunidad, por lo que podemos asumir que la presencia de más compuestos en la especie silvestre (*P. ferrugineus*) —particularmente en las hojas— es debido a la presión ambiental que existe en su comunidad. Esto en contraparte con la especie cultivada (*P. erosus*), la cual se desarrolla en un ambiente más controlado —ya que ha sido domesticada— restringiendo el uso y formación de defensas químicas. Por otra parte, la síntesis de metabolitos secundarios puede ser una respuesta al ataque de enemigos naturales. Ingham (1979) reportó que las hojas de *P. erosus* producen fitoalexinas (neodunol y homoedudiol) cuando se les inoculó esporas del hongo *Helminthosporium carbonum* (Pleosporaceae) en los tallos. Otros autores, Kigathi *et al.* (2009) reportaron que *Trifolium pretense* (Leguminosae) emite compuestos químicos de defensa cuando se encuentra bajo el ataque de un herbívoro.

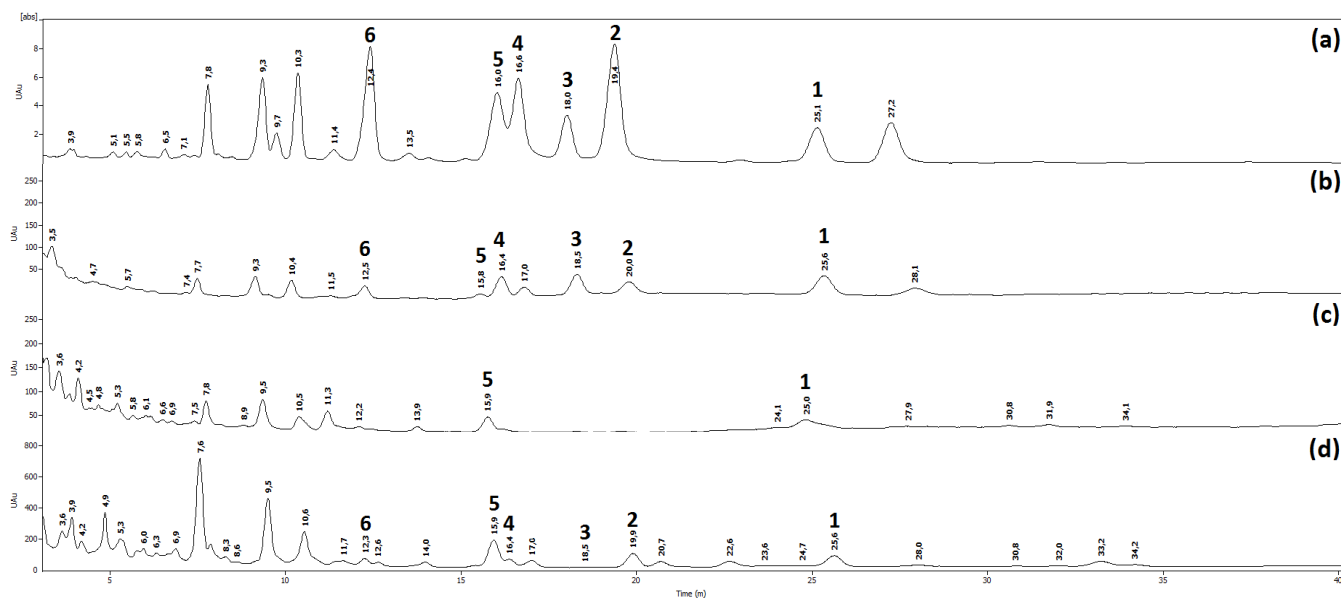


Figura 21. Cromatograma de los extractos de hojas y semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* mediante la técnica CLAR-UV-EM (244 nm). (a) semillas de *P. erosus*, (b) semillas de *P. ferrugineus*, (c) hojas de *P. erosus*, (d) hojas de *P. ferrugineus*. Compuestos identificados: **1**: rotenona; **2**: paquirizina; **3**: paquirizona; **4**: dehidroneotena; **5**: dolineona; **6**: erosona.

La identificación de los compuestos en los extractos se realizó con base en el tiempo de retención y se corroboró mediante sus espectros de masas (tabla 4 y figura II del apéndice). Se obtuvo el peso molecular de cada isoflavonoide por EM, a saber: rotenona (394 m/z), paquirizina (336 m/z), paquirizona (366 m/z), dehidroneotena (336 m/z), dolineona (336

m/z) y erosona ($352 m/z$). Se sabe que los espectros de masas obtenidos mediante iónización por electrospray (ESI) proporcionan información estructural útil sobre biomoléculas polares, en cierta forma superior a la obtenida mediante iónización por impacto electrónico (IE), donde se puede perder tanto el ión molecular (M^+) como fragmentaciones primarias poco notables debido a la baja volatilidad y alta polaridad de los compuestos de tipo fenólico, como los isoflavonoides (Cuyckens y Claeys, 2004).

Proponemos las fragmentaciones de acuerdo al espectro de masas (tabla 4 y figura II del apéndice) para los compuestos aquí aislados. Pereira *et al.*, (1998) mencionan que los rotenoides presentan rearrreglos de tipo Retro Diels-Alder (RDA), los cuales observamos en los espectros de masas (figura 22). De esta manera, los rotenoides aquí reportados presentan un reordenamiento RDA en $192 m/z$, el cual es un pico de baja intensidad. De la misma manera, la erosona y la rotenona, comparten un grupo dimetoxicromano, observando fragmentaciones similares: $192, 164, 161, 104 m/z$. Estos resultados muestran que la CLAR-EM es una herramienta poderosa para la detección y caracterización de isoflavonoides, especialmente de tipo rotenoide, lo que permite identificar compuestos fácilmente a partir de un extracto crudo.

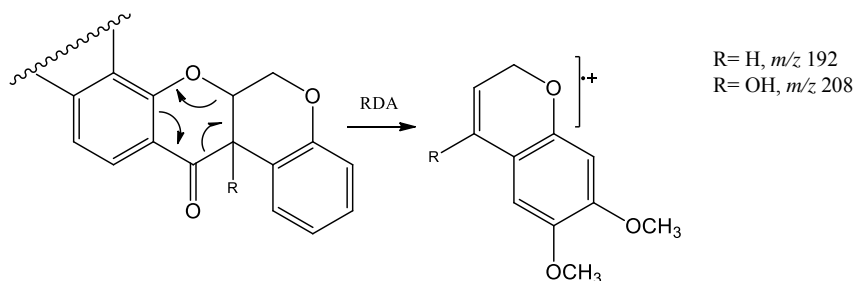


Figura 22. Reareglo Retro Diels-Alder de los rotenoides de acuerdo a Pereira *et al.* (1998).

Tabla 4. Isoflavonoides identificados por espectrometría de masas en las hojas y semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*.

Compuesto	RT (m)	Fragmentos, <i>m/z</i> (% abundancia relativa)
1. rotenona	25.1	394 (M+) 100, 353 (3), 192 (RDA) 2, 161 (10), 130 (5), 104 (60), 171 (5), 128 (10), 113 (10), 164 (2), 147 (2), 145 (60), 144 (50).
2. paquirizina	19.4	336 (M+) 60; 185 (10), 159 (5), 142 (50), 141 (509), 115 (309), 151 (5), 120 (20).
3. paquirizona	18.0	366 (M+) 5, 176 (5), 150 (5), 133 (10), 118 (50), 82 (100), 147 (5), 116 (30).
4. dehidroneotenona	16.6	336 (M+) 60, 185 (2), 154 (2), 140 (60), 128 (10), 111 (10), 151 (20), 120 (30), 117 (40).
5. dolineona	16.0	336 (M+) 5; 117 (15), 176 (5), 148 (70), 131 (40), 117 (15), 146 (10), 145 (60).
6. erosona	12.4	352 (M+) 10; 117 (5), 91 (1), 90 (20), 192 (RDA) 2, 164 (3), 148 (40), 146 (40), 117 (5), 86 (100), 133 (5), 102 (55), 86 (100), 161 (2), 130 (4), 104 (40).

6.2. Actividad biológica.

6.2.1. Actividad insecticida de extractos y compuestos

Se evaluaron los extractos y compuestos previamente purificados de *P. erosus* y *P. ferrugineus*, esto en *Drosophila melanogaster* y *Plodia interpunctella*. Solamente se observó actividad biológica en *D. melanogaster* de los compuestos rotenona y dolineona así como del extracto de acetona de las semillas de ambas especies (tabla 5). Por otra parte, en *P. interpunctella* no se observó actividad insecticida, ni de los extractos de hojas y semillas de ambas plantas ni de los compuestos (≤ 100 ppm). Existen reportes que apoyan nuestros hallazgos. Miyazawa *et al.* (2004), reportaron previamente el efecto insecticida de la rotenona sobre *D. melanogaster*, concordando con lo aquí reportado. Recientemente, Huang *et al.* (2014) y Nirma *et al.* (2012), reportaron el efecto insecticida de la rotenona hacia *Musca domestica* L., *Aedes albopictus* S. y *Aedes aegypti* L., respectivamente. Mientras, Barrera Necha *et al.* (2004) reportaron que la rotenona posee actividad antifúngica hacia *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind. Coincidiendo con nuestros hallazgos, Alavés-Solano *et al.*

(1996) reportaron que los extractos de acetona de las semillas de *P. erosus*, presentaron efecto insecticida sobre *Sitophilus zeamays* (Curculiónidae) mejor conocido como gorgojo del maíz. En el caso de la dolineona, el único reporte publicado fue realizado por Puyvelde *et al.* (1987), el cual menciona que la dolineona no presentó efecto acaricida hacia *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae). Este es el primer reporte del cual la dolineona tiene efecto tóxico hacia *D. melanogaster*, y confirma el efecto insecticida de la rotenona.

Tabla 5. Concentración letal media (CL₅₀) de extractos y compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus* en *D. melanogaster*. En *P. interpunctella* la CL₅₀ fue superior a las 100 ppm.

Planta / compuesto	Órgano	Extracto/ Solvente	24 h	48 h	72 h
			ppm		
<i>P. erosus</i>	semilla	Hexano	>100	>100	>100
		Acetona	>100	>100	28.84±1.9
	hoja	AcOEt	>100	>100	>100
<i>P. ferrugineus</i>	semilla	Hexano	>100	>100	>100
		Acetona	>100	>100	21.37±1.4
	hoja	AcOEt	>100	>100	>100
Rotenona			30.19±1.16	11.48±0.5	10.71±0.8
Paquirizina			>100	>100	>100
Paquirizona			>100	>100	>100
Dehidroneotenona			>100	>100	>100
Erosona			>100	>100	>100
Dolineona			>100	>100	12.88±1.0

Tres experimentos, con tres repeticiones por tratamiento; con 10 organismos en caso de *D. melanogaster* y 3 organismos en *P. interpunctella*. Análisis estadístico por el método PROBIT.

6.2.2. Actividad citotóxica de extractos y compuestos

Se evaluó la citotoxicidad tanto los extractos de acetona de las semillas como los compuestos de *P. erosus* y *P. ferrugineus* en cinco líneas tumorales humanas. El extracto de acetona de las semillas de *P. erosus* (40.50 y 41.31 µg/mL) así como la rotenona (27.29 y 13.05 µM) mostraron una alta inhibición en las líneas celulares HeLa y K562, respectivamente. Los demás extractos y compuestos no mostraron inhibición inferior a 100 µg/mL y/o 100 µM (tabla 6). Se ha documentado ampliamente sobre el efecto citotóxico de la rotenona, en al menos 25 líneas tumorales humanas (Lee *et al.*, 1992; Fang y Casida, 1998; Blatt *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Sakurai *et al.*, 2006; Hisashi *et al.*, 2007; Cheenpracha *et al.*, 2007; Lee *et*

al., 2008; Song *et al.*, 2011; Estrella *et al.*, 2013). Así, *Antheroporum pierrei* (Fabaceae) tuvo efecto citotóxico contra las líneas celulares tumorales humanas C38 y L1210 (Song *et al.*, 2011), por lo que este estudio confirma el efecto citotóxico de la rotenona sobre líneas celulares tumorales humanas, especialmente de tipo cervico-uterino y de leucemia.

Tabla 6. Concentración inhibitoria media de extractos y compuestos de las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* en cinco líneas celulares tumorales humanas.

Especie (semilla)	Extracto (µg/mL)	Línea celular tumoral humana				
		K562 (leucemia)	HeLa (cérvico-uterino)	PC3 (próstata)	LNCap (próstata)	SKLU-1 (pulmón)
<i>P. erosus</i> (jícama cultivada)	Acetona	40.50±1.1	41.31±1.0	>100	>100	>100
	MeOH	>100	>100	>100	>100	>100
<i>P. ferrugineus</i> (jícama silvestre)	Acetona	>100	>100	>100	>100	>100
	MeOH	>100	>100	>100	>100	>100
Compuestos (µM)						
	Rotenona	13.05±1.2	27.29±0.5	>100	>100	>100
	Paquirizina	>100	>100	>100	>100	>100
	Dolineona	>100	>100	>100	>100	>100
	12a-hidroxi paquirizona	>100	>100	>100	>100	>100

Tres experimentos independientes con 6 réplicas por tratamiento. Para calcular la IC₅₀ se estimó mediante una regresión no lineal con el paquete de software OriginPro 7.0 (OriginLab, Northampton, MA, EE.UU).

6.3. Mecanismos de acción de citotoxicidad de la rotenona en las células K562

6.3.1. Ensayo cometa

Con el fin de determinar el posible mecanismo molecular de citotoxicidad de la rotenona en la línea celular humana K562 se realizaron diversos ensayos, de los cuales se evaluó las propiedades genotóxicas por diversos experimentos. Así, para evaluar si la rotenona provoca daño al ADN en células K562, se realizó el ensayo cometa. En nuestros resultados se puede observar que existe daño al ADN después de 1 h de iniciado el experimento, alcanzando el máximo daño a la tercera hora, manteniéndose este daño al menos hasta las 12 h (figura 23).

Este es el primer reporte de la genotoxicidad de la rotenona vía el ensayo cometa. Los pocos reportes hoy en día han sido con otros flavonoides, diferentes a la rotenona, tales como: genisteína, equol, daidzeína, los cuales inducen daños en el ADN en dos líneas celulares tumorales humanas (HT29 y V79) (Zobel *et al.*, 2000; Di Virgiliola *et al.*, 2004).

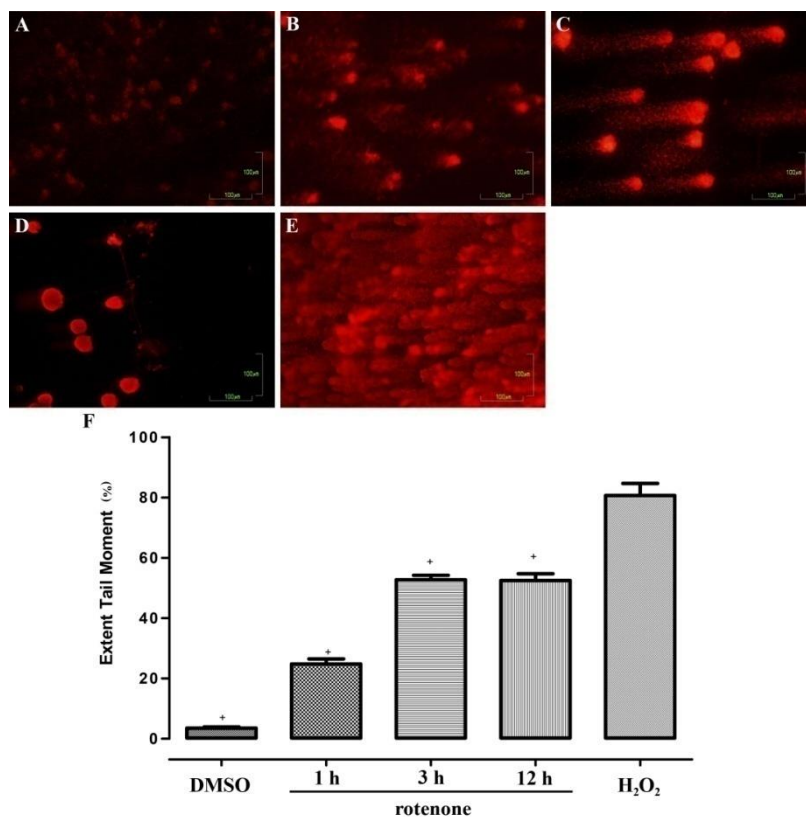


Figura 23. Genotoxicidad inducida por rotenona en las células K562. Microfotografías de células K562 con rotenona (13.05 µM) después de: (A) 1 h, (B) 3 h, (C) 12 h de tratamiento rotenona. (D) vehículo (DMSO; 12 h) y (E) control positivo (H₂O₂). Barra de escala= 100 µm. (F) Diagrama de barras el cual muestra que la rotenona provoca daño desde la primera hora de exposición. Cuatro experimentos independientes con tres replicas por experimento * $p < 0.05$.

6.3.2. Ensayo en plásmido

Para validar si la actividad si la rotenona provoca daño de manera directa en la estructura del ADN, se evaluó mediante el ensayo en el plásmido pDEST26. Se pudo observar que la rotenona no indujo daño alguno al ADN en ambas concentraciones, siendo similar al vehículo de administración (DMSO). En contraparte, se observó daño al ADN en su forma lineal y

enrollada, esto inducido por el reactivo de Fenton y la endonucleasa Eco RI (figura 24). Este es el primer reporte sobre la actividad de la rotenona en plásmido. Sin embargo, se ha postulado que la rotenona puede provocar daños en el ADN mediante la producción de especies reactivas de oxígeno en diversas células (Kondo *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999; Barrientos y Moraes, 1999; Betarbet *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003). Estos hallazgos indicaron que la rotenona no indujo ningún efecto estructural sobre el ADN, por lo que no interactúa de manera directa con el ADN.

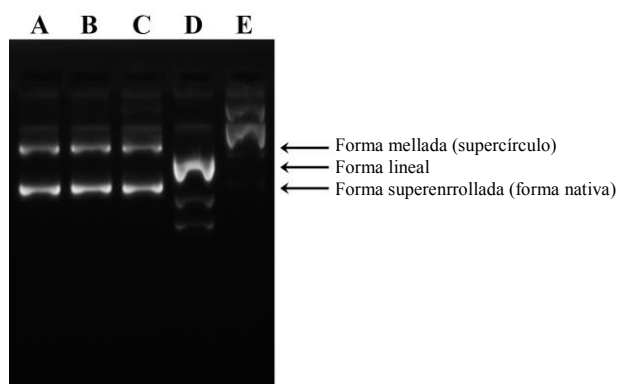


Figura 24. Ensayo en plásmido de la rotenona en ADN. Se incubó el ADN del plásmido pDEST26 a diferentes tratamientos. **A)** control (DMSO), **B)** rotenona (13.05 μM), **C)** rotenona (130 μM), **D)** Control positivo (Eco RI endonucleasa), **E)** reactivo de Fenton. La rotenona no indujo daño alguno al ADN. Tres experimentos independientes con tres réplicas por experimento.

6.3.3. Ensayo de fragmentación de ADN

6.3.3.1. Ensayo TUNEL

Para confirmar las propiedades citotóxicas de la rotenona y explorar el mecanismo de la muerte celular, se realizó tanto el ensayo de TUNEL como el de la actividad de la enzima caspasa-3. Así, el ensayo TUNEL detecta condensación de cromatina y fragmentación nuclear y podría sugerir muerte celular por apoptosis, (González *et al.*, 2011). De esta manera, la observación de las células bajo el microscopio de fluorescencia reveló pequeños puntos brillantes que representan la condensación de la cromatina y/o la fragmentación nuclear después de 24 h de exposición de la rotenona (13.05 μM) en células K562, induciendo una respuesta positiva en el ensayo TUNEL (figura 25; flechas blancas). Las células tratadas con el vehículo de administración (DMSO) no mostraron fragmentación del ADN.

