

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad  
Antiproliferativa de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray)  
B. Ståhl



# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



## FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Max Vidal Gutiérrez**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud.



---

**Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda**

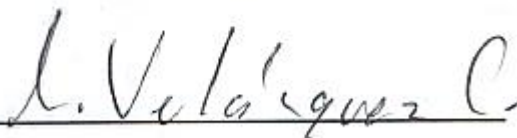
**Director Académico**



---

**Dra. Adriana Garibay Escobar**

**Secretaria**



---

**Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras**

**Vocal**

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT, por la aprobación y financiamiento del presente proyecto.

A la Universidad de Sonora, por abrirme sus puertas nuevamente y aceptarme una vez más en la comunidad Búho, esta vez para realizar mis estudios de posgrado.

Al personal que integra la dirección de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, y el Departamento de Ciencias Químico Biológicas, por su apoyo y trato digno hacia mi persona en cada momento que requerí de sus servicios.

Al Posgrado en Ciencias de la Salud, por confiar en mis capacidades intelectuales al aceptarme en su plan de estudios de maestría y apoyarme en cada momento en el transcurso de la misma.

A los miembros que conforman el comité sinodal y contribuyeron a este trabajo de investigación, el Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. Adriana Garibay Escobar, Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras y Dr. Angel Valdez Ortiz, por sus enseñanzas, orientación y buenos consejos que amablemente me brindaron durante el transcurso de la maestría.

Al laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Biología Celular e Inmunología y Laboratorio de Investigación en Química, y todos sus participantes, M.C. Judith Valdez, Dr. Luisa Rascón, Dra. Olivia Valenzuela y su grupo, a la Dra, Adriana Garibay y sus alumnos, al grupo del Dr. Carlos Velázquez, al Dr. Juan Carlos Gálvez y su equipo de trabajo, y sobre todo al equipo del Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda, grupo al que orgullosamente pertenezco.

## DEDICATORIAS

*“A Dios, por iluminar el camino de mi vida, por hacerme fuerte y darme  
sabiduría, paso a paso, día con día”*

*“A mi familia, por estar conmigo en las buenas y en las malas, apoyarme en  
cada una de mis decisiones y por enseñarme a apreciar el amor y la vida”*

*“A mi madre, sin ella nada de esto sería posible”*

*“A mi abuela Gloria, la fe que mantuvo viva en mi me dio fuerza para seguir  
adelante y llegar hasta aquí”*

*“A mi abuela Ida†, por ser una parte importante en mi vida y por creer en mi a  
cada paso que daba”*

*“A todos aquellos que contribuyeron de una forma u otra en la elaboración de  
este proyecto, los amigos que hice en Brasil, Dra. Claudia, Fernando, Lucas,  
Ariane, Ana Julia, Danilo, Mariana, Eduardo y Luisa, y aquellos que deje en  
Ciudad de México, Rosario, Patricia, Jorge, Adriana y Javier pero sobre todo a  
mis amigos y compañeros Heriberto Torres, Raúl Díaz, Wenceslao Coronado,  
Gilberto Apodaca, Jorge Bello (los Goldos), Manuel Osuna (el Many), Fernando  
Castañeda (el Negro), Nivardo Peña (el Valo), Jorge Valencia (la Gorda  
Violenta) y Rúben Navarro (la Gorda mayor), así como al resto de los  
Ostioneros de Guaymas en Xochimilco, que además de apoyarme moralmente,  
sé que puedo contar con ellos en las buenas y en las malas”*

*“Aos rapazes das repúblicas Vão de Cerka e Fazendinha, pela convivência e  
amizade no Brasil”*

*“À minha namorada Maëla Peron, agradeço pelo apoio e suporte dados nos  
momentos bons, mas principalmente nos ruins. Tudo isso sem dúvida nenhuma  
me deu força e inspiração necessárias para continuar até o fim do meu  
mestrado. Sempre lhe serei grato coração”*



## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	VIII
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	IX
<b>OBEJTIVOS</b>	X
Objetivo General	X
Objetivos Particulares	X
<b>RESUMEN</b>	XI
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	3
Generalidades del Cáncer	3
Epidemiología del Cáncer	3
Medicina Tradicional y Productos Naturales	4
El Cáncer y los Productos Naturales	5
<i>Jacquinia macrocarpa</i> Cav. ssp. <i>pungens</i> (A. Gray) B. Ståhl ( <i>J. macrocarpa</i> ) Características y Uso Medicinal	6
Actividad Biológica del Género <i>Jacquinia</i>	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	8
Material Vegetal	8
Líneas celulares	9
Actividad Antiproliferativa por el Ensayo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	10
Obtención de Extractos Crudos de <i>J. macrocarpa</i>	11
Aislamiento y Separación por Técnicas Cromatográficas de las Muestras con Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549	12
Caracterización Química del Compuesto con Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549 por Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y HPLC-MS	13