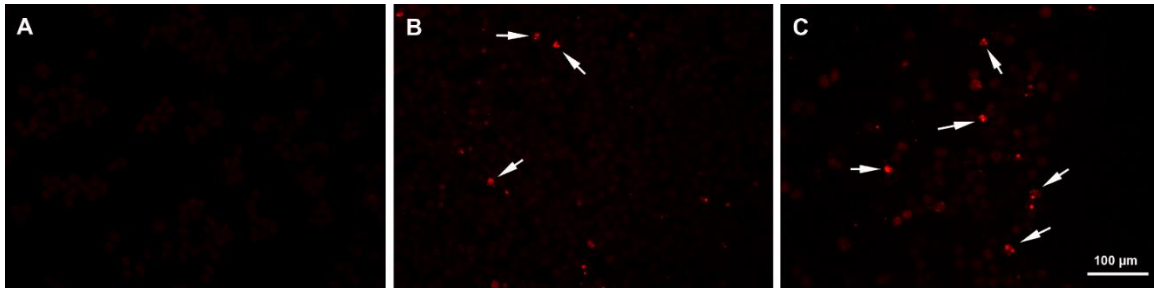


Figura 25. Fragmentación del ADN en células K562 evaluada mediante el ensayo TUNEL. Las células se observaron bajo microscopio de fluorescencia después de 24 h de iniciado el experimento. **A)** control negativo (DMSO; 0.28%), **B)** control positivo (taxol; 25 nM) y **C)** rotenona (13.05 μ M). Las flechas blancas muestran la fragmentación de los núcleos en las células. Barra de escala= 100 μ m.

6.3.3.2. Ensayo de actividad de la caspasa-3

La caspasa-3 es una enzima ejecutora en la muerte celular y su actividad es un evento crucial que conduce a la muerte celular tipo apoptosis (Hyeon *et al.*, 2010). Se investigó la actividad de la caspasa-3 para explorar más a fondo el mecanismo de muerte celular después del tratamiento con la rotenona, esto a las 24 h de iniciado el experimento. Se observó a la caspasa-3 en su forma activa (puntos rojos), después del tratamiento tanto con rotenona como con taxol, esto a las 24 h. Como se esperaba, las células tratadas con DMSO (control negativo), no activo a la caspasa-3 (figura 26).

De esta manera, se encontró que la rotenona (13.05 μ M), tanto en el ensayo TUNEL como en la actividad de la caspasa-3 (figura 25 y 26) fuera positivo en ambos dichos ensayos. Lo anterior sugiere que la citotoxicidad de la rotenona en células K562 se debe a la muerte celular tipo apoptosis. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado. Se sabe que la rotenona a una muy baja concentración (1 μ M), provoca la liberación del citocromo c en el citosol, desencadenando la consecuente vía de señalización mediada por caspasas — proteínas reguladoras de muerte celular por apoptosis— esto en la línea celular tumoral humana SAS (Lee *et al.*, 2008). Otros autores han reportado que otros rotenoides tales como la deguelina, indujeron que el ensayo TUNEL fuese positivo, esto en células de adenocarcinoma de colon humano (COLO 205) y en la línea celular de carcinoma colorectal (HCT116) (Kang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012). Además, otros isoflavonoides como la

biocanina A, inhibió el crecimiento de células de cáncer de próstata (LNCaP) a través de la muerte celular tipo apoptosis (Rice *et al.*, 2002). Finalmente, se obtuvieron resultados similares a lo reportado en este trabajo, esto en la línea celular hepatocarcinoma (Huh-7) de otros isoflavonoides, tales como: irilona, tectorigenina, formononetina, genisteína, 2'-hydroxybiochanin A y 4', 7-dihidroxi-2' methoxyisoflavan (Mansor *et al.*, 2011). Nuestros resultados mostraron que la rotenona induce una muerte celular tipo apoptosis en la línea celular K562.

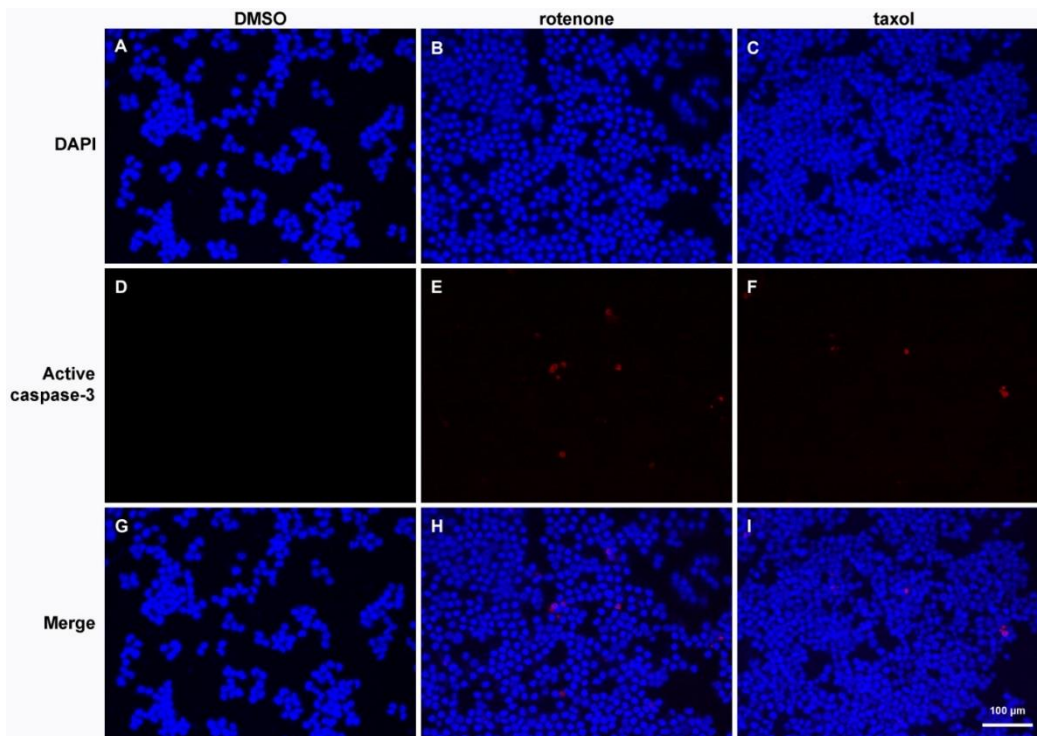


Figura 26. Actividad de la caspasa-3 después del tratamiento con rotenona. Análisis realizado mediante el ensayo de inmunocitofluorescencia para la caspasa-3 en su forma activa en células K562. Microfotografías de las células tratadas con: DMSO (control negativo; A, D, G), rotenona (B, E, H) y taxol (control positivo; C, F, I), esto a las 24 h de iniciado el experimento. Células teñidas con DAPI (A, B, C), anticuerpo anti-caspasa-3 en su forma activa (D, E, F) y superposición de las imágenes (G, H, I). Barra de escala= 100 µm.

7. Conclusiones

- 1.- Las semillas de *Pachyrhizus ferrugineus* contienen al menos seis compuestos de tipo isoflavonoide (rotenona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona, erosona y dolineona), compuestos que también están presentes en las semillas de *Pachyrhizus erosus*.
- 2.- Las hojas de *P. erosus* tienen rotenona y dolineona, mientras las hojas de *P. ferrugineus* contienen al menos seis compuestos de tipo isoflavonoide (rotenona, paquirizina, paquirizona, dehidroneotenona, erosona y dolineona) y otros compuestos no identificados.
- 3.- Las semillas de *P. erosus* y *P. ferrugineus*, así como la rotenona y dolineona, presentaron actividad insecticida en *D. melanogaster*.
- 4.- Las semillas de *P. erosus*, así como la rotenona, presentaron efecto citotóxico en las líneas celulares tumorales humanas K562 y HeLa.
- 5.- La rotenona induce citotoxicidad mediante la muerte celular tipo apoptosis, en la línea celular K562.

El estudio de las propiedades insecticidas y anticancerígena de los rotenoides de *P. erosus* y *P. ferrugineus* es importante, debido a sus posibles aplicaciones agrícolas y médicas. Este estudio abre el panorama para el estudio del resto del género, en el cual están las especies cultivadas *P. ahipa*, y *P. tuberosus* y la especie silvestre *P. panamensis*.

8. Bibliografía

Alarcón J, Lamilla C, Céspedes CL. 2013. Insecticidal activity of sesquiterpenes skeleton synthesized by the conventional Robinson annulations reaction on *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products**. 42: 268-272.

Alavés-Solano D, Reyes Chilpa R, Jiménez EM, Villavicencio M, Pérez EB, Gómez GF. 1996. Estudio químico y actividad insecticida de semillas de *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban. **Proceeding of 2nd International symposium on tuberous legumes**. Celaya, Guanajuato, México. pp. 535-547.

Amstrong JS, Hornung B, Lecane P, Jones DP, Knox SJ. 2001. Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW. **Biochem Biophys Res Commun**. 289(5): 973-978.

Athar HS, Shams T, Masood A. 2011. Short-term *in vitro* and *in vivo* genotoxicity testing systems for some water bodies of Northern India. **Environ Monit Assess**. 180: 87-95.

Barjhoux I, Baudrimont M, Morin B, Landi L, Gonzalez P, Cachot J. 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Ecotoxicol. Environ. Saf**. 79: 272-82.

Barrera NLL, Reyes-Chilpa R, Alavez-Solano D, Bautista BS, Bravo LL, García SJL. 2004. Antifungal activity of seed powders, extracts, and secondary metabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 22(3): 356-361.

Barrientos A, Moraes CT. 1999. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **J. Biol. Chem.** 274: 16188-16197.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, García-Osuna M. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3: 1301-1306.

Berger A. 1994. Using natural pesticides: current and future perspectives. **A report for the Plant Protection Improvement Programme in Botswana, Zambia and Tanzania.** Spanska. Suecia.

Bertino JR. 1997. Encyclopédía of Cancer (Volume II). **Academic Press.** EE.UU. pp1074.

Blaskó G, Shieh H, Pezzuto JM, Cordel GA. 1989. ¹³C-NMR spectral assignment and evaluation of the cytotoxic potential of rotenone. **Journal of Natural Products.** 52(6): 1363-1366.

Blatt C, Chavez D, Chai H, Graham J, Cabieses F, Farnsworth N, Cordell G, Pezzuto JM, Kinghorn D. 2002. Cytotoxic flavonoids from the Steam bark of *Lonchocarpus aff. fluvialis*. **Phytother. Res.** 16: 320-325.

Broadbent, JH, y Shone, G. 1963. The composition of *Pachyrhizus erosus* (Yam bean) seed oil. **J. Sci. Food Agric.** 14(7): 524-527.

Bruce A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Molecular Biology of the Cell, 4th edic., **Garland Science.** New York.

Chandrashekar V, Krishnamurti M, Seshadri TR. 1967. A new synthesis of isoelliptoisoflavone and synthesis of isoelliptic acid. **Current Science**. 36(23): 623.

Cheenpracha S, Chatchanok K, Chanita P, Kan C. 2007. Cytotoxic rotenoloids from stems of *Derris trifoliata*. **Can. J. Chem.** 85: 1019-1022.

Cork A., Hans D., Grzywacz D, Rick Hodges, Orr A, Stevenson P. 2009. Review of pre- and post-harvest pest management for pulses with special reference to Eastern and Southern Africa. **Natural Resources Institute**. University of Greenwich, Central Avenue, Chatham Maritime, UK.

Choi S, Choi Y, Dat NT, Hwangbo C, Lee JJ, Lee JH. 2010. Tephrosin induces internalización and degradación of EGFR and ErbB2 in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer let.** 293(1): 23-30.

Chun KH, Kosmeder JW, Sun S, Pezzuto JM, Lotan R, Hong WK, Lee HY. 2003. Effects of Deguelin on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. **J. Natl Cancer Inst.** 95(4): 291-302

Curtis Helena y Barnes Sue N. 2006. Biología. Sexta edic., **Medica Panamericana**, España, pp. 471.

Curtis H, Schneck A. 2008. Biología. **Panamericana**, séptima edic., España. pp 291.

Cuyckens F, Claeys M. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **J Mass Spectrom.** 39(1):1-15.

Dahmann C. 2008. *Drosophila: Methods and Protocols*. **Humana Press**. Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany.

Deng YT, Huang H C, Lin JK. 2010. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. **Mol. Carcinog.** 49(2):141-151.

Dibiyantoro L. 2005. Augmentación of predator biodiversity management by utilization of indigenous natural toxin for environment friendly production on safe vegetables. Evaluation of vegetables- base farming systems and improvement of vegetable and fruit cultivation in highlands regions of West Java, Indonesia. pp. 195-204.

Di Virgiliola AL, Iwamib K, Wätjenb W, Kahlb R, Degen G. 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. **Toxicology Letters** 151 (1) 151–162.

Donald Crosby. 1966. *Advances in Chemistry*. **Natural Pest control agents**, Capitulo 1, Vol. 53, pp. 1-16.

Duke J.A. 1981. *Handbook of legumes of world economic importance*. **Plenum**. New York and London.

Estrella-Parra EA, Gomez-Verjan JC, González-Sánchez I, Vázquez-Martínez ER, Vergara-Castañeda E, Cerbón MA, Alavez-Solano D, Reyes-Chilpa R. 2014. Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells. **Nat Prod Res.** 28(20):1780-1785.

Fang N, Casida J. 1998. Anticancer action of cube insecticide: Correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induce ornithine decarboxylase activities. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95(7): 380-384.

Fenny P. 1976. Plant apparency and chemical defense. J.W. Wallace and R.L. nansel (eds). Biological interactions between plants e insects. Recents advances in Phytochemistry. Vol. 10. **Plenum Press**, NY.

Fuccillo D, Sears L, Stapleton P. 1997. Biodiversity in Trust. Cambridge **University Press**. United Kingdom. pp. 51.

Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. 2002. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J. Neurosci.** 22: 782-790.

Goncalves AP, Arnaldo V, Valdemar M, Solares P. 2011. Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RET/PTC1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. **J. Biosci.** 36(4): 639-648.

Goncalves AP, Máximo V, Lima J, Singh KK, Soares P, Videira A. 2011. Involvement of p53 in cell death following cell cycle arrest and mitotic catastrophe induced by rotenone. **Biochim. Biophys Acta.** 1813(3): 492-499.

Gosalvez M. 1973. Induction of rat mammary adenomas with the respiratory inhibitory rotenone. **Cancer Research.** 33: 3047-3050.

González-Sánchez I, Solano JD. 2011. Antineoplastic activity of the thiazolo [5, 4-b] quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. **Eur J Med Chem.** 46(6): 2102-2108.

Grainge M, Ahmed S, Mitchell WC, Hylin JW. 1984. Plant species reportedly possessing pest-control properties-A Database. **Resources Systems Institute**, East-West Center, Honolulu, Hawaii. U.S.A. 240 pp.

Hansberry R, Clausen RT, Norton LB. 1947. Variations in the chemical composition and insecticidal properties of the yam bean (*Pachyrhizus*). **Journal of Agricultural Research (USA)**. 74(2): 55-64.

Hamlin JC. 1931. Biology of the indian-meal moth on dried fruits in California. **Technical Bulletin 242**, U.S. Dept. of Agriculture.

Hisashi M, Kazutoshi Y, Katsutoshi M, Yanusobu A, Saya T, Souichi N, fengming X, Masayuki Y. 2007. Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937 and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. **Bioorganic and Medicine Chemistry**. 15: 1539-1546.

Huang JG, Zhou LJ, Xu HH, Li WO. 2009. Insecticidal and cytotoxic activities of extracts of *Cacalia tangutica* and its two active ingredients against *Musca domestica* and *Aedes albopictus*. **J Econ Entomol**. 102(4): 1444-1447.

Huang J, Zhou L, Zhao H, Xu H. 2014. Insecticidal activity of *Toricellia tiliifolia* extracts against *Musca domestica* and *Aedes albopictus*. **Med Entomol**. 51(5): 989-992.

Ingham JL. 1979. Isoflavonoid phytoalexins of yam bean (*Pachyrhizus erosus*). **Zeitschrift fur Naturforschung**. 34: 683-688.

Ito C, Itoigawa M, Kojima N, Tan TH, Takayasu J, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. 2004. Cáncer chemopreventive activity of rotenoids from *Derris trifoliata*. **Planta Medica**. 70(6): 585-588.

Jiménez GLF, Merchant LH. 2003. Biología Celular y Molecular. **Pearson Educación**, México. pp 670.

Kang HW, Kim JM, Cha MY, Jung HC, Song IS, Kim JS. 2012. Deguelin, an Akt inhibitor, down-regulates NF- κ B signaling and induces apoptosis in colon cancer cells and inhibits tumor growth in mice. **Dig Dis Sci**. 57 (11): 2873-2882.

Kigathi RN, Sybille BU, Reichelt M, Kesselmeier J, Gershenzon J, Weisser WW. 2009. Emission of volatile organic compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. **J Chem Ecol**. 35: 1335-1348.

Klowden M. 2013. Physiological System in insects. **Academic Press** (Elsevier). Third edit. University of Idaho, Moscow, Idaho.

Kondo T, Shimada H, Hatori K, Sugita Y, Mizuno Y. 1998. Talipexole protects dopaminergic neurons from methamphetamine toxicity in C57BL/6N mouse. **Neurosci Lett**. 247(2-3): 143-146.

Krishnamurti M, Seshadri TR. 1966. Chemical components of yam bean: their evolution and interrelationship. **Current Science**. 35: 167-169.

Kardano, LB, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 1990. Cytotoxic constituents of the seed of *Pachyrhizus erosus*. **Planta Medica**. 56, 673-674.

Larramendy ML, Soloneski S. 2014. Pesticides: Toxic Aspects. Published by **AvE4EvA** ISBN-13 9789535112174.

Lee JH, Lee DH, Lee HS, Choi JS, Kim KW, Hong SS. 2008. Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis. **Oncol Rep.** 20(1): 129-134.

Lee JH, Hyosung L, Jung KH, Hong S.S. 2010. Degueline promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer. **Oncology reports.** 24(4): 957-963.

Lee HY, Oh SH, Woo JK, Kim WY, Van Pelt CS, Price RE, Cody D, Tran H, Pezzuto JM, Moriarty RM, Hong WK. 2005. Chemopreventive effects of deguelin, a novel Akt inhibitor, on tobacco-induced lung tumorigenesis. **J Natl Cancer Inst.** 97(22): 1695-1699.

Leiping L, Hui-Kang W, Jer-Jang ., Andrew TM, Donald RM, Hiroki T, Takao K, Mutsuo K, James RE, Kuo-Hsiung L. 1993. Antitumor agents, 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*. **Journal of Natural Products.** 56(5): 690-698.

Leuner O, Havlik J, Budesinsky M, Vrkoslav V, Chu J, Bradshaw TD, Hummelova J, Miksatkova P, Lapcik O, Valterova I, Kokoska L. 2013. Cytotoxic constituents of *Pachyrhizus tuberosus* from Peruvian amazon. **Nat Prod Commun.** 8(10):1423-1426.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. **J. Biol. Chem.** 278: 8516-8525.

Li Z, Wu J, Wu C, Jiang J, Zheng X, Xu B, Li M. 2012. Deguelin, a natural rotenoid, inhibits mouse myeloma cell growth *in vitro* via induction of apoptosis. **Oncol Lett.** 4(4): 677-681.

Lu HF, Lai TY, Hsia TC, Tang YJ, Yang JS, Chiang JH. 2010. Danthron induces DNA damage and inhibits DNA repair gene expressions in GBM 8401 human brain glioblastoma multiforms cells. **Neurochem. Res.** 35(7): 1105-1110.

Madrigal VE. 1995. Producción y evaluación preliminar de la toxicidad de un bioinsecticida formulado con delta-endotoxina y rotenona. **Editorial San José**, Universidad de Costa Rica, Tesis de licenciatura en Ingeniería Química, pp. 127

Mansor TA, Ramalho RM, Luo X, Ramallete C, Rodrigues CMP, Ferreira MJU. 2011. Isoflavones as Apoptosis Inducers in Human Hepatoma HuH-7 Cells. **Phytotherapy Research.** 25(12): 1819-1824.

Martínez M. 1959. Jícama. In Planta útiles de la flora Mexicana. México, **Botas**, pp. 340-344.

Martínez M. 1977. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. **Fondo de Cultura Económica**, México.

Mbata GN, Shapiro-Ilan DI. 2010. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control.** 54: 75-82.

Miyazawa M, Tsukamoto T, Anzai J, Ishikawa Y. 2004. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. **J Agric Food Chem.** 52 (14): 4401-4405.

Mohandass S, Arthur FH, Zhu KY, Throne JE. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. **Journal of Stored Products Research**. 43: 302-311.

Montaldo A. 1983. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José, Costa Rica, **IICA**, pp 284.

Nawrot, JR, Warburton DB, Klimstra WB. 1986. Coarse refuse reclamation: alkaline enhancement for direct vegetation establishment. C. Carlson and J. Swisher (eds.) p. 613-636. In Proceedings of The National Mined land reclamation Conference Innovative Approaches to Mined Land reclamation. (**Southern Illinois University Press**, Carbondale, IL.

Neupane F. 2001. Synopsis of use and economic value of pesticides and chances for reduced application rates at different scales in Hindu Kush Region. **CEAPRED**, Kathmandu, Nepal. pp. 3-18.

Nirma C, Rodrigues AM, Basset C, Chevolut L, Girod R, Moretti C, Stien D, Dusfour I, Eparvier V. 2012. Larvicidal activity of isoflavonoids from *Muelleria frutescens* extracts against *Aedes aegypti*. **Nat Prod Commun**. 7(10): 1319-1322.

Norma R, Lodwick D. 2007. Flesh and Bones of Medical Cell Biology. **Mosby Elsevier**. EE.UU. pp106-107.

Norton B, Hansberry R. 1945. Constituents of the insecticidal resin of the Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*). **Journal of The American Chemical Society**. 67:1609-1614.

Paramonov S. 1953. The principal pest of oil seed plants in Ukraine (in Germany). **L. Angew. Entomol.** 35: 63-81.

Patiño VM. 1963. Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial, tomo III. Capítulo XVII. Medicinales, estimulantes, venenosas, insecticidas. **Imprenta departamental**, Cali, Colombia.

Pecorino L. 2012. Molecular Biology of Cancer. **Oxford University Press**, 3era. ed. pp. 2.

Pérez TR. 2003. El cáncer en México. **El Colegio Nacional**. México. pp 15-33.

Pereira AS, Pinto AC, Cardoso JN, Aquino Neto FR, Vieira PC, Fernandes JB, Silva MF, Andrei CC. 1998. Analysis of Rotenoids by High Temperature High Resolución Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of High Resolución Chromatography.** 21 (9): 513–518.

Phillips-Mora W, Morera J, Sörensen M. 1993. Las jícamas silvestres y cultivadas (*Pachyrhizus* spp). **Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE)**. Royal veterinary and agricultural University of Denmark. Turrialba, Costa Rica.

Phrutivorapongkul A, Vimolmas L, Nijisiri R, Toshiko W, Tsutomu I. 2002. Studies on the constituents of seeds of *Pachyrhizus erosus* and their anti herpes simples virus (HSV) activities. **Chem. Pharm. Bull.** 50 (4): 534-537.

Puyvelde LV, Norbert DK, Mudaheranwa JP, Gasiga A, Schamp N, Declerq JP, Van Meerssche M. 1987. Isolation and Structural Elucidation of Potentially Insecticidal and Acaricidal Isoflavone-Type Compounds from *Neorautanenia mitis*. **Journal of Natural Products**. 50(3): 349-356.

Regan M, Memmott P, Dennis A. 2010. The role of the Akt/mTOR pathway in tobacco-carcinogen induced lung tumorigenesis. **Cli Cancer Res**. 16(1): 4-10.

Rice L, Samedi VG, Medrano TA, Sweeney CA, Baker HV, Stenstrom A, Furman J, Shiverick KT. 2002. Mechanisms of the growth inhibitory effects of the isoflavonoid biochanin A on LNCaP cells and xenografts. **Prostate**. 52(3): 201-212.

Russ J.C. 1995. The Image Processing Handbook. 2nd ed., **Ed. CRC**.

Rubio CER. 2012. Efecto de la susceptibilidad de *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) a *Bacillus thuringiensis*, su relación con la flora microbiana y la expresión de la proteína de inmunidad hemolina. **Tesis de Maestría en Ciencias** con acentuación en microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Nuevo León. México.

Sakurai Y, Nobuko S, Masahiko T, Yuka N, Kenneth B, Xihong W, Gordon C, Kuo-Hsiung L. 2006. Rautandiols A and B, Pterocarpan and cytotoxic constituents from *Neorautanenia mitis*. **J. Nat. Prod**. 69: 397-399.

Scramin S. 1994. Estudio fitoquímico do genero *Pachyrhizus* Rch. Ex DC, **PhD thesis**, Universidad Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.

Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** 175:184-191.

Gao S, Ya-ming X, Frederick AV, Gunatilaka L. 2011. Pierreíones A-D, solid tumor selective Pyranoisoflavones and other cytotoxic constituents from *Antheroporum pierrei*. **Journal of Natural Products.** 74: 852-856.

Sörensen M. 1990. Observatións on distributióń, ecology and cultivation of the tuber-bearing legumes genus *Pachyrhizus* Rich, ex DC. **Wageningen Agricultural University Papers** (Netherlands), 90(3): 38.

Sörensen M. 1996. Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservatióń and use of underutilized and neglected crops. 2. **Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ Internatióńal Plant Genetic Resources Institute; Rome.**

Suzuki S, Higuchi M, Proske RJ, Oridate N, Hong WK, Lotan R. 1999. Implicatióń of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. **Oncogene.** 18(46): 6380-6387.

Sylvester C, Gompe N. 2013. Atlas of Drosophila Morphology: Wild-type and Classical Mutants. **Academic Press, China.**

Valdés J, Flores H. 1985. Historia de las Plantas de la Nueva España. En: Comentarios a la Obra de Francisco Hernández. Obras Completas, Tomo VII. **Universidad Nacional Autónoma de México.** México. pp. 9-222.

Visnja O, Nevenka K, Ksenija D, Loris E, Stefica F, Jasna F. 2009. Citotoxicity status of electroplating wastewater prior/after neutralización/purificación with alkaline solid residue of electric arc furnace dust. **Journal of Environmental Science and Health**. 44 (3): 273-278.

Wang C, Youssef J, Saran B, Rothberg PG, Cunningham ML, Molten A, Badr M. 1999 Diminished energy metabolism and enhanced apoptosis in livers of B6C3F1 mice treated with the antihepatocarcinogen rotenone. **Mol Cell Biochem**. 201(1-2): 25-32.

Yan Y, Wang Y, Tan Q, Lubet RA, You M. 2005. Efficacy of Deguelin and Silibinin on Benzo (a) pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice. **Neoplasia**. 7 (12): 1053-1057.

Zobel BLP, Adlercreutz H, Gleis M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wähälä K, Rechkemmer G. 2000. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. **Oxford Journals Life Sciences & Medicine Carcinogenesis**. 21 (6): 1247-1252.

Página electrónica del Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2012:

<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>

9. Apéndice

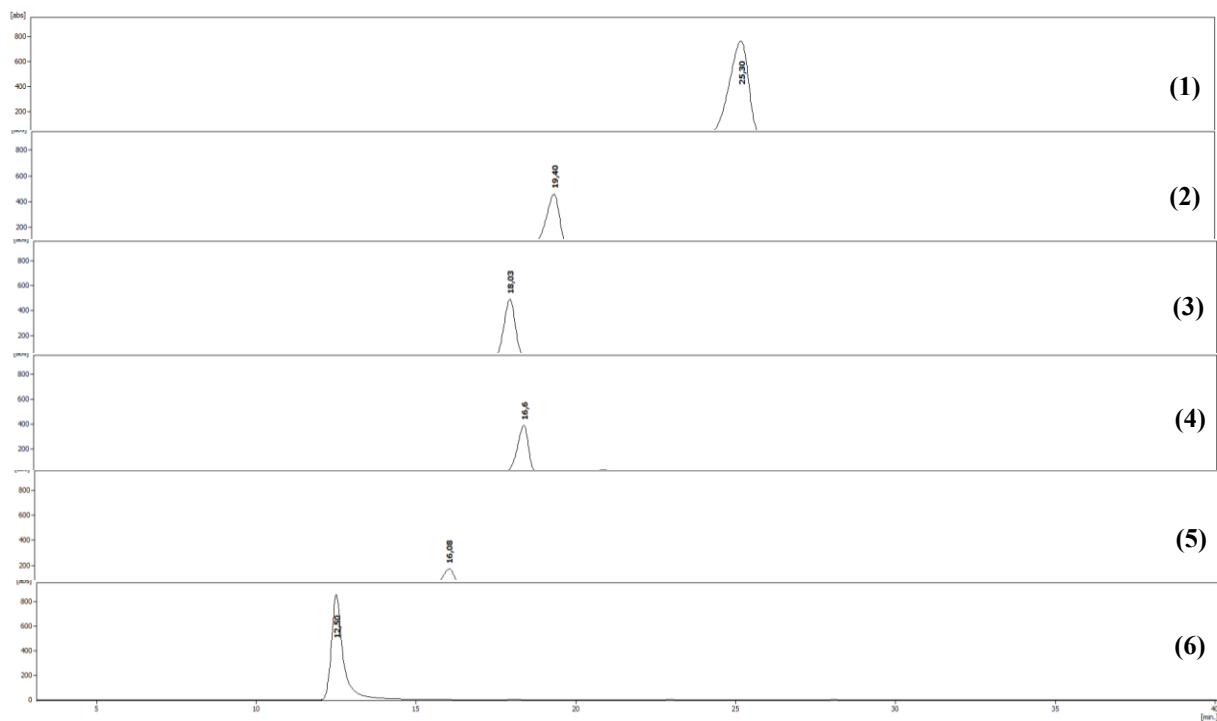


Figura I. Cromatograma de los compuestos purificados de las semillas de *P. erosus*. Compuestos examinados mediante la técnica HPLC-UV (244 nm). **1:** rotenona; **2:** paquirizina; **3:** paquirizona; **4:** dehidroneotenona; **5:** dolineona; **6:** erosona.

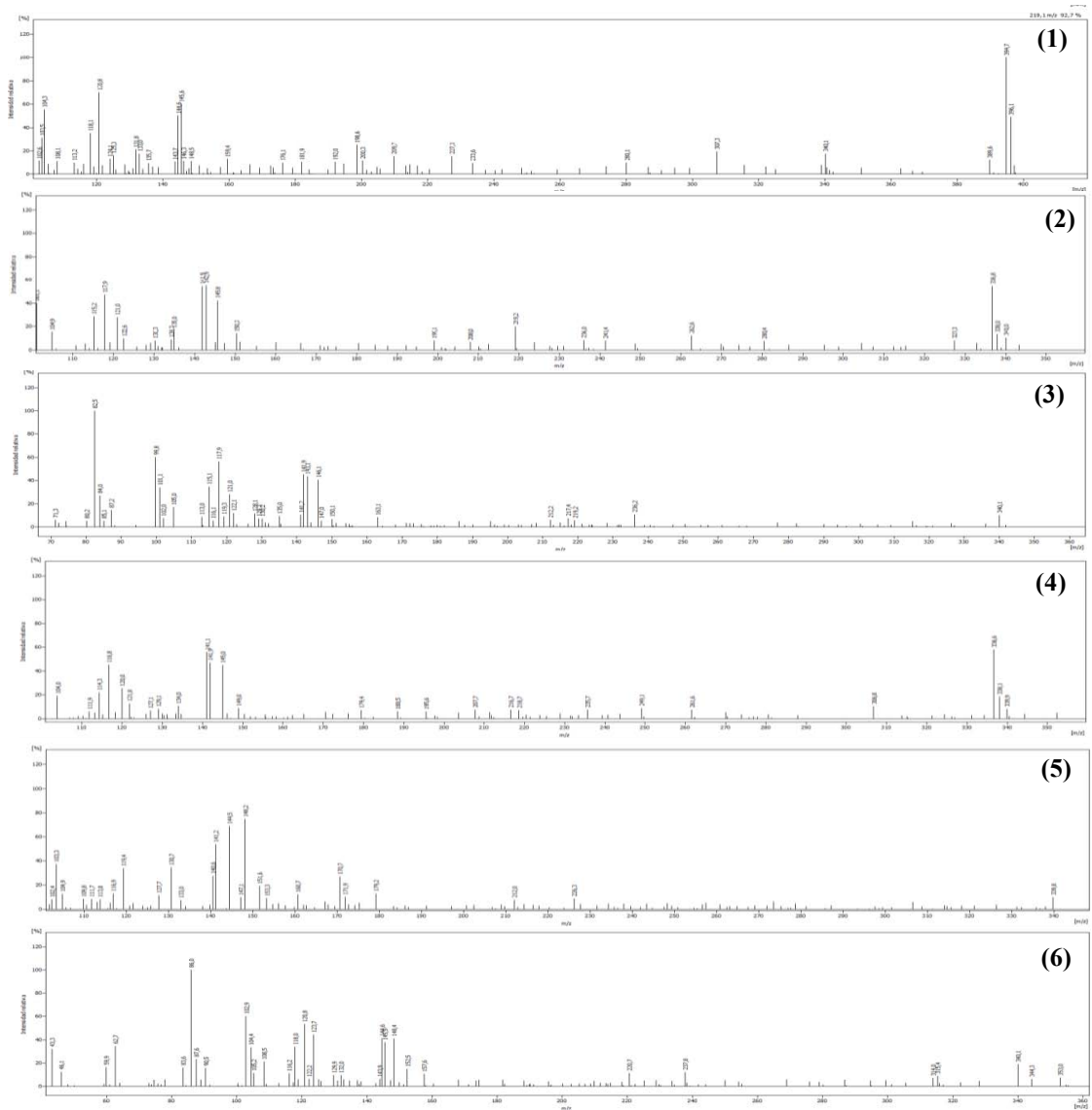


Figura II. Espectros de masas de: (1) rotenona; (2) paquirizina; (3) paquirizona; (4) dehidroneotenona; (5) dolineona; (6) erosona. En todos los espectros se puede observar el peso molecular de cada molécula.

Abreviaturas usadas en esta tesis

AcOEt	acetato de etilo	CLAR/U	cromatografía líquida de alta resolución a coplada a un detector de luz ultravioleta y a un espectrómetro de masas.
		V/EM	
CC	cromatografía en columna	Hx	hexano
CCF	cromatografía en capa fina	MeOH	metanol
cm	centímetros	Mhz	megahertz
CPP	cromatografía en placa preparativa	mm	milímetros
CeSO₄	sulfato de cério	msnm	metros sobre el nivel del mar
CDCl₃	cloroformo deuterado	m/z	relación masa/carga.
CH₂Cl₂	diclorometano	nm	nanómetros
CI₅₀	concentración inhibitoria media	μL	microlitro
d	señal doble	μM	micromolar
dd	señal doble de doble	μg	microgramo
ddd	señal doble de doble de doble	pf	punto de fusión
DL₅₀	dosis letal media	pp	precipitado
DMSO	dimetil sulfóxido.	ppm	partes por millón
dt	señal doble de triple	RDA	rearrreglo Retro Diels-Alder
δ	desplazamiento químico	RMN ¹H	resonancia magnética nuclear de protón
EM	espectrometría de Masas	s	señal simple
FM	fase móvil	sb	sobrenadante
g	gramos	t	señal triple
CLAR	cromatografía líquida de alta resolución	TMS	tetrametil silano

This article was downloaded by: [University of Veracruzana]
On: 24 August 2015, At: 15:26
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: 5 Howick Place, London, SW1P 1WG



CrossMark

[Click for updates](#)

Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells

Edgar A. Estrella-Parra^a, Juan C. Gomez-Verjan^a, Ignacio González-Sánchez^{ab}, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez^b, Edgar Vergara-Castañeda^b, Marco A. Cerbón^b, Dagoberto Alavez-Solano^c & Ricardo Reyes-Chilpa^a

^a Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F.Mexico

^b Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, D.F.Mexico

^c Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Mexico

Published online: 23 Jul 2014.

To cite this article: Edgar A. Estrella-Parra, Juan C. Gomez-Verjan, Ignacio González-Sánchez, Edgar Ricardo Vázquez-Martínez, Edgar Vergara-Castañeda, Marco A. Cerbón, Dagoberto Alavez-Solano & Ricardo Reyes-Chilpa (2014) Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells, *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 28:20, 1780-1785, DOI: [10.1080/14786419.2014.939081](https://doi.org/10.1080/14786419.2014.939081)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.939081>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever

or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

SHORT COMMUNICATION

Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells

Edgar A. Estrella-Parra^a, Juan C. Gomez-Verjan^a, Ignacio González-Sánchez^{ab},
Edgar Ricardo Vázquez-Martínez^b, Edgar Vergara-Casañeda^b, Marco A. Cerbón^b,
Dagoberto Alavez-Solano^c and Ricardo Reyes-Chilpa^{a*}

^aDepartamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, D.F., México; ^bDepartamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, D.F., México; ^cDepartamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México

(Received 19 March 2014; final version received 24 June 2014)

Pachyrhizus erosus (Fabaceae) is a herb commonly known as 'yam bean', which has been cultivated in México since pre-Columbian times for its edible tubers. The seeds are also known for their acaricidal and insecticidal properties due to rotenone and other isoflavonoid contents. Rotenone has exhibited cytotoxic activity against several human tumour cell lines; however, its mechanism of action is still not fully understood. In this study, we determined the cytotoxicity of rotenone isolated from *P. erosus* seeds on K562 human leukaemia cells. Rotenone exhibited significant cytotoxic activity (IC₅₀ = 13.05 µM), as determined by the MTT assay. Three other isolated isoflavonoids were not cytotoxic. Rotenone genotoxicity was detected using the comet assay. Rotenone induced cell death, and caspase-3 activation as indicated by TUNEL assay, and immunocytofluorescence. Plasmid nicking assay indicated that rotenone does not interact directly with DNA.

Keywords: *Pachyrhizus erosus* seeds; rotenone; K562 leukaemia cells; cytotoxicity; apoptosis; caspase-3

1. Introduction

Pachyrhizus erosus (Fabaceae) is a tropical herb, native from México and Central America. In México, *P. erosus* is known as 'jicama', and profusely cultivated since pre-Columbian time due to it is edible subterranean tubercles. It has been introduced with the name 'yam bean' as a crop into India, China and the USA, and used as a food ingredient (Alavez et al. 1998; Béjar et al. 2000). Rotenone is present in the seeds of *P. erosus*, and is well known as insect pesticide (Alavez et al. 1998; Béjar et al. 2000). However, in the last 20 years rotenoids have acquired pharmacological interest due to their antitumour properties (Kardono et al. 1990). Rotenone has shown potent cytotoxic activity against several human tumour cell lines, such as breast (MCF-7; IC₅₀ = 20 nM) and lung (A-549; IC₅₀ = 25 nM). Rotenone induces the production of reactive oxygen species (ROS) which can damage DNA, RNA and proteins, eventually leading to cell death (Gao et al. 2002; Li et al. 2003). In this study, we isolated four isoflavonoids from *P. erosus* seeds and examined the cytotoxicity of such compounds against K562 human leukaemia cells *in vitro*, and delve into the cellular and molecular mechanisms involved in the cytotoxicity of rotenone to these cells.

*Corresponding author. Email: chilpa@unam.mx

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The acetone extract of *P. erosus* seeds was subjected to column chromatography (Silica Gel 60) as previously described (Alavez et al. 1998), obtaining four isoflavonoids: rotenone, dolineone, 12a-hydroxypachyrhizone and pachyrhizine (Figure 1(A)–(D)), and their yields were 0.01%, 0.006%, 0.004% and 0.006%, respectively. The yield of the acetone extract was 0.35%.

2.2. Cytotoxic assay

The viability of K562 cells treated with the acetone extract from *P. erosus* seeds, or the isolated compounds, was determined by the MTT assay. The *P. erosus* extract and rotenone displayed IC_{50} 40.5 μ g/mL and 13.05 μ M, respectively. None of the other three isolated isoflavonoids exhibited cytotoxic activity (maximum concentration evaluated was 150 μ M). These results agree with previous studies showing that rotenone displays cytotoxicity against several human tumour cell lines (Sakurai et al. 2006). Also extracts containing rotenone from other Fabaceae species, such as *Antheroporum pierrei*, had also displayed cytotoxic effect against human tumour cell lines C38 and L1210 (Gao et al. 2011). Regarding structure/activity relationship, rotenone was the only prenylated isoflavonoid. Interestingly, Cassidy and Setzer (2010) established that prenylated isoflavonoids are more active against several cancer proteins than non-prenylated isoflavonoids in a docking analysis (Cassidy & Setzer 2010).