<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	15
Obtención de Extractos Crudos de <i>J. macrocarpa</i> y Evaluación de la Actividad Antiproliferativa	15
Fraccionamiento del Extracto Metanólico de las Cáscaras del Fruto y Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas	16
Separación de la Fracción Residual 2 y Actividad Antiproliferativa de las Sub-Fracciones Obtenidas	18
Aislamiento y Caracterización Química del Compuesto con Actividad Antiproliferativa en A549	19
Columna cromatográfica	20
Determinación del peso molecular por HPLC-MS	21
Caracterización Química por RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSBC, HMBC y COSY a 700 MHz	24
Primulasaponina 1, el Triterpeno Glicosilado Aislado de <i>J. macrocarpa</i> con Actividad Antiproliferativa en A549	29
Actividad Antiproliferativa de Primulasaponina 1 en las Líneas Celulares A549, HeLa, LS180 y ARPE-19	31
<b>CONCLUSIONES</b>	37
<b>RECOMENDACIONES</b>	38
<b>REFERENCIAS</b>	39
<b>ANEXOS</b>	43
<b>Anexo 1.</b> Espectro de <sup>1</sup> H a 700 MHz	43
<b>Anexo 2.</b> Espectro de <sup>13</sup> C a 700 MHz	44
<b>Anexo 3.</b> Espectro del experimento HSQC a 700 MHz	45
<b>Anexo 4.</b> Espectro del experimento HMBC a 700 MHz	46
<b>Anexo 5.</b> Espectro del experimento COSY a 700 MHz	47
<b>Anexo 6.</b> Desplazamientos del experimento de <sup>1</sup> H-RMN para Primulasaponina 1 (triterpeno) de Siems y colaboradores de 1998	48

<b>Anexo 7.</b> Desplazamientos del experimento de $^1\text{H}$ -RMN para Primulasaponina 1 (azúcares) de Siems y colaboradores de 1998	49
<b>Anexo 8.</b> Desplazamientos del experimento de $^{13}\text{C}$ -RMN para Primulasaponina 1 de Siems y colaboradores de 1998	50
<b>Anexo 9.</b> Artículo	51

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Pág.</b>
<b>I</b>	Rendimientos de extractos crudos de <i>Jacquinia macrocarpa</i> Cav. ssp. <i>pungens</i> (A. Gray) B. Ståhl	16
<b>II</b>	Actividad antiproliferativa de extractos crudos de <i>Jacquinia macrocarpa</i> Cav. ssp. <i>pungens</i> (A. Gray) B. Ståhl en la línea celular A549	17
<b>III</b>	Actividad antiproliferativa de las fracciones del extracto metanólico de <i>Jacquinia macrocarpa</i> Cav. ssp. <i>pungens</i> (A. Gray) B. Ståhl	17
<b>IV</b>	Rendimiento de las sub-fracciones obtenidas de FxR2	19
<b>V</b>	Actividad antiproliferativa de las sub-fracciones obtenidas de FxR2 en A549	20
<b>VI</b>	Datos de <sup>1</sup> H-RMN	25
<b>VII</b>	Datos de <sup>1</sup> H-RMN: protones de azúcar	26
<b>VIII</b>	Datos de <sup>13</sup> C-RMN	27
<b>IX</b>	Actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Pág.</b>
<b>1</b>	Estructura de sakurasosaponina, una saponina antifúngica	8
<b>2</b>	Estructura de bonediol. Compuesto con actividad antiproliferativa presente en las raíces de <i>J. macrocarpa</i>	9
<b>3</b>	Tiempo de retención y espectro de masas de sub-fracción activa	23
<b>4</b>	Análisis de correlación de los diferentes espectros de RMN para la elucidación de Primulasaponina 1	28
<b>5</b>	Estructura elucidada a base de los espectros de RMN	29
<b>6</b>	Cambios morfológicos en A549 inducidos por Primulasaponina 1	34
<b>7</b>	Cambios morfológicos en LS180 inducidos por Primulasaponina 1	35
<b>8</b>	3-O-β-D-xilopiranosil-(1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[β-D-glucopiranosil-(1→4)]-α-L-arabinopiranosil ácido