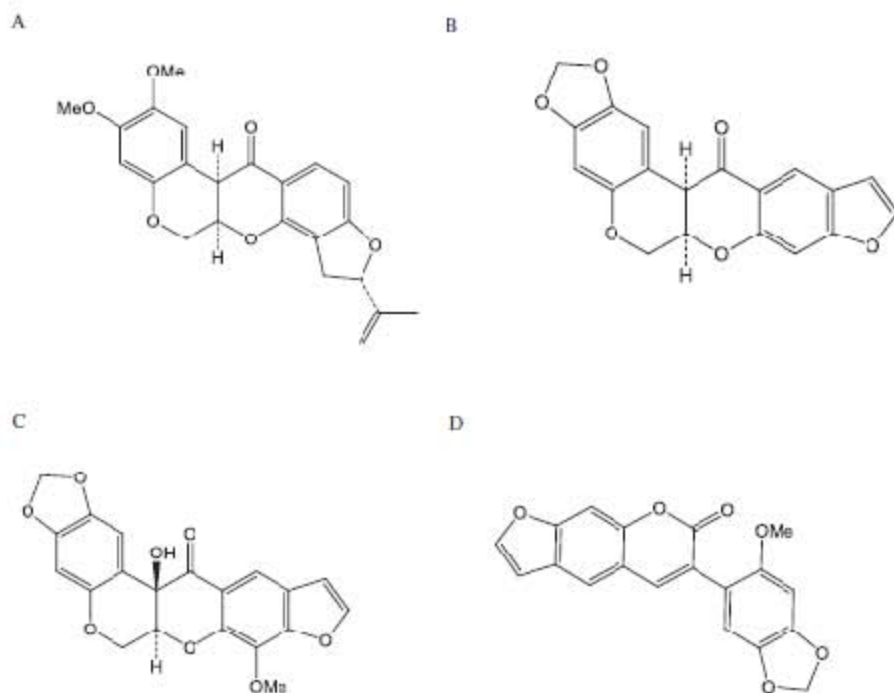


Figure 1. Structure of isoflavonoids. (A) Rotenone, (B) dolineone, (C) 12a-hydroxypachyrhizone and (D) pachyrhizine.

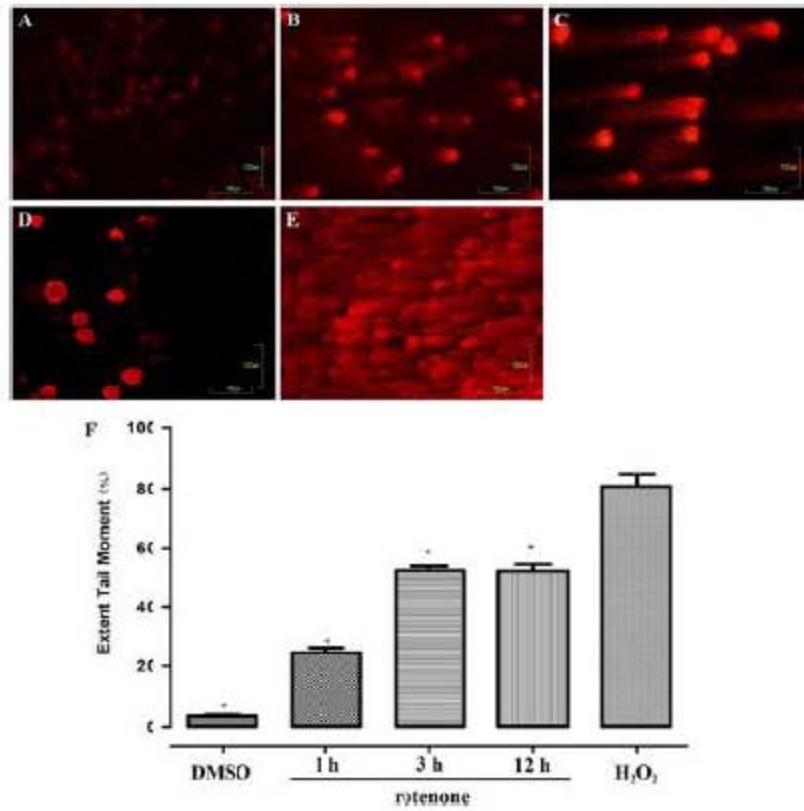


Figure 2. Genotoxicity induced by rotenone on K562 cells. Photomicrographs of K562 cells after (A) 1 h, (B) 3 h and (C) 12 h of rotenone treatment (13.05 μ M). (D) Vehicle (DMSO; 12 h) and (E) positive control (H₂O₂). Scale bar = 100 μ m. (F) Extent of tail moment. Data shown are means from four independent experiments with standard deviation. * $p \leq 0.05$.

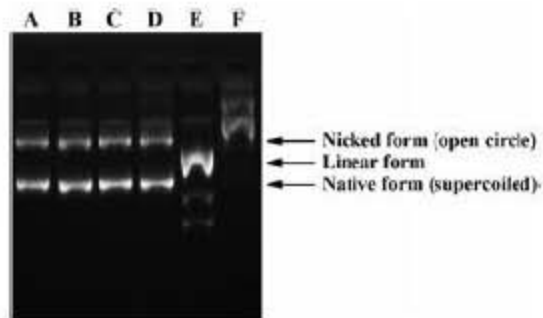


Figure 3. Plasmid nicking assay of rotenone. Electrophoretic pattern of pDEST26 DNA incubated with different treatments. (A) Untreated pDEST26, (B) vehicle (DMSO), (C) rotenone (13.05 μ M), (D) rotenone (130 μ M), (E) positive control (*Eco*RI endonuclease) and (F) Fenton's reagent.

2.3. Single-cell gel electrophoresis (comet assay)

The comet assay was performed to detect DNA damage in K562 cells. DNA damage induced by rotenone ($IC_{50} = 13.05 \mu\text{M}$) was evident after 1 h, peaked at 3 h and maintained after 12 h of treatment (Figure 2). The positive control H_2O_2 (10%) induced more than 80% of DNA damage after 15 min. Comet assay indicated that rotenone induced genotoxicity 1 h after treatment on K562 cells (Figure 2). It has been reported that other isoflavonoids, such as genistein, equol and daidzein also induce DNA damage in human tumour cell lines as evaluated by this assay (Pool-Zobel et al. 2000).

2.4. Plasmid nicking assay

In order to validate rotenone activity directly on DNA structure, pDEST26 DNA was treated with two different concentrations of rotenone (13.05 and 130 μM). The DNA pattern of both treatments was similar to the negative control (DMSO), but was different from the sample treated with positive control (Fenton's reagent and *Eco* RI endonuclease) (Figure 3). These findings indicated that rotenone did not induce any structural effect on naked DNA, unlike Fenton's reagent that induces DNA random damage by hydroxyl radicals or as *Eco* RI endonuclease that produces DNA cutting at specific nucleotides (one restriction site). This suggests that rotenone did not interact directly with DNA (Figure 3). However, it has been reported that rotenone may induce DNA damage through production of reactive oxygen (Radad et al. 2006; Deng et al. 2010). This supports that the DNA damage observed in the comet assay may be due to the production of ROS.

2.5. TUNEL assay

TUNEL assay detects DNA fragmentation and suggests cell death by apoptosis. Other biochemical changes that can be observed are chromatin condensation and nuclear fragmentation (González-Sánchez et al. 2011). Observation by fluorescence microscope revealed small bright dots representing chromatin condensation and/or nuclear fragmentation after 24 h of rotenone exposure in K562 cells. Cells treated with vehicle (DMSO) did not show DNA fragmentation. Taxol was used as positive control at 250 nM (Figure 4). Rotenone (13.05 μM) was positive in TUNEL at 24 h in K562 cells (Figures 4 and 5), indicating that cell death might be due to apoptosis induction. The rotenoid deguelin also induced TUNEL-positive cells and caspase-3 is activated in human Caucasian colon adenocarcinoma (COLO205) and colorectal carcinoma cell line (HCT116) (Kang et al. 2012).

2.6. Caspase-3 activity assay

Caspase-3 is an executioner caspase in apoptotic cell death and its activation is a crucial event leading to apoptosis (Eom et al. 2010). The executioner caspase-3 was investigated to further

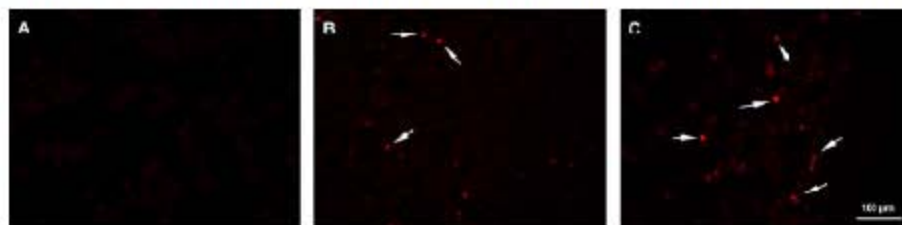


Figure 4. DNA fragmentation K562 cells determined by TUNEL assay. Cells were observed under fluorescence microscope after 24 h of treatment. (A) Negative control (DMSO; 0.28%), (B) positive control (taxol; 250 nM) and (C) rotenone (13.05 μM). Arrows show nuclei fragmentation. Scale bar = 100 μm .

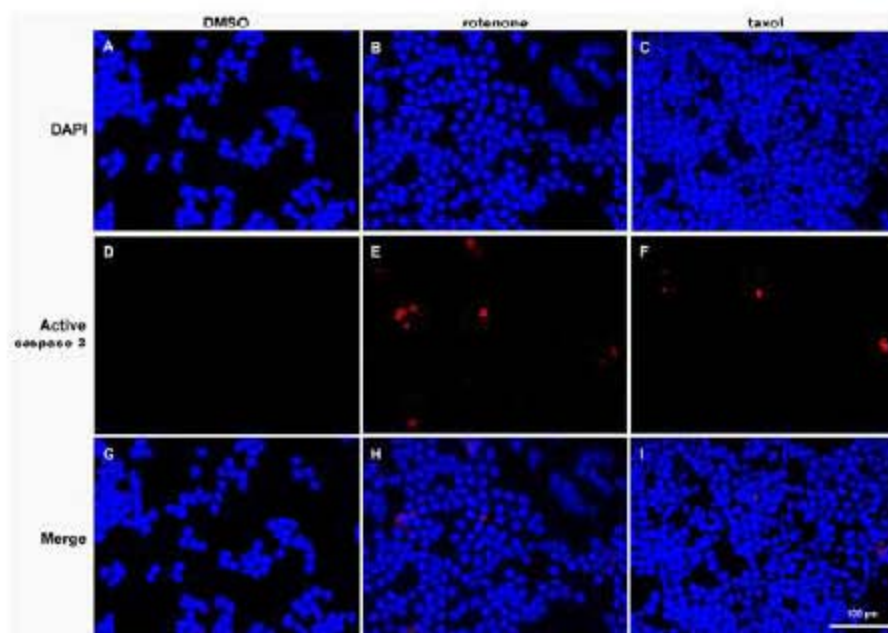


Figure 5. Caspase-3 activated after rotenone treatment. Immunocytofluorescence analysis for activated caspase-3 in K562 cells. Cells treated with negative control (DMSO; A, D, G), rotenone (B, E, H) and positive control (taxol; C, F, I) at 24 h. DAPI-stained cells (A, B, C), anti-activated caspase-3 antibody (D, E, F) and merge (G, H, I). Scale bar = 100 μ m.

explore the cell death mechanism after rotenone treatment. It was observed that caspase-3 was activated after rotenone treatment and taxol at 24 h. As expected, the cells treated with DMSO were negative for active caspase-3 (Figure 5). These results are in accordance with previous studies showing that rotenone (1 μ M) induced the release of cytochrome *c* into the cytosol and caspase-dependent programmed cell death in SAS human tumour line (Lee et al. 2008). Moreover, other antineoplastic compounds tested in K562 cells induced TUNEL-positive cells and the activation of caspases (González-Sánchez et al. 2011).

3. Conclusion

Rotenone induces cytotoxicity via apoptosis in K562 cells through caspase-3 activation. These results provide new insights into the molecular mechanisms involved in the rotenone-mediated cytotoxicity.

Supplementary material

Supplementary material relating to this article is available online, alongside Materials and methods.

Acknowledgements

We are also grateful to María del Rocío Patiño Moya (IR), María de los Ángeles Peña González (RMN), Francisco Javier Pérez Flores (EM) for spectroscopical determination, to Alberto Javier Reyes García and Araceli Zarate Aquino for botanical assistance. The authors have declared no conflict of interest.

Funding

This research was supported by a grant IG-200513 from PAPIIT-DGAPA-UNAM. E.A. Estrella-Parra is grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (PCB-UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 220355) for providing a scholarship for Ph.D. studies. I. González-Sánchez was supported by a post-doctoral grant (DGAPA-UNAM).

References

- Alavez D, Reyes C, Jiménez M, Villavicencio M, Pérez E, Gómez F. 1998. Chemical study and insecticidal activity of *Pachyrhizus erosus* (L.) seeds. In: Proceedings of the 2nd International Symposium on Tuberous Legumes. 1996 August 5–8; Celaya, Guanajuato, Mexico. Copenhagen: MacKenzie; p. 535–548.
- Béjar E, Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada M. 2000. Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine. In: Studies in natural products chemistry. Amsterdam: Elsevier; p. 799–844.
- Casikly C, Setzer W. 2010. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic *Lamchocarpus* flavonoids: a molecular docking analysis. *J Mol Model*. 16:311–326.
- Deng YT, Huang HC, Lin JK. 2010. Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. *Mol Carcinog*. 49:141–151.
- Eom HS, Lee EJ, Yoon BS, Yoo BS. 2010. Propolis inhibits the proliferation of human leukaemia HL-60 cells by inducing apoptosis through the mitochondrial pathway. *Nat Prod Res*. 24:375–386.
- Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. 2002. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci*. 22:782–790.
- Gao S, Xu YM, Valeriote FA, Gunatillaka AA. 2011. Pierreones A–D: solid tumor selective pyranosylflavones and other cytotoxic constituents from *Antheroporum pierrei*. *J Nat Prod*. 74:852–856.
- González-Sánchez I, Solano JD, Laza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A, Corbón MA. 2011. Antineoplastic activity of the triazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem*. 46:2102–2108.
- Kang HW, Kim JM, Cha MY, Jung HC, Song IS, Kim JS. 2012. Deguelin, an Akt inhibitor, down-regulates NF- κ B signaling and induces apoptosis in colon cancer cells and inhibits tumor growth in mice. *Dig Dis Sci*. 57:2873–2882.
- Kardono LBS, Tsauri S, Padmawinata K, Pezzuto JM, Kinghorn AD. 1990. Cytotoxic constituents of the seeds of *Pachyrhizus erosus*. *Planta Med*. 56:673–674.
- Lee JH, Lee DH, Lee HS, Choi JS, Kim KW, Hong SS. 2008. Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis. *Oncol Rep*. 20:129–134.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robison JP. 2003. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 278:8516–8525.
- Pooi-Zobel BL, Adlercreutz H, Gli M, Liegibel UM, Sittlinger J, Rowland I, Wahala K, Rechkemmer G. 2000. Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis*. 21:1247–1252.
- Radad K, Rausch W-D, Gille G. 2006. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int*. 49:379–386.
- Sakurai Y, Sakurai N, Taniguchi M, Nakanishi Y, Bastow KF, Wang X, Cragg GM, Lee KH. 2006. Raurandiols A and B, pterocarpans and cytotoxic constituents from *Neorautanenia nitis*. *J Nat Prod*. 69:397–399.

9

Rotenoids as Anticancer Agents

E. Estrella-Parra^{1,2}, M. Cerbón¹, J. Gomez-Verjan^{2,2},
I. Gonzalez-Sanchez^{1,2}, E.R. Vázquez-Martínez²,
J.C. Paez-Franco² and R. Reyes-Chilpa^{1*}

ABSTRACT

The rotenoids are secondary metabolites isolated from different plant species of the Fabaceae family, some of them well known due to their insecticide and acaricide properties; in addition, some have shown to possess anticancer activity against several human tumor cell lines. In the present contribution we review 25 rotenoids that have been evaluated *in vitro* against 48 tumor cell lines, as well as their *in vivo* antitumor and chemopreventive activity. Two of these rotenoids, rotenone and deguelin, have been thoroughly studied for their anticancer properties. Rotenone has shown high cytotoxic activity against MCF-7 cells ($IC_{50}=4.4$ nM), as well as chemopreventive and antitumor activity *in vivo* on mice, by inducing up-regulation of p53, inhibition of proliferation, and down regulation of the C-MYC gene. On the other hand, deguelin inhibits 100 per cent of pre-neoplastic injuries on mice at 10 µg/mL. In conclusion, rotenoids are metabolites with high cytotoxic activity against several cell lines, as well as chemopreventive activity *in vivo* and *in vitro*. Therefore, rotenoids could be prototypes for the development of new drugs in cancer chemotherapy.

Keywords: Anticancer agents, Cytotoxicity, Deguelin, Rotenoids, Rotenone.

1 Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

2 Departamento de Biología Celular, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

* Corresponding author: E-mail: chilpa@unam.mx

Introduction

Cancer

Cancer is defined as a group of diseases characterized by unregulated cell growth, invasion and spread from the original site to other parts of the body (Pecorino, 2012). Any of the 100 or more cell types in the human body can transform to malignant tissue. Tumor cells arise from normal cell by different types of mutations on protooncogenes or tumor suppressor genes. These changes may be result of exposure to physical, chemical or biological carcinogens. Metastasis in cancer is the leading cause of death in patients, and occurs through multiple steps involving the invasion of a primary tumor into the bloodstream, subsequent migration of tumor cells to diverse organs, adhesion to endothelial cells and infiltration into the tissues (Matsuda *et al.*, 2007). Thereby, cancer classified according to the tissue and cell type where is localized. For example, if cancer arises from epithelial cells it is called "carcinoma"; if it originates from connective tissue or muscle cells is called "sarcoma" finally if the cancer does not belong to any of these categories is called "leukemia".

The World Health Organization (WHO) in 2014 estimated that the leading cause of death worldwide in 2012 was cancer, with 8.3 million cases, mainly from lung cancer, stomach, liver, colon and breast (WHO, 2012). These cancer types are different by gender, where in 2012 the most frequent cancers in women are breast, colorectum, cervix uteri, lung and stomach while in men the most frequent cancers are lung, prostate, colorectum, stomach and liver (Ferlay *et al.*, 2010).

Cancer treatment include several strategies, such as chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy and surgery, and it is determined by the cancer type or stage. In the chemotherapy, cytotoxic drugs are administered to induce cell death in tumor cells. However, cancer cells develop resistance to majority of drugs currently used in anticancer therapy. It is also important to note that the high costs of these treatments and the harmful side effects for the patient. In this scenario, rotenoids, which are secondary metabolites from plants, could represent an opportunity for development new drugs against cancer.

Rotenoids

Rotenoids (Figure 9.1) are secondary metabolites from plants are included in the group of the flavonoids, particularly isoflavonoids. The rotenoids are synthesized by species of the family *Fabaceae*, subfamily *Papilionoideae*. Historically, rotenoids have been known for their insecticidal, acaricidal and pesticidal activity (Sørensen, 1956); however, in the last twenty years, rotenoids have acquired pharmacological interest for their antitumor properties (Kardono *et al.*, 1990). Since many rotenoids possess high cytotoxicity against several human tumor cell lines (Lee *et al.*, 2010; Li *et al.*, 1993), they also constitute a source of potential anticancer agents (Ito *et al.*, 2004).

Cytotoxic Properties of Rotenoids

Until 2014, 25 rotenoids have been examined the cytotoxic properties. They comprise 13- α -hydroxyleptuosin (6), 1-hydroxyleptuosin (7), 4-leptuosin, 5'-dihydro-11, 5'-dihydroxy-4'-methoxytephrosin (14), deguelin, 6a,12a-dehydrodeguelin (15),

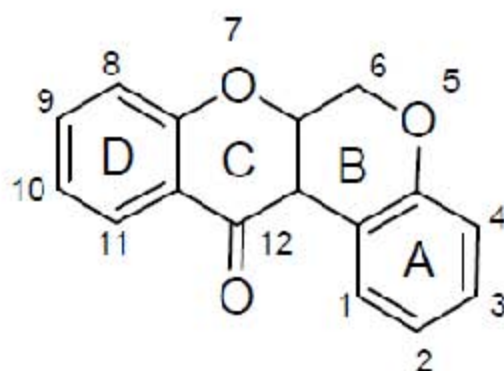


Figure 9.1: General Structure of a Rotenoid.

rotenone (1), 12a-hydroxyrotenone (5), 12a-hydroxyerosone (16), rotenolone (11), dalpanol (17), 12a,β-hydroxydalpanol (18), 6'-β-D-β-glucopyranosildalpanol (19), α-toxicarol (9), 6a,12a-dehydro-α-toxicarol (4), sumatrol (8), 6-deoxyditoxicetal (12), amorphigenin (20), 12aβ-hydroxyamorphigenine (21), amorphispironone (10), boeravinone G (22), boeravinone II (23), elliptone (13), 6α,12α-12a-hydroxyelliptone (24) and villosinol (25).

The most studied rotenoids are rotenone (1), deguelin (2), tephrosin (3), 6a,12a-dehydro-α-toxicarol (4) and 2a-hydroxyrotenone (5). Most studies were focused on the evaluation of their *in vitro* cytotoxic properties, as well as their *in vivo* antitumor and their chemopreventive properties (preventing the development of cells malignancies). In the current review cytotoxicity classification of Sangthong *et al.* (2011) was adopted. The cytotoxicity categories are based on average inhibition values (IC_{50}) as follows: very high (<1 μM), high (1-10 μM), moderate (10-50 μM), low (50-100 μM) and without activity (>100 μM). Cytotoxic activity classification depends on the compound and the cancer cell line tested (Sangthong *et al.*, 2011). On the other hand, regarding chemopreventive properties classification (chemopreventive: involves the use of chemicals or dietary compounds to block or inhibit development of cancer in normal or preneoplastic tissue) (Jang *et al.*, 2003), was assumed as follows: chemopreventive effect exists if the inhibition of QK (quinone reductase) is <10 μg/mL. To date of the current review, the most potent rotenoids regarding cytotoxic activity are rotenone (1) (Table 9.1), deguelin (2) (Table 9.3), tephrosin (3) (Table 9.5), and 12-hydroxyrotenone (Table 9.7). On the other hand, the most effective rotenoids for *in vivo* antitumor and chemopreventive properties are rotenone (1) (Table 9.2), deguelin (2) (Table 9.4), and tephrosin (3) (Table 9.6).

Regarding the *in vitro* cytotoxic activity, rotenoids have been tested against 47 human and mouse origin cancer cells lines. Rotenone (1) is the most studied rotenoid it has been tested against 22 human cancer cells lines (Table 9.1) displaying an IC_{50} of 20-25 nM against MCF-7 and A-549 cells lines, respectively (Sakurai *et al.*, 2006). Other rotenoids with cytotoxic activity at nanomolar concentrations are: deguelin

Table 9.1: *In vitro* Cytotoxic Assays and Chemoprevention of Roierone

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>Citrona macrophylla</i>	P-388	Unknown	(Lin <i>et al.</i> , 1992)
	IC ₅₀ =0.011 μM		
	KB		
	IC ₅₀ =0.9 μM		
<i>Lonchocarpus utilis</i> and <i>L. urucú</i>	KB-V1	Inhibits ODC	(Fang and Gesida, 1993)
	IC ₅₀ =6.9 μM		
<i>Lonchocarpus</i> <i>aff. fluvialis</i>	LNCaP	Unknown	(Blatt <i>et al.</i> , 2002)
	IC ₅₀ >0.4 μM		
	SKNSH		
	IC ₅₀ =4.6 μM		
	KD		
<i>Derris trifolata</i>	Lu 1	Inhibition of EBV-EA	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
	IC ₅₀ <0.4 μM		
	Raji cells with EBV-EA		
	Inhibited 100 per cent		
	(32 nM)		
<i>Neurotanenia mitis</i>	MCF-7	Unknown	(Sakumi <i>et al.</i> , 2006)
	IC ₅₀ =20 nM		
	A-549		
	IC ₅₀ =25 nM		
<i>Derris trifolata</i>	HT-1080:	Unknown	(Matsuda <i>et al.</i> , 2007)
	Inhibition of		
	93.5 per cent -72 h		
	U937		
<i>Derris trifolata</i>	IC ₅₀ =13 μM (24h),	Unknown	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	0.2 μM (48h) and		
	0.07 μM (72h)		
	KB		
<i>Lonchocarpus haberi</i>	IC ₅₀ =1.7 μM	Unknown	(Cassidy and Setzer, 2010)
	BC		
	IC ₅₀ =0.2 μM		
<i>Lonchocarpus haberi</i>	NCI-H187	Prenylated compounds inhibit PTK, ODC, COX-1 Y2, PKC, the binding site of A1P from topoisomerase II, PI3K	(Cassidy and Setzer, 2010)
	IC ₅₀ =0.05 μM		
<i>Lonchocarpus haberi</i>	Molecular computational analysis of prenylated flavonoids, among them roierone.		

Contd

Table 9.1—Contd...

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
Leaf of <i>Antheroporum piperi</i>	MCF-7	ROS induced apoptosis through JNK/p38 and MAPK's activation	(Deng <i>et al.</i> , 2010)
	NH313 IC ₅₀ = 5 μM (48 h)	Unknown	
	C-38 IC ₅₀ = 0.23 μg/mL	Unknown	(Gao <i>et al.</i> , 2011)
	L1210 IC ₅₀ = 0.045 μg/mL	Unknown	
Rotenone (Sigma Aldrich)	8505 C and CMPBR3 IC ₅₀ = 5 μM	Increased activity of p53 inducing apoptosis.	(Goncalves <i>et al.</i> , 2011)
	TPC 1 IC ₅₀ = 3 μM	Nuclear p53 accumulation, inducing cell death.	
	TPC-1 Rotenone IC ₅₀ = 500 nM	G2/M induced cell death (15.27 per cent)	
	TPC 1 IC ₅₀ = 500 nM rotenone	Rotenone: Arrest in G2/M phase	

P-388 human leukemia cell, KB: human leukemia cell, KB-V1: Vinblastine-resistant human leukemia cell, MCF-7: human breast adenocarcinoma cell, LNCaP: human prostate adenocarcinoma cell, A549: human lung adenocarcinoma epithelial cell, SKNSH: human neuroblastoma cell, Lu1: lung carcinoma cells, EBV-EA: Epstein Barr virus early antigen, HT1080: human fibrosarcoma cell, BC: breast cancer cell, NCI H187: human lung carcinoma cell, Cal27: oral adenocarcinoma carcinoma cell, Tw2.0: oral adenocarcinoma carcinoma cell, OMFs: oral mucosa fibroblast, NIH3T3: mouse embryo fibroblast, C38: colon adenocarcinoma cell, L1210: mouse lymphocyte leukemia cells, TPC-1: human thyroid tumor cell.

(2) (Table 9.3), amorphenine (20), 12- α -hydroxyamorphenine (21) (Table 9.8), and 12 α -hydroxyamorphenine (21) displaying an IC₅₀ > 1 < 10 μM in six different cancer cell lines (Table 9.8). Rotenoids that show moderate cytotoxic activity (10 μM < IC₅₀ < 50 μM) are tephrosin (3) (IC₅₀ = 86.3 μM against U9375-G2 cells; Table 9.5), 2a-hydroxyrotenone (5) (IC₅₀ = 25 μM against MCF-7 cells, IC₅₀ = 15 μM against A-549 cells; Table 9.7) and C-deoxychlorogenic acid (IC₅₀ = 30 μM against KB cells; Table 9.8).

Structure/activity relationship also has been examined for rotenoids, Sakurai *et al.* (2006) compared cytotoxic activity between rotenone (1) (Table 9.1) and 12 α -hydroxyrotenone (16) (Table 9.7). Rotenone (1) is more active than 12 α -hydroxyrotenone (16), which highlight the following structural differences between both compounds (Sakurai *et al.*, 2006). The furan ring (E) of rotenone (1) is angular respective of the carbons C8 and C9, while in 12 α -hydroxyrotenone (16) is linear respective of the carbons C9 and C10. This structure/activity relationship was tested *in silico* by Cassidy and Setzer (2010), in which they established that prenylated isoflavonoids are more active against several cancer proteins than non prenylated isoflavonoids, for instance the 6a α , 12 α -12 α -hydroxyelliptone (24) shows a high cytotoxic activity

Table 9.2: *In vivo* Cytotoxic Assays of Rotenone

Source	Strain	Pharmacological Mechanism	Reference
No source mentioned	75 mg/Kg, 24 months	Tumor inhibition	(Haley, 1978)
No source mentioned	Rats (Fisher 344) with a dietetic exposition during 24 months with different doses (7.5, 37.5, 75.0 mg/Kg)	Did not induced tumors or reproductive problems in rats.	(Marking, 1988)
No source mentioned	Male mice ((B6C3F1) with hepatic tumours. The treatment with rotenone (75 ppm) inhibits 93 per cent of tumors	No negative effects on hepatic cell β -oxidation and catalase.	(Cunningham <i>et al.</i> , 1995)
No source mentioned.	Mouse (B6C3F1). Rotenone (600 ppm) significantly increase in apoptotic hepatocytes 90 per cent	Increases P53 gene activity. H-Ras diminution	(Wang <i>et al.</i> , 1999)
No source mentioned.	Rats (F344) Rotenone (300 ppm/200 days)	Inhibitory effect of rotenone on dysplasias lesions (liver and tongue), reducing the size of carcinoma from 33 to 16 per cent. Severe dysplasia was reduced 60 to 42 per cent.	(Tanaka <i>et al.</i> , 2002)

Table 9.3: *In vitro* Cytotoxic Assays of Deguelin

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>Mundulea sericea</i>	308 IC ₅₀ = 0.0007 μ M	Inhibits ODC	(Gerhäuser <i>et al.</i> , 1995)
Obtained by synthesis from rotenone	BALB/c 3T3 IC ₅₀ = 0.0005 μ g/mL	Inhibits ODC activity	(Gerhäuser <i>et al.</i> , 1997)
	MCF-7 IC ₅₀ = 6.0 nM	Unknown	(Fang and Casida, 1998)
Semicynthetic from rotenone (Sigma-Aldrich)	SAS IC ₅₀ =0.95 μ M	Unknown	(Lee <i>et al.</i> , 2008)
	C2D7 IC ₅₀ =0.11 μ M		
	TW2.6 IC ₅₀ =1.24 μ M		
	OMFs IC ₅₀ =31.43		
	SAS (1 μ M)	Release of Cytochrome C	

Contd...

Table 9.3–Contd...

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>Derris trifoliata</i>	Faj with EBV-EA Inhibits 90.5 per cent (32 nM)	Inhibition of EBV-EA	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
<i>Erycbe expansa</i>	HT 1080 IC ₅₀ = 30 μM-72 h U 937 IC ₅₀ = 12 μM-24 h IC ₅₀ = 16 μM-40 h IC ₅₀ = 3.8 μM-72 h	Unknown	(Matsuda <i>et al.</i> , 2007)
<i>Amorpha fruticosa</i>	HeLa IC ₅₀ = 0.22 μM RAW2647.7 IC ₅₀ = 1.73 μM	Inhibition of NF-κB Unknown	(Dot <i>et al.</i> , 2000)

Hepa 1c1c7: mouse hepatoma cell, HeLa: human cervical carcinoma cell, RAW2647: Mouse leukemic monocyte-macrophage cell, HL-60: human promyelocytic leukemia cell, HT1080: human fibrosarcoma cell, U937: human histiocytic lymphoma cell, BALB/c-3T3: BALB/c mouse embryos fibroblast cells, Gal27: oral adenocarcinoma cell, Tw2.0: oral adenocarcinoma cell, OMFs: oral mucosa fibroblast.

Table 9.4: *In vivo* Cytotoxic Assays of Deguelin

Species	Mouse Strain	Effect	Reference
<i>Mundulea sericea</i>	GL-1 10 μg/mL	Inhibition of preneoplastic injuries (100 per cent) in mammary tissues of mouse	(Gerhauser <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mundulea sericea</i>	GD-1 (female)	33 μg deguelin/0.2 mL acetone reduced 86 per cent of tumor 330 μg deguelin/0.2 mL acetone reduced 86 per cent of tumor 33 μg deguelin/0.2 mL de acetone reduced (75 per cent) the activity of ODC induced for TPA 330 μg deguelin/0.2 mL de acetone reduced (100 per cent) the activity of ODC induced for TPA	(Udeani <i>et al.</i> , 1997)
<i>Derris trifoliata</i>	ICR (female, 05 nM)	Inhibited the 100 per cent of mammary tissues of mouse	(Ito <i>et al.</i> , 2004)

against four different cancer cells lines (IC₅₀ < 0.3–4.6 μM) (Blatt *et al.*, 2002; Table 9.8) (Cassidy and Setzer 2010). In addition, other non prenilated rotenoids show high and moderate cytotoxic activity against different cancer cells lines (e.g. elliptone, boeravinone C and H and 12a hydroxyroone), as stated in Table 9.8. On the other hand, boeravinones H (23) and G (22) (Table 9.8) showed an IC₅₀ of 3.0–0.7 μM against HEK 293 cells, respectively (Ahmed Belkacem *et al.*, 2007). The difference between

Table 9.5: *In vitro* and *In vivo* Cytotoxic Assays of Tephrosin

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>In vitro</i>			
<i>Murdulea sericea</i>	HL-60	PKC not activated	(Gerhäuser <i>et al.</i> , 1995)
<i>Lonchocarpus utilis</i> y <i>L. uruou</i>	MCF-7 IC ₅₀ = 08 nM	Activates ODC	(Fang and Casida, 1003)
<i>Erycibe expansa</i>	HLT1080 IC ₅₀ = 10 µM U937 IC ₅₀ =7.3µM 72 h	Inhibition of metallo-proteinases 2 and 6 Unknown	(Matsuda <i>et al.</i> , 2007)
<i>Amorpha fruticosa</i>	HeLa IC ₅₀ = 0.11 µM RAW2647.7 IC ₅₀ =2.0 µM	Inhibition of NF-κB	(Dai <i>et al.</i> , 2008)
<i>Amorpha fruticosa</i>	U3375-S2 IC ₅₀ = 86.3 µM	Unknown	(Jiang <i>et al.</i> , 2008)
<i>Demis trifoliata</i>	GNU-404, ACG y MKN-28 1 µM	Induces chromatin condensation and DNA fragmentation. Inhibition of G2/M phase. Apoptosis induction for caspases 3 and 9. Activates Akt	(Lee <i>et al.</i> , 2010)
<i>Amorpha fruticosa</i>	HIT-29	Inhibits Er32 and FGFR receptors	(Choi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Antheroporum pierei</i>	HCT-116 IC ₅₀ =0.047 µg/ml	Unknown	(Gao <i>et al.</i> , 2011)
<i>In vivo</i>			
Source	Strain	Mechanism of Action	Reference
<i>Murdulea sericea</i>	CD-1 IC ₅₀ = 0.005µM 10µg/mL	Inhibits ODC Inhibition of preneoplastic injuries (89 per cent) in mammary tissues of mouse.	(Gerhäuser <i>et al.</i> , 1995)

HL-60: human promyelocytic leukemia cell HT1080: human fibrosarcoma cell A549: human alveolar basal epithelial cell, Bel 7402: hepatoma cell line, P388: mouse leukaemia cell, HT 29: human intestinal epithelial cells, HCT-116: colorectal carcinoma cell, HeLa: human cervical carcinoma cell, RAW264.7 mouse leukemic monocyte macrophage cell, U3375-S2: human melanoma cell.

both rotenoids is a methyl group located at the carbon C10 of the ring D in the boeravinone H (23), which is absent in boeravinone G (22). This suggests that the methyl group could be important in the pharmacophore site of this rotenoid.

Table 9.6: *In vitro* and *in vivo* Cytotoxic Assays of 6a, 12a-dihydro- α -tococarol

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>In vitro</i>			
<i>Tephrosia toxicaria</i>	Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 47 μ M Hepa 1c1c7 Induction QR (23 μ M)	Unknown Non activation of QR	(Jung et al., 2003)
<i>Macaranga trioba</i>	Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 10 μ g/mL	Non activation of QR	(Dae Sik Jang et al., 2004)
<i>Amorpha fruticosa</i>	US375-S2 IC ₅₀ = 93.5 μ M	Unknown	(Jiang et al., 2008)
<i>In vivo</i>			
Source	Strain	Mechanism of Action	Reference
<i>Tephrosia toxicaria</i>	Mouse mammary organ culture assay	Inhibition of preneoplastic lesions	(D. S. Jang et al., 2003)

QR: Quinone reductase, COX: cyclooxygenase, MMOC: mouse mammary organ culture, Hepa 1c1c7: mouse hepatoma cell, US375-S2: human melanoma cell.

Table 9.7: *In vitro* Cytotoxicity Assays of 12 α -hydroxyrotenone

Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
<i>Noorautencnia mitis</i>	MCF 7: IC ₅₀ = 25 μ M A-549: IC ₅₀ = 15 μ M	Unknown	(Sakurai et al., 2008)
<i>Erycibe expansa</i>	HT 1080 inhibition of 95 percent (72 h) U 937: IC ₅₀ = 3.3 μ M-24 h IC ₅₀ = 0.07 μ M -40 h IC ₅₀ = 0.09 μ M-72 h	Unknown	(Matsuda et al., 2007)
<i>Antheroporum pienei</i>	L1210 IC ₅₀ = 0.055 μ g/mL	Unknown	(Gao et al., 2011)

HEK-293: Human Embryonic Kidney, MCF-7: human breast adenocarcinoma cell, A549: human lung adenocarcinoma epithelial cell, HT 1080: human fibrosarcoma cell, U937: human histiocyte lymphoma cell, L1210: mouse lymphocyte leukemia cell.

Rotenoids may have similar mechanisms of cell death induction on different human cancer cells lines. In particular, rotenone (1) (Table 9.1) as well as tephrosin (3) (Table 9.5) at 1 μ M, induce apoptosis by cytochrome C release, which in turn activates caspases 3 and 9. In addition, rotenone (1) also activates the tumor suppressor protein p53 (Table 9.1) (Goncalves et al., 2011). In contrast, deguelin (2) (Table 9.3), tephrosin (3), and 13 α -hydroxytephrosin (6) (Table 9.8) downregulate the expression of the ornithine decarboxylase gene, a promising target in cancer (Gerhäuser et al.,

Table 9.8: *In vitro* cytotoxic and chemoprevention assays of other rotenoids.

Rotenoid	Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
13 α -hydroxitephrosin	<i>Mundulea sericea</i>	308 IC ₅₀ = 0.02 μ g/mL	Inhibits ODC	(Luyengi et al., 1994)
	<i>Mundulea sericea</i>	308 IC ₅₀ = 0.03 μ M	Inhibits ODC	(Gerhäuser et al., 1995)
		HL-60 IC ₅₀ > 10 μ M	Unknown	
11-Hydroxitephrosin	<i>Tephrosia toxicaria</i>	Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 23 μ M	Unknown	(Jang et al., 2003)
		Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 47 μ M	Activation of QR	
	<i>Amorpha fruticosa</i>	RAW264.7 IC ₅₀ = 4.21 μ M	Inhibits activity of NF- κ B	(Dai et al., 2003)
Sumetrol	<i>Lonchocarpus att. thuyalis</i>	LNCaH: IC ₅₀ > 0.4 μ M	Unknown	(Batt et al., 2002)
		SKNSH: IC ₅₀ = 0.1 μ M		
		KB: IC ₅₀ < 0.3 μ M		
		Lu 1 IC ₅₀ < 0.3 μ M		
	<i>Tephrosia toxicaria</i>	Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 47 μ M	Unknown	(Jang et al., 2003)
		Hepa 1c1c7 1c1c7 IC ₅₀ > 23 μ M	Unknown	
α -toxicarol	<i>Derris trifoliata</i>	Raji with EBV-EA, inhibition of 89.1 per cent at 32 nM	Inhibits EBV-EA	(Ito et al., 2004)
Amorfiapironone	<i>Amorpha fruticosa</i>	A-549 IC ₅₀ = 10 μ g/mL	Unknown	(Li et al., 1983)
		HCT-8 IC ₅₀ = 10 μ g/mL		
		TE071 IC ₅₀ = 10 μ g/mL		
		P338 IC ₅₀ = 10 μ g/mL		
		RPMI-7951 IC ₅₀ = 0.01 μ g/mL		
		KB IC ₅₀ = 0.58 μ g/mL		

Contd...

Table 9.8 Contd...

Rotenone	Source	Cell Line	Mechanism of Action	Reference
Rotenone	<i>Lonchocarpus utilis</i> and <i>L. urucu</i>	MCF-7 IC ₅₀ = 285 nM	Inhibits ODC	(Fang and Gasida, 1968)
		<i>Pongamiopsis pervilleana</i>	DT-549 IC ₅₀ = 2.6 μM	Unknown
		PII 145 IC ₅₀ = 2.7 μM		
		NSCLC NCI-H460 IC ₅₀ = 2.0 μM HCC-2696 IC ₅₀ = 2.9 μM		
6-Dioxiorotenone	<i>Citronia macrophylla</i>	F 388 IC ₅₀ = 0.001 μM	Unknown	(Lin et al., 1992)
		KB IC ₅₀ = 50 μM KB-V1 IC ₅₀ = 19 μM		
	<i>Stemona villosoe</i>	SW620 IC ₅₀ > 100 μM KATO IC ₅₀ > 100 μM B14/4 IC ₅₀ > 100 μM HCT-116 IC ₅₀ > 100 μM KRC-1 IC ₅₀ > 13.28 μM MCF-7 IC ₅₀ > 23.65 μM NCI-H107 IC ₅₀ > 3.12 μM CHAAGO IC ₅₀ > 100 μM	Unknown	(Sangthong et al., 2011)
Elliptone	<i>Derris trifoliata</i>	Raji with EBV-EA, inhibits 89.1 per cent 52 nM	Inhibits EBV-EA	(Ito et al., 2004)
4',5'-dihydro-11,5'-dihydroxy-4'-methoxytephrosin	<i>Tephrosia toxicaria</i>	Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 14.9 μM Hepa 1c1c7 IC ₅₀ > 10.7 μM	Unknown Activates the OR	(Jang et al., 2003)
6a, 12a-dehydrodeguelin	<i>Amorpha fruticosa</i>	UG375-52 IC ₅₀ = 176.2 μM	Unknown	(Jiang et al., 2008)
12a-hydroxyerucure	<i>Neorautanania tinis</i>	MCF 7 IC ₅₀ = 1.8 μg/mL A-549 IC ₅₀ = 3.3 μg/ml	Unknown	(Sakura et al., 2006)

Contd..

Table 9.0-Contd..

<i>Fotenoid</i>	<i>Source</i>	<i>CellLine</i>	<i>Mechanism of Action</i>	<i>Reference</i>
Dalpanol	<i>Amorpha fruticosa</i>	A-549	Unknown	(Li et al. 1993)
		IC_{50} -0.85 μ g/mL		
		HCT-8		
		IC_{50} -0.43 μ g/mL		
		RPMI-7951		
		IC_{50} -4.83 μ g/mL		
		TE671		
		IC_{50} -0.19 μ g/mL		
		KB		
		IC_{50} -0.89 μ g/mL		
17 α -hydroxydalpanol	<i>Amorpha fruticosa</i>	A-549	Unknown	(Li et al. 1993)
		IC_{50} -0.28 μ g/mL		
		KB		
		IC_{50} -3.67 μ g/mL		
		P388		
		IC_{50} -0.59 μ g/mL		
		TE671		
		IC_{50} -0.12 μ g/mL		
		RPMI-7951		
		IC_{50} -0.73 μ g/mL		
8'-O-C- β -glucopyranosildalpanol	<i>Amorpha fruticosa</i>	A-549	Unknown	(Li et al. 1993)
		IC_{50} -10 μ g/mL		
		HCT-8		
		IC_{50} -7.43 μ g/mL		
		RPMI-7951		
		IC_{50} -1.11 μ g/mL		
		TE671		
		IC_{50} -2.91 μ g/mL		
		KB		
		IC_{50} -6.32 μ g/mL		
Amorfenine	<i>Amorpha fruticosa</i>	A-549	Unknown	(Li et al. 1993)
		IC_{50} -0.05 μ g/mL		
		HCT-8		
		IC_{50} -0.03 μ g/mL		
		RPMI-7951		
IC_{50} -0.05 μ g/mL				

Contd...

Table 9.8–Contd...

<i>Potenoina</i>	<i>Source</i>	<i>CellLine</i>	<i>Mechanism of Action</i>	<i>Reference</i>
12αβ-hydroxyamorfigenine	<i>Amorpha fruticosa</i>	KB IC ₅₀ = 0.04 μg/mL	Unknown	(Li et al., 1993)
		P388 IC ₅₀ = 0.04 μg/mL		
		TE671 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		A-549 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		HCT 8 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		HPM1-7951 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		TE671 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		KR IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		P388 IC ₅₀ < 0.001 μg/mL		
		Boeravinones G and H		
HEK-293: Boeravinone H IC ₅₀ = 3.0 μM				
6αα, 12αα-12α-hydroxyelliptone	<i>Demis trifoliata</i>	Raji with EBV-EA, inhibits 80.1 per cent 30 nM	Inhibits EBV-EA	(Ito et al., 2004)
	<i>Lonchocarpus aff. stuvialis</i>	LNCaP IC ₅₀ > 0.4 μM	Unknown	(Blatt et al., 2002)
Villosol	<i>Lonchocarpus aff. stuvialis</i>	SKNSH IC ₅₀ = 4.6 μM	Unknown	
		KB IC ₅₀ < 0.4 μM		
		Lu 1 IC ₅₀ < 0.3 μM		
		SKNSH IC ₅₀ = 4.6 μM		
		KB IC ₅₀ < 0.4 μM)		

303: mouse keratinocyte cell, HL-60: human promyelocytic leukemia cell, Hepa 1c1c7: mouse hepatoma cell, HeLa: human cervical carcinoma cell, HAW264.7: mouse leukemic monocyte macrophage cell, LNCaP: human prostate adenocarcinoma cell, SKNSH: human neuroblastoma cell, KB: human leukemia cell, Lu1: lung carcinoma cells, A549: human alveolar basal epithelial cell, HCT 8: Human ileocecal adenocarcinoma cell, HPM1-7951: Human Skin Malignant Melanoma Cell, TE671: human medulloblastoma cell, P388: human lymphoblastic lymphoma cell, A 2780: human

ovarian cancer cell, BT-549: human breast carcinoma cell, DU 145, NSCLC, NCI-H160: human prostate cancer cell, HCC-2998: human colon adenocarcinoma cell, MCF-7: human breast adenocarcinoma cell, KB-V1: Vinblastine-resistant human leukemia cell, SW-620: Human colon adenocarcinoma cell, KATO: Human gastric carcinoma cell, HEP-G2: human liver carcinoma cell, NCI-H187 and CHAGO: Human lung bronchus carcinoma cell, HEK-293: Human Embryonic Kidney cells, U5375-S2: human melanoma cell, SKNSH: human neuroblastoma cell, QR: Quinone reductase, CDV-CA: Epstein Barr virus early antigen.

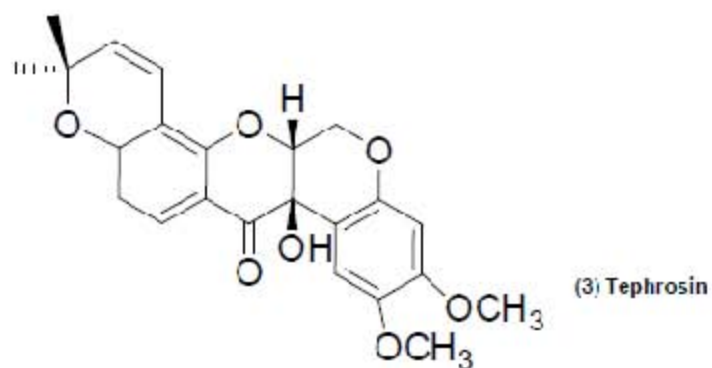
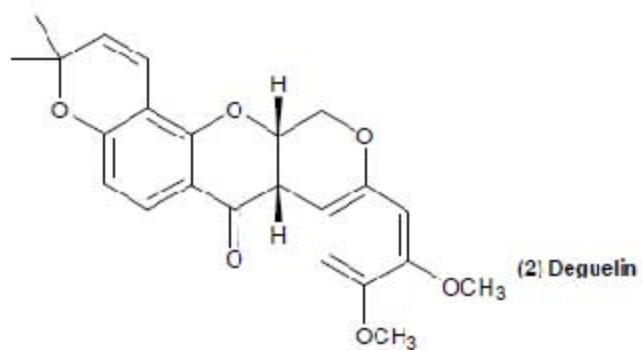
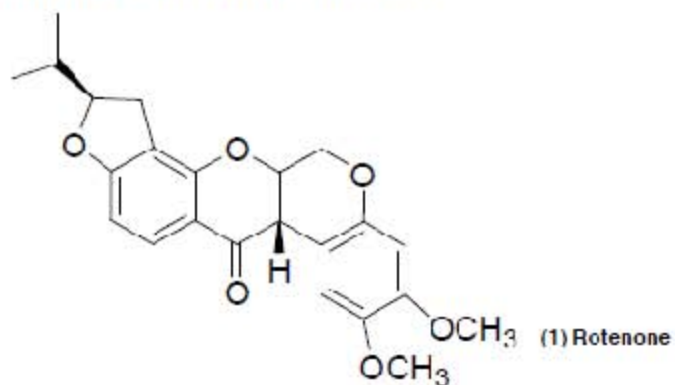
Table 9.9: In vivo Antitumor Activity Assays of Three Rotenoids

Rotenoids	Source	Strain	Action Mechanism	Reference
13 α -hydroxy-1995) tephrosin	Mundulea sericea	GD-1 (10 μ g/mL)	Inhibition of pre-neoplastics injuries (55 per cent) in mouse mammary tissues	(Gerhäuser <i>et al.</i> , 1995)
α -toxicarol	<i>Dioscorea trifoliata</i>	ICH (female) Inhibited 73 per cent of pre-neoplastics lesions (85 nM)	Unknown	(Ito <i>et al.</i> , 2004)

1995). In addition, the aforementioned rotenoids inhibit NF- κ B activation (Dat *et al.*, 2008), an event related with cancer processes and metastasis. Interestingly, until 2014, the tephrosin (3) was the only rotenoid that could induce two mechanisms of cell death.

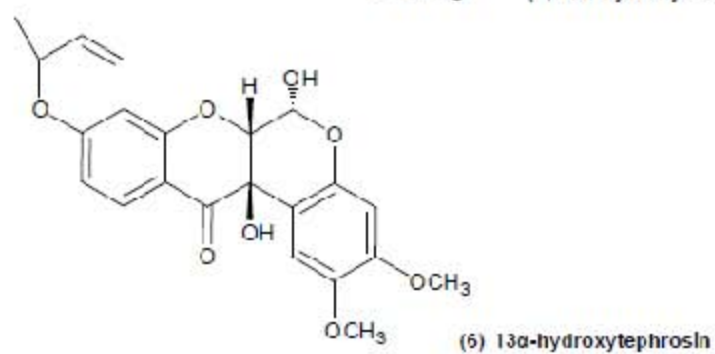
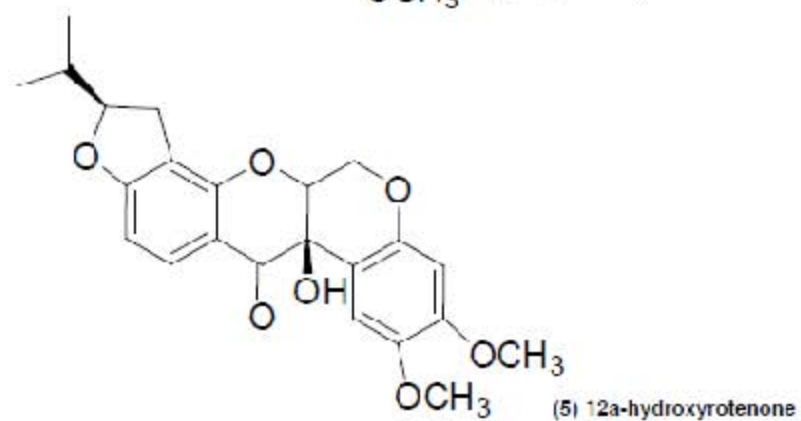
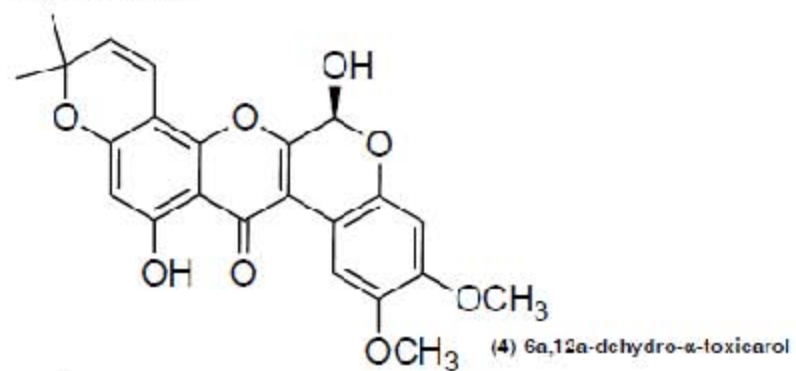
The *in vitro* chemopreventive properties of rotenoids have been evaluated by the quinone reductase (QR) assay. Increased levels of QR *in vitro*, have shown to correlate with induction of other protective phase II enzymes and provides a reasonable biomarker for the potential chemoprotective effect of test agents against cancer initiation. The 6a,12a-dehydro- α -toxicarol (4) (Table 9.8) did not induce QR activation in Hepa 1c1c7 cell line at 23 μ M (Dae Sik Jang *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2003). Similar results were also observed for 1-hydroxytephrosin (7) and sumatrol (8) (Table 9.8) (Jang *et al.*, 2003). The *in vitro* chemopreventive properties of rotenoids have been also determined by the ornithine decarboxylase inhibition test, as this enzyme is overexpressed in various human cancer cells lines. In fact, rotenone (1) and tephrosin (3) (Tables 9.1 and 9.5) inhibited the ODC in the MCF-7 cells line (IC_{50} = 4.4 nM and 98 nM respectively) (Fang and Casida 1998), whereas deguelin (2) (Gerhäuser *et al.*, 1997; Gerhäuser *et al.*, 1995) inhibit the activation of the ODC at IC_{50} = 0.0007 μ M and 0.0005 mg/mL in 308 and BALB/c3T3 cells lines, respectively. Finally, 13 α -hydroxytephrosin (6) (Gerhäuser *et al.*, 1995; Luyengi *et al.*, 1994) (Table 8) and rotenolone (11) (Table 9.8) showed inhibition of ODC at IC_{50} = 0.02 mg/mL and 0.05 μ M, against 308 cells line, and 285 nM against MCF-7 cells line, respectively (Fang and Casida 1998). Regarding *in vivo* studies, there are fewer reports on the antitumor properties of rotenoids. In particular, rotenone (1) (Table 9.2), deguelin (2) (Table 9.4), tephrosin (3) (Table 9.5), 6a,12a-dehydro- α -toxicarol (4), 13- α -hydroxytephrosin (6), and the α -toxicarol (9) (Table 9.9) inhibits 60 per cent of tumors and lesions in

Figure 9.1: Molecular Structures of Rotenoids



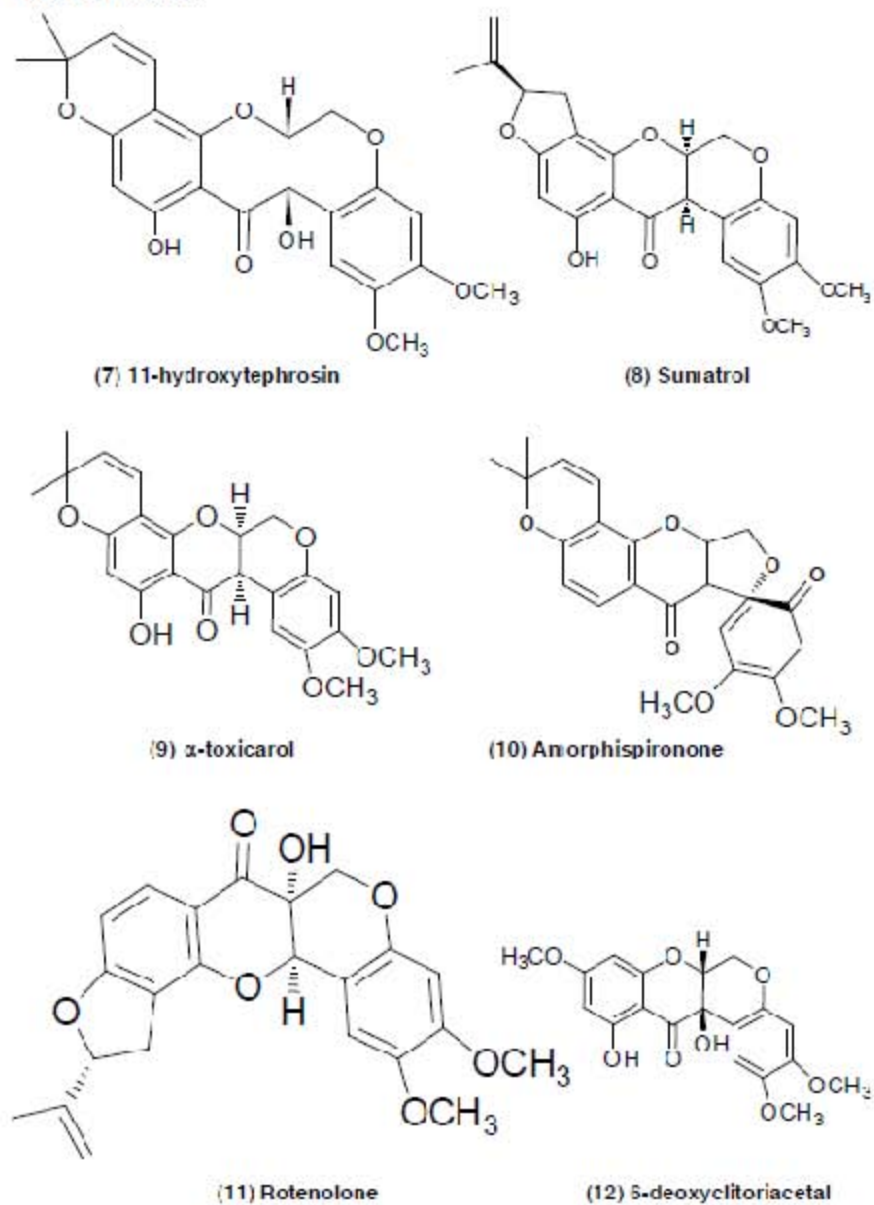
Contd..

Figure 9.1–Contd...



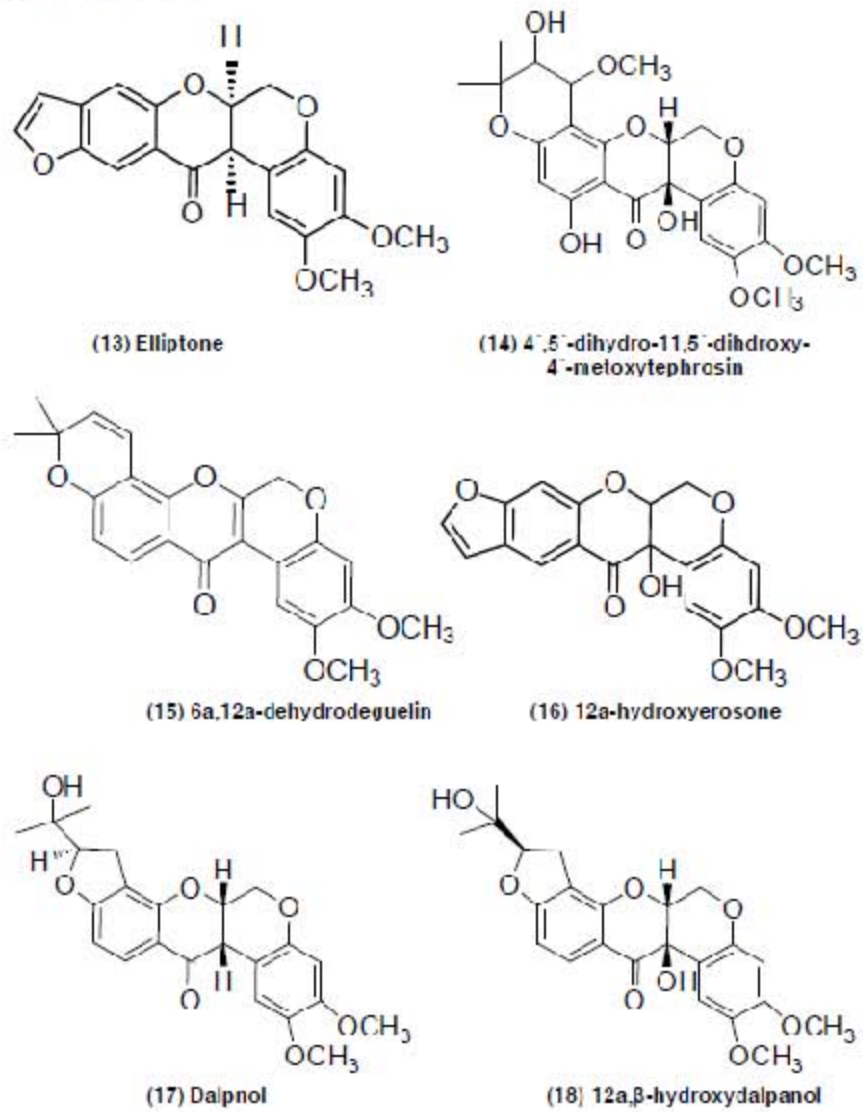
Contd...

Figure 9.1–Contd...



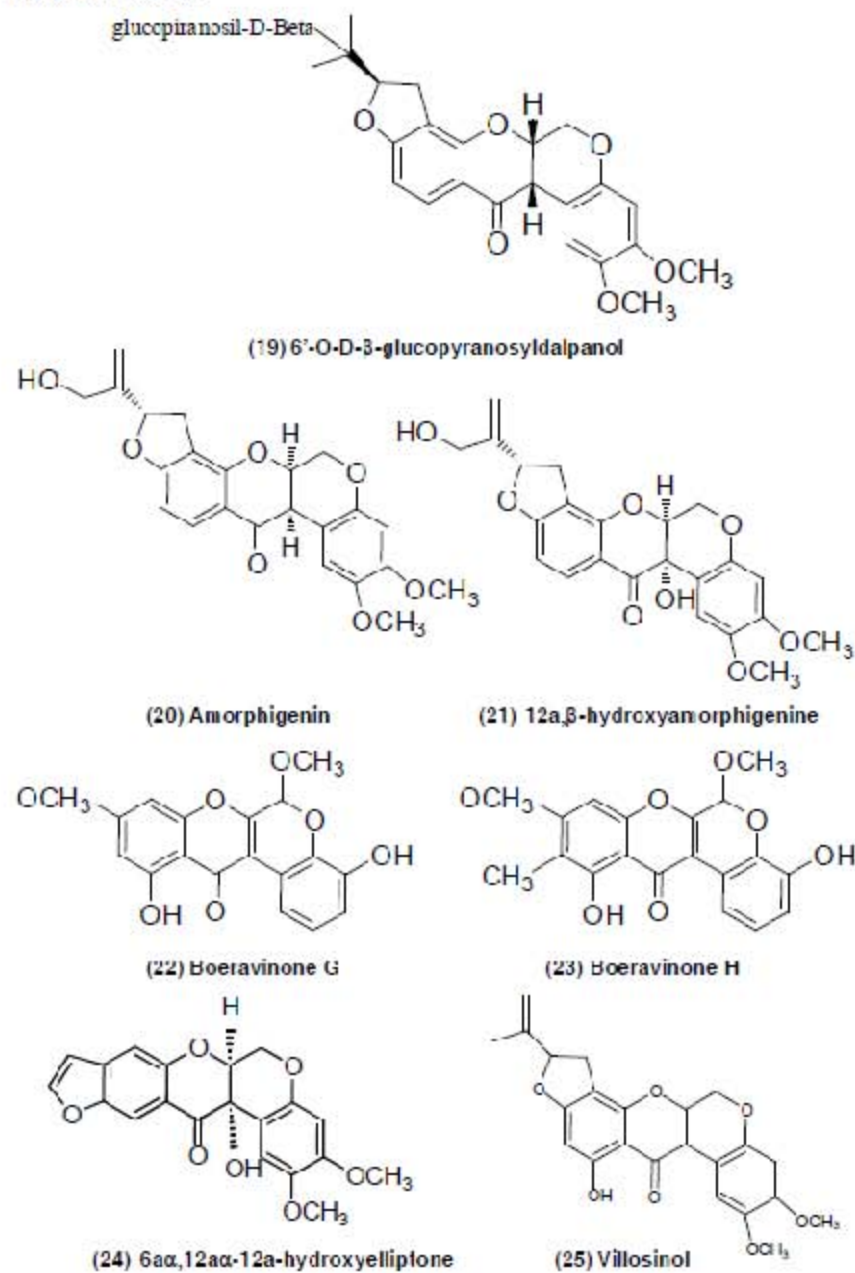
Contd..

Figure 9.1 Contd...



Contd...

Figure 9.1-Contd...



mammary glands on pre-neoplastic mouse at 10 µg/mL. Moreover, rotenone (1) inhibits the growth of tumors administered to rats in their diet at 75.0 mg/kg for 2 years, without causing reproductive problems (Haley, 1978). The studies on the mechanism of action of rotenone (1) report that it increases expression of *p53* and *c-myc* genes, which are involved in triggering apoptosis (Wang *et al.*, 1999).

Conclusion

Several rotenoids possess potent *in vitro* cytotoxic activity towards several human tumor cell lines, as well as, *in vivo* antiproliferative properties; in addition can also exhibit high *in vitro* and *in vivo* chemopreventive properties. Therefore, it is of great interest to continue evaluating and exploring these compounds as a potential source of new anticancer and chemopreventive drugs. However, it is important to emphasize that additional toxicological and pharmacokinetic studies must be performed in order to suggest their use in clinical practice.

References

- Ahmed-Elkarem, A., Maralou, S., Romelli, F., Capasso, R., Fattorusso, F., Tagliatale-Scafati, O., and Di Pietro, A. (2007). Nonprenylated rotenoids, a new class of potent breast cancer resistance protein inhibitors. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J. Med. Chem.*, 50: 1933-1938.
- Blatt, C. T. T., Chávez, D., Chai, H., Graham, J. G., Cabieses, F., Farnsworth, N. R., Corciell, G. A., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (2002). Cytotoxic flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus aff. fluvialis*. *Phytotherapy Research*, 16: 320-325.
- Cassidy, C., and Setzer, W. (2010). Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic *Lonchocarpus* flavonoids: A molecular docking analysis. *Journal of Molecular Modeling*, 16: 311-326.
- Cunningham, M. L., Soliman, M. S., Badr, M. Z., and Matthews, H. B. (1995). Rotenone, an anticarcinogen, inhibits cellular proliferation but not peroxisome proliferation in mouse liver. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cancer Lett.*, 95: 93-97.
- Cheenpracha, S., Karalai, C., Ponglimaront, C., and Chantrapromma, K. (2007). Cytotoxic rotenoids from the stems of *Derris trifoliata*. *Canadian Journal of Chemistry*, 85: 1019-1022.
- Choi, S., Choi, Y., Dat, N. T., Hwangho, C., Lee, J. J., and Lee, J. H. (2010). Tephrosin induces internalization and degradation of EGFR and ErbB2 in HT 29 human colon cancer cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cancer Lett.*, 293: 23-30.
- Dat, N. T., Lee, J. H., Lee, K., Hong, Y. S., Kim, Y. H., and Lee, J. J. (2008). Phenolic constituents of *Amorpha fruticosa* that inhibit NF-kappaB activation and related gene expression. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J. Nat. Prod.*, 71: 1696-1700.
- Deng, Y. T., Huang, H. C., and Lin, J. K. (2010). Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol. Carcinog.*, 49: 141-151.

- Fang, N., and Casida, J. E. (1998). Anticancer action of cube insecticide: correlation for rotenoid constituents between inhibition of NADH: ubiquinone oxidoreductase and induced ornithine decarboxylase activities. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.] *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 3380-3384.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN2008. *Int J Cancer*.
- Gao, S., Xu, Y. M., Valeriote, F. A., and Gunatilaka, A. A. (2011). Pierreones A-D, solid tumor selective pyranoisoflavones and other cytotoxic constituents from *Antiteroporum pierrei*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Nat Prod*, 74: 852-856.
- Gerhäuser, C., Lee, S. K., Kosmeder, J. W., Moriarty, R. M., Hamel, E., Mehta, R. G., Mann, R. C., and Pezzuto, J. M. (1997). Regulation of ornithine decarboxylase induction by deguelin, a natural product cancer chemopreventive agent. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.] *Cancer Res*, 57: 3429-3435.
- Gerhäuser, C., Mar, W., Lee, S. K., Suh, N., Luo, Y., Kosmeder, J., Luyengi, L., Fong, H. H., Kinghorn, A. D., and Moriarty, R. M. (1995). Rotenoids mediate potent cancer chemopreventive activity through transcriptional regulation of ornithine decarboxylase. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.] *Nat Med*, 1: 760-766.
- Concalves, A. P., Videira, A., Maximo, V., and Soares, P. (2011). Synergistic growth inhibition of cancer cells harboring the RFT/PTC1 oncogene by staurosporine and rotenone involves enhanced cell death. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biosci*, 39: 639-648.
- Haley, T. J. (1978). A review of the literature of rotenone, 1,2,12,12a-tetrahydro-8,9-dimethoxy-2-(1-methylethenyl)-1-benzopyranof[3,5-b]furo[2,3-h][1]benzopyran-6(6h)-one. *J Environ Pathol Toxicol*, 1: 315-337.
- Harinantenaina, L., Brodie, P. J., Slebodnick, C., Callmander, M. W., Rakotobe, E., Randrianasolo, S., Randrianaivo, R., Razamison, V. E., Tendyke, K., Shen, Y., Suh, E. M., and Kingston, D. G. (2010). Antiproliferative compounds from *Pongamiopsis pervilleana* from the Madagascar Dry Forest. *J Nat Prod*, 73: 1559-1562.
- Ito, C., Iitigawa, M., Kojima, N., Tan, H. T., Takayasu, J., Tokuda, H., Nishino, H., and Furukawa, H. (2004). Cancer chemopreventive activity of rotenoids from *Derris trifoliata*. *Planta Med*, 70: 585-588.
- Jang, D. S., Cuendet, M., Pawlus, A. D., Kardono, L. B. S., Kawasumi, K., Fansworth, N. K., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (2004). Potential cancer chemopreventive constituents of the leaves of *Macaranga triloba*. *Phytochemistry*, 65: 345-350.
- Jang, D. S., Park, E. J., Kang, Y. H., Hawthorne, M. E., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Fung, H. H., Melita, R. G., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (2003). Potential cancer chemopreventive flavonoids from the stems of *Tephrosia toxicaria*. *J Nat Prod*, 66: 1166-1170.

- Jiang, H., Meng, S., Chen, Z., and Kang, T. (2008). In vitro anticancer activity of flavonoids in *Amorpha fruticosa* L. *Zhongyao Cai.*, 31: 736-738.
- Kardono, L. B. S., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (1990). Cytotoxic Constituents of the Seeds of *Pachyrrhizus erosus*. *Planta Med.*, 56: 673-674
- Lee, H., Lee, J. H., Jung, K. H., and Hong, S. S. (2010). Deguelin promotes apoptosis and inhibits angiogenesis of gastric cancer. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Oncol Rep.*, 24: 957-963
- Lee, J. H., Lee, D. H., Lee, H. S., Choi, J. S., Kim, K. W., and Hong, S. S. (2005). Deguelin inhibits human hepatocellular carcinoma by antiangiogenesis and apoptosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Oncol Rep.*, 20: 129-134
- Li, L., Wang, H. K., Chang, J. J., McPhail, A. T., McPhail, D. R., Terada, H., Konoshima, T., Kokumai, M., Kozuka, M., Estes, J. R., and *et al.* (1993). Antitumor agents. 138. Rotenoids and isoflavones as cytotoxic constituents from *Amorpha fruticosa*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Nat Prod.*, 56: 690-698.
- Lin, L.-J., Ruangrungsi, N., Cordell, G. A., Shieh, H.-L., You, M., and Pezzuto, J. M. (1992). 6-Deoxyclitoxiacetal from *Clitoria macrophylla*. *Phytochemistry*, 31: 4329-4331.
- Luyengi, L., Lee, I.-S., Mar, W., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., and Kinghorn, A. D. (1994). Rotenoids and chalcones from *Mundulea sericea* that inhibit phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. *Phytochemistry*, 36: 1523-1526.
- Marking, L. L. (1988). Oral Toxicity of Rotenone to Mammals. *Federal Government Series: Investigations in Fish Control*, 94: 1-5.
- Matsuda, H., Yoshida, K., Miyagawa, K., Asao, Y., Takayama, S., Nakashima, S., Xu, F., and Yoshikawa, M. (2007). Rotenoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. *Bioorg Med Chem.*, 15: 1539-1546.
- Perrino, I. (2012). *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics* (Third edition, ed.).
- Sakurai, Y., Sakurai, N., Taniguchi, M., Nakanishi, Y., Bastow, K. F., Wang, X., Cragg, G. M., and Lee, K. H. (2006). Rautandins A and B, pterocarpan and cytotoxic constituents from *Neorautanenia mitis*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Nat Prod.*, 69: 397-399.
- Sangthong, S., Krusong, K., Ngamratanavanich, N., Vilaivan, T., Puthong, S., Chandchawan, S., and Muangsri, N. (2011). Synthesis of rotenoid derivatives with cytotoxic and topoisomerase II inhibitory activities. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Bioorg Med Chem Lett.*, 21: 4813-4815.
- Sørensen, M. (1996). *Yam Leaf: Pachyrrhizus DC. - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. 2: IPGRI.
- Tanaka, T., Kohno, H., Sakata, K., Yamada, Y., Hirose, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2002). Modifying effects of dietary capsaicin and rotenone on 4-nitroquinoline

- 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Carcinogenesis*, 23: 1361-1367.
- Udeani, G. O., Gethauser, C., Thomas, C. F., Moon, R. C., Kosmeder, J. W., Kinghorn, A. D., Moriarty, R. M., and Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity mediated by deguelin, a naturally occurring rotenoid. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cancer Res*, 57: 3424-3428.
- Wang, C., Youssef, J., Saran, B., Rothberg, P. G., Cunningham, M. L., Molteni, A., and Rade, M. (1999). Diminished energy metabolism and enhanced apoptosis in livers of B6C3F1 mice treated with the antihepatocarcinogen rotenone. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Biochem.*, 201: 25-32.
- WHO. (2012). Fact sheet N°297. Cancer Retrieved 03/10/2012, 2012, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>



Volatile organic compounds from *Pachyrhizus ferrugineus* and *Pachyrhizus erosus* (Fabaceae) leaves

Artículo aceptado el 16 de Agosto del 2015

Author Names:

Edgar A. Estrella-Parra ^a, Juan C. Gómez-Verjan ^a, Carlos L. Céspedes ^c, Julio Alarcón ^c, Zenón Cano-Santana ^d, Alberto Reyes-García, Marco A. Cerbón-Cervantes ^b, Ricardo Reyes-Chilpa ^{a*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México.

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México.

^c Laboratorio de Fitoquímica-Ecológica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Bio-Bio, Casilla 447. Ave. Andrés Bello s/n, Chillán, Chile.

^d Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 04510, México.

^e Instituto de Biología, Herbario MEXU, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF., 04510, México.

* To whom correspondence should be addressed: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. Mexico. Tel.: 52+55 56224430E-mail address: chilpa@unam.mx (R. Reyes-Chilpa).

Abstract: In México, *Pachyrhizus erosus* (Fabaceae) commonly called "jicama", is widely known for its edible tubers. It is cultivated since the pre-Columbian period, and the powdered seeds have been used for the treatment of mange, lice, and fleas, due to their content of rotenone, a well-known insecticidal compound. On the other hand, *P. ferrugineus*, a wild species can only be found in the Tropical Forests, and has no commercial value. It is known that plants release volatile organic compounds (VOCs) showing qualitative and quantitative differences if are wild or cultivated. VOCs are also involved as repelling or attracting chemical signals to insect herbivores, and their natural enemies. Until now, the VOCs of the leaves of *P. erosus* and *P. ferrugineus* have not been investigated. In the present contribution the VOCs of both species were characterized by headspace solid-phase (HS-SPME) extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS-TOF). In *P. erosus* 21 VOCs were found, being the most abundant: cyclohexanone (32.8%), 3-hexen-1-ol (Z) (32.7%), 3-hexenal (Z) (10.5%). The majoritarian compounds were C6 or C5 derivatives. In *P. ferrugineus*, the most abundant VOCs were: 5-hexene-1-ol acetate (51.5%), undecanal (22.4%), 2-hepten-1-ol (14.5%). The majoritarian compounds were C6, C7 or C11 derivatives.

Key words: *P. ferrugineus* leaves, *P. erosus* leaves, volatile organic compounds.

Resumen: En México, *Pachyrhizus erosus* (Fabaceae) es llamada comúnmente "jicama" y es conocida por sus tubérculos comestibles. Se ha cultivado desde el periodo pre-Colombino y las semillas se han utilizado para el tratamiento tópico de la sarna, piojos, pulgas; las semillas contienen rotenona, un compuesto insecticida. Por otra parte, *P. ferrugineus* solo está presente en estado silvestre en los bosques tropicales y carece de valor comercial. Se sabe que las plantas liberan compuestos orgánicos volátiles (COV) y muestran diferencias cualitativas y cuantitativas dependiendo, si son silvestres o cultivadas. Los COV también son señales químicas atractivos o repelentes de los insectos herbívoros y a sus enemigos naturales. Hasta ahora, los COV en las hojas de *P. erosus* y *P. ferrugineus* no han sido investigados. En el presente trabajo, los COV se identificaron mediante la microextracción (HS-SPME) en fase sólida, e identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS-IUF). En *P. erosus* se encontraron 21 COV, siendo los más abundantes: ciclohexanona (32.8%), 3-hexen-1-ol (Z) (32.7%) y 3-hexenal (Z) (10.5%). Los compuestos mayoritarios son C6 y C5. En *P. ferrugineus* los más abundantes fueron: 5-hexen-1-ol acetato (51.5%), undecanal (22.4%) y 2-hepten-1-ol (14.5%). Los compuestos mayoritarios son C6, C7 o C11.

Palabras clave: Hojas de *P. ferrugineus*, Hojas de *P. erosus*, compuestos volátiles.

INTRODUCTION

The Neotropical genus *Pachyrhizus* is placed taxonomically in the subtribe Diocleinae, tribe Phaseoleae, within the legume family (Fabaceae) (Sorensen *et al.*, 1996). The genus comprises five species found in the American Continent; three of these are cultivated to obtain edible tuberous roots, and the other two only can be found wild. *Pachyrhizus erosus* and *P. ferrugineus* are present in Central America and Mexico, while *P. tuberosus*, *P. ahipa* and *P. panamensis* are distributed in South America (Sorensen *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 2013).

In México, there are only two *Pachyrhizus* species: *P. erosus* (cultivated) and *P. ferrugineus* (wild) (Sorensen *et al.*, 1996). The first one is commonly called "jicama", it is widely known for its edible tubers. There is evidence that during the pre-Columbian period it was cultivated by the Toltec, Aztec and Maya civilizations (Sorensen *et al.*, 1996). Today, *P. erosus* is a tuber legume crop with high yield potential, high nutritional value, low N₂ fertilizer and low pesticide demand (Castellanos *et al.*, 1997), being ideal for plant growing. The seeds of *P. erosus* have been used in Mexico for the

treatment of mange since pre-Columbian times (Bejar *et al.*, 2000), and during the XX century the peasants used the powdered seeds for their insecticidal properties against ectoparasites, such as lice, and fleas. These ethnomedical applications can be explained due to their content of rotenone, a compound well known compound for its insecticidal and acaricidal properties (Reyes-Chilpa *et al.*, 2003), as well as other isoflavonoids.

Pachyrhizus erosus is extensively cultivated in Mexico, even for exportation, and has achieved wide acceptance in U.S.A., Southeast Asia, and Western Africa; therefore, it has stimulated agronomic and food science interest (Ramos *et al.*, 2013). It has been estimated that México exported 11,000 tons per year to USA, where it reaches an average price of one dollar per kg (Castañeda, 2000).

Volatile organic compounds (VOCs) are lipophilic compounds with low molecular weight and high vapor pressure at ambient temperatures (Dudareva *et al.*, 2013). The VOCs are emitted as blends from flowers, leaves, fruits, and roots into the surrounding atmosphere (Kigathi *et al.*, 2009). Artificial selection for specific plant traits has often not only changed the appearance of cultivated plants compared to their wild conspecifics, but also their chemistry (Gols *et al.*, 2011). Furthermore, volatile organic compounds have been widely studied due to their contribution to aroma and flavour and as markers for authenticity, for example, biological or geographical origin, cultivar (Socaci *et al.*, 2013). To our best knowledge, volatile constituents of leaves of *P. erosus* (cultivated type) and *P. ferrugineus* (wild type) has not been reported. In the present study volatile compounds of these species were analyzed by HS-SPME/GC-MS-TOF as a starting point of future studies aimed to study their susceptibility to insects, and fungi.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of two specimens were free of any pesticide. *Pachyrhizus erosus* leaves were collected from farmland to San Andres Tlalquitenango, Morelos, México. A voucher specimen was deposited in MEXU-UNAM (138292). At the time of collecting the plants were in bloom, the flowers were of purple color. *Pachyrhizus ferrugineus* leaves were collected in a Deciduous Tropical Forest in the Natural Reserve "La Sepultura", Villaflores, Chiapas, México. A Voucher was deposited in MEXU-UNAM (1060890). The plants were collected in the core area of the reserve (wild plants). At the time of collecting the plants had mature fruits, which the contained of 6-8 seeds. The specimens

were identified and authenticated by one of us, Alberto Reyes-García from the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México).

Collection of VOCs blend by HS-SPME

To identify and quantify the volatile compounds (VOCs) in *P. erosus* and *P. ferrugineus* leaves, the headspace HS-SPME technique was employed. Volatiles were collected twice ($N=2$). For this study, the temperature was maintained at 18 ± 1 °C. The VOCs slurry was prepared by blending freshly leaves (5.0 g), 20% sodium chloride solution (2 mL) in a 20 mL flask with a cap and Teflon-faced silicone rubber septa (Supelco, Co., Bellefonte, PA). The flask was placed on a magnetic stirring plate and stirred at 1100 rpm for 15 m. A SPME fiber (DVB/CARBOXEN/PDMS; Supelco, Co., Bellefonte, PA) was then exposed to the headspace of the slurry for 15 m in a water bath at 45 °C. The analytical methodology here used was selected after testing 4 different fibers and previous experiences for VOCs analysis (Torres-González A., 2015).

Leaf volatiles organic compounds analysis by CG-MS-TOF

The analysis of the volatile compounds (VOCs) of *P. erosus* and *P. ferrugineus* leaves was performed with a gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). The sample analysis was conducted using a Gas Chromatograph (Agilent 6890N) with helium (grade 5; ultra-high purity) as the carrier gas; the outlet of the column (DB-5, 20 m \times 0.18 mm \times 0.18 μ m film) was coupled to a Mass Spectrometer (LECO Pegasus 4D). Parameters for electron impact sample ionization were as follows. Ionization chamber temperature: 200°C; interface temperature: 250°C; source temperature: 230°C. The gas chromatographic conditions were as follows: split less injection(1:20) at 300°C; initial oven temperature, 40°C for 1 min, increased at 8°C per minute to 300°C and held for 5 min. Desorption time was 4 min. Mass Analyzer: Time of Flight (TOF); Spectral Acquisition: 20 spectra/second; delayed ignition of the filament: 0 min; mass range: 33-400; Ionization chamber temperature: 200°C; calibration compound: perfluoroterbutylamine (PFTBA). To identify the compounds their mass spectra were compared with NIST/EPA/NIH, and reported Kovats Retention Index (KI, www.pherobase.org and www.flavornet) libraries. The composition was reported as relative percentage of the total peak area. Individual compounds were quantified by calculating the peak area relative to the peak area for the internal standard. A mixture of pure alkanes standards C8 to C24 were used for determining the Kovats index.

RESULTS

In *P. erosus* 21 kind of VOCs were found, being the most abundant: cyclohexanone (32.8%), 3-hexen-1-ol (Z) (32.7%), 3-hexenal (Z) (10.5%), furan-2-ethyl (6.4%), and pentanol (6.4%). Together are 88.99% of the VOCs blend. The majoritarian compounds were C6 or C5 derivatives including ketones, aldehydes, and alcohols (Table 1). Eleven kind of VOCs were detected from *P. ferrugineus*, being the most abundant: 5-hexene-1-ol acetate (51.5%), undecanal (22.4%), 2-hepten-1-ol (14.5%), and 2-eicosene (Z) (4.76). Together represent 93.24% of the VOCs blend. The majoritarian compounds were C6, C7 or C-11 derivatives including ester, and aldehydes (Table 1).

Table 1. Volatile organic compounds (VOCs) contained in *P. erosus* (cultivated plant) and *P. ferrugineus* (wild plant) leaves.

Peak	<i>Pachyrhizus erosus</i>					<i>Pachyrhizus ferrugineus</i>				
	RT (min)	Compound	KIc	KIe	Abun (%)	RT (min)	Compound	KIc	KIe	Abun (%)
1	0.12	Pentanal	733.9	732	1.66	4.11	2-hepten-1-ol	946.5	951	14.57
2	0.33	3-methyl-1-butanol	736.0	736	1.66	5.73	5-Hexene-1-ol, acetate	1092.1	1070	51.50
3	0.58	Pentanol	759.4	759	6.43	7.56	Undecanal	1317.6	1310	22.41
4	1.01	Furan 2-ethyl	761.7	730	6.44	8.19	2-dodecanone	1406.3	1401	0.06
5	2.01	3-hexenal, (Z)-	819.1	800	10.57	9.13	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-pentyl-	1558.1	1525	1.24
6	3.44	Cyclohexanone	901.0	896	32.84	9.99	1-Heptadecene	1709.1	1696	0.95
7	3.47	3-Hexen-1-ol, (Z)-	903.1	882	32.71	10.54	4,14-dimethylheptadecane	1816.4	1816	0.87
8	3.589	(E,E)-2,4-Hexadienal	910.4	910	0.07	11.22	n-Hexadecanoic acid	1953.3	1951	0.80
9	3.91	Heptanal	932.8	912	0.23	11.57	2-eicosene (Z)	2023.8	2022	4.76
10	4.18	2 heptenal	951.2	951	3.84	11.59	5-Ethyltridecane	2027.7	2034	0.73
11	4.99	(E,E)-2-4 heptadienal	1009.5	1009	1.96	12.20	Methyl stearate	2161.5	2139	2.11
12	5.21	(E)-3-octen-2-one	1034.1	1034	0.51					

13	5.41	(E)-2-octenal	1056.5	1056	0.04		
14	5.56	1-octanol	1072.7	1072	0.06		
15	6.2	Hexanoic acid, 2-methylpropyl ester	1149.3	1149	0.18		
16	7.14	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-	1259.9	1258	0.08		
17	8.09	2-Methylpropanoic acid 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester	1390.7	1380	0.20		
18	8.25	Unknown	1416.5	ND	0.28		
19	8.57	(E)- β -ionone sesquiterpene	1467.0	1467	0.06		
20	8.93	3,5,9-Undecatrien-2-one, 6,10-dimethyl-terpene	1526.0	1527	0.10		
21	9.53	2-Methylpropanoic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl ester	1626.4	1594	0.08		
Total area (%)				100		Total area (%)	100
Identified total area (%)				99.72		Identified total area (%)	100
Identified compounds (%)				95.23		Identified compounds (%)	100

K₁: Calculated Kovats retention index; K₂: Reported Kovats retention index; ND: Not determined; RT: retention time

DISCUSSION

It is well known that plants release different VOCs blends according if they belong to the wild or cultivated types (Gols *et al.*, 2011); as well as, if they are attacked or not by herbivores

(Kigathi et al., 2009) or are under drought stress Copolovici et al., 2014). Several authors have reported losses of VOCs in cultivated as compared to wild ancestors, for instance in the case of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), caterpillars performed best on the highest-yielding variety which has low induction of volatile sesquiterpenes; therefore it has proposed that breeding in cranberry has compromised plant defenses (Rodríguez-Sanona et al., 2011). Gols et al (2011) have reported not only differences among wild and cultivated cabbages (*Brassica oleracea*), but also that the parasitoid *Cotesia rubecula* and specialized on hosts feeding on brassicaceous plants, was differentially attracted and preferred wild types over cultivated cabbage. VOCs are emitted as a response to insect egg deposition and it also been postulated that their content may drastically diminish as a consequence of crop breeding in maize (Tamiru et al., 2011). It has also been reported that communication among plants via VOCs is a defense strategy to herbivores (Muroi et al., 2011); thus, plants can reduce the emission of VOCs blend when growing together as an strategy to reduce herbivory attack (Kigathi et al., 2013).

Differences between *P. erosus* and *P. ferrugineus* VOCs blend, may be due, in first instance that are different species, and second term that are cultivated and wild plants, respectively. It is interesting that *P. erosus* (cultivated) leaves release more VOCs (21) than the wild species *P. ferrugineus* (11). Regarding to the type of VOCs in the species of *Pachyrhizus* here studied, both contain mainly aldehydes, ketones, and alcohols. Only *P. erosus* leaves contained terpenoids such as (E)- β -ionone. Several compounds, such as 3-hexenal (Z), undecanal and 3-hexen-1-ol (Z) have been reported as common constituents of many other plant species (Srinivasa et al., 1989; Kulkarni et al., 1998; Kaul et al., 1999; Asuming et al., 2005; Rohloff and Bones, 2005; Tayoub et al., 2006). 3-Hexen-1-ol is part of the chemoattractant blend of VOCs to insect natural enemies, when certain plants are invaded or ovoposited by herbivores (Warthen et al., 1997; Han and Chen, 2002; Mumm et al., 2004). Some of the compounds found here in low amounts have been reported to possess insecticidal and antifeedant activity; for instance (E)- β -Ionone (Alarcón et al., 2013; Céspedes et al., 2013, 2014; Muñoz et al., 2013; Gruber et al., 2009). Cyclohexanone have only found to date in mango cultivars (Pino et al., 2005).

The present research provides the first approach to the study of the role of VOCs blends in *P. erosus* and *P. ferrugineus*. Until now, it has only been described that *P. erosus* seeds contains isoflavonoids with insecticidal activity (Bejar et al, 2000), for instance rotenone (Alavez et al., 1998, Estrella-Parra et al., 2014); however it is unknown if rotenone and other insecticidal isoflavonoids are also synthesized in *P. erosus*, and *P. ferrugineus* leaves.

CONCLUSIONS

This is the first study about the composition of VOCs from *P. erosus* and *P. ferrugineus* leaves and improves the knowledge of the genus *Pachyrhizus*. The VOCs blend from the wild (*P. ferrugineus*) and cultivated plant species (*P. erosus*) showed different composition. *Pachyrhizus erosus* leaves released more VOCs than *P. ferrugineus* leaves. Both species contain ketones, aldehydes, alcohols, and esters.

The authors have declared no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

EA Estrella-Parra is grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (PCB-UNAM), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; 220355) for providing a scholarship. We thank the funding provided by the Dirección de Investigación of the University of the Bio Bio (Grupo de Investigación Química y Biotecnología de Productos Naturales Bioactivos) FONDECYT Projects Grants # 1130463 and 1130242. We thank to Georgina Artamiza Duarte Lisici (USAI-UNAM) for technical assistance.

REFERENCES

- Alarcón J, Lamilla C, Céspedes C. 2013. Insecticidal activity of sesquiterpenes skeleton synthesized by the conventional Robinson annulations reaction on *Drosophila melanogaster*. **Industrial Crops and Products** 42: 268-272.
- Alavez-Solano D, Reyes-Chilpa R, Jiménez M, Villavicencio M, Pérez E, Gómez F. 1998. **Proceedings of the 2nd International Symposium on Tuberous Legumes**. MacKeenzie, Celaya, Guanajuato, México, 5-8 August 1996.
- Asuming WA, Beauchamp PS, Descalzo, JT, Dev BC, Dev V, Frost S, Ma CW. 2005. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. **Biochem Syst Ecol** 33: 17-26.
- Bejar E, Reyes-Chilpa R, and Jiménez Estrada M. 2000. Bioactive Compounds from Selected Plants used in XVI Century Mexican Traditional Medicine. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Vol. 24. Bioactive Natural Products (Part E). Atta-ur-Rahman (ed.). Elsevier Science Publishers. Amsterdam. p. 799-843.

- Castañeda E. 2000. Utilización de la jícama (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) en la elaboración de pan blanco para favorecer su calidad nutricia. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en alimentos. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Castellanos JZ, Zapata F, Badillo V, Pena-Cabriales JJ, Jensen ES, Heredia-García E. 1997. Symbiotic nitrogen fixation and yield of *Pachyrhizus erosus* L. Urban cultivars and *Pachyrhizus ahipa* Wedd Parodi landraces as affected by flower pruning. *Soil Biology and Biochemistry* 29(5-6): 973-981.
- Céspedes C, Molina S, Muñoz E, Lamilla C, Alarcón J, Palacios S, Carpinellac M, Ávila JG. 2013. The insecticidal, molting disruption and insect growth inhibitory activity of extracts from *Condalia microphylla* Cav. (Rhamnaceae). *Industrial Crops and Products* 42: 78-86.
- Céspedes C, Salazar J, Ariza-Castolo A, Yamaguchi L, Ávila JG, Aqueveque P, Kubo I, Alarcón J. 2014. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia*. *Environmental Research* 132: 391-406.
- Copolovici L, Kännaste A, Rimmel T, Niinemets T. 2014. Volatile organic compound emissions from *Ainus glutinosa* under interacting drought and herbivory stresses. *Environmental and Experimental Botany* 100: 55-63.
- Dudareva N, Antje K, Joelle KM, Kaplan I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198: 16-32.
- Estrella-Parra EA, Gómez-Verjan JC, González-Sánchez I, Vázquez-Martínez ER, Vergara-Castañeda E, Cerbón MA, Alavez-Solano D, Reyes-Chilpa R. 2014. Rotenone isolated from *Pachyrhizus erosus* displays cytotoxicity and genotoxicity in K562 cells. *Nat Prod Res* 28(20):1780-1785.
- Gols R, Bullock JM, Dicke M, Bukovinszky T, Harvey JA. 2011. Smelling the Wood from the Trees: Non-Linear Parasitoid Responses to Volatile Attractants Produced by Wild and Cultivated Cabbage. *J Chem Ecol* 37: 795-807.
- Gruber MY, Xu N, Grenkow L, Li X, Omyilagha J, Soroka JJ, Westcott ND, Hegedus DD. 2009. Responses of the crucifer flea beetle to *Brassica* volatiles in an olfactometer. *Environ Entomol* 38(5): 1467-1479.
- Han BY, Chen ZM. 2002. Composition of the volatiles from intact and mechanically pierced tea aphid-tea shoot complexes and their attraction to natural enemies of the tea aphid. *J Agric Food Chem* 50(9): 2571-2575.
- Kaul VK, Gujral RK, Singh B. 1999. Volatile constituents of the essential oil of flowers of *Rosa brunonii* Lindl. *Flavour Fragr J* 14(1): 9-11.

- Kigathi RN, Unsicker SB, Reichelt M, Kesselmeier J, Gershenzon J, Weisser WW. 2009. Emission of Volatile Organic Compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *J Chem Ecol* 35: 1335-1348.
- Kigathi RN, Weisser WW, Veit D, Gershenzon J, Unsicker SB. 2013. Plants suppress their emission of volatiles when growing with conspecifics. *J Chem Ecol* 39(4): 537-545.
- Kulkarni RN, Mallavarapu GR, Baskaran K, Ramesh S, Kumar S. 1998. Composition of the essential oils of two isomenthone-rich variants of geranium (*Pelargonium* sp.). *Flavour Fragr. J* 13(6): 389-392.
- Mumm R, Tiemann T, Schulz S, Hilker M. 2004. Analysis of volatiles from black pine (*Pinus nigra*): significance of wounding and egg deposition by a herbivorous sawfly. *Phytochemistry* 65: 3221-3230.
- Muñoz E, Escalona D, Salazar J, Alarcon J, Céspedes C. 2013. Insect growth regulatory effects by diterpenes from *Calceolaria talcana* Grau & Ehrhart (Calceolariaceae: Scrophulariaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Drosophila melanogaster*. *Industrial Crops and Products* 45: 283-292.
- Muroi A, Ramadan A, Nishihara M, Yamamoto M, Ozawa R, Takabayashi J, Arimura G. 2011. The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications. *PLoS One* 6(10): e24594
- Ramos AM, Renard C, Wicker L, Contreras EJ. 2013. Advances and perspectives of *Pachyrhizus* spp. in food science and biotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 29: 44-54.
- Reyes-Chilpa R, Jiménez Estrada M, Cristóbal Telésforo E, Torres-Colín L, Villavicencio MA, Pérez-Escandón BA, Mercado R. 2003. Natural Insecticides from *Hippocratea excelsa* and *Hippocratea celastroides*. *Economic Botany* 57: 54-64.
- Rodríguez C, Vorsa N, Singh AP, Johnson J, Szendrei Z, Mescher MC, Frost CJ. 2011. Tracing the history of plant traits under domestication in cranberries: potential consequences on anti-herbivore defenses. *Journal of Experimental Botany* 62: 2633-2644.
- Rohloff J, Bones A.M. 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* -Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry* 66: 1941-1955.
- Socaci SC, Tofana M, Rapi IV, Pintea A. 2013. In-tube extraction and GC-MS analysis of Volatile Components from Wild and Cultivated sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Carpatica*) Berry Varieties and Juice. *Phytochem Anal* 24: 319-328.
- Sorensen Marten. 1996. Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 2. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome.

- Srinivasa A, Rajanikanth B, Seshadri R. 1989. Volatile Aroma Components of *Curcuma amada* Roxb. *J Agric Food Chem* 37:740-743.
- Tamiru A, Bruce TJA, Woodcock CM, Caulfield IC, Midega CAO, Ogot CKPO, Mayon P, Birkett MA, Pickett JA, Khan ZR. 2011. Maize landraces recruit egg and larval parasitoids in response to egg deposition by a herbivore. *Ecology Letters* 14: 1075-1083.
- Tayoub G, Schwob I, Bessi re J, Rabier J, Masotti V, Girard G, Viano J. 2006. Essential oil composition of leaf, flower and stem of styrax (*Styrax officinalis* L.) from South-Eastern France. *Flavour Fragr J* 21: 809-812.
- Torres-González A, Lopez-Rivera P, Duarte-Lisci G, López-Ramirez A, Correa-Benitez A, Rivero-Cruz JF. 2015. Analysis of volatile components from *Melipona beecheii* geoprois from Southeast Mexico by headspace solid-phase microextraction. *Natural Product Research* 29:1-4.
- Warthen JD, Lee CJ, Jang EB, Lance DR, McInnis DO. 1997. Volatile. Potential Attractants from ripe coffee fruit for female Mediterranean fruit fly. *Journal of Chemical Ecology* 23(7): 1891-1900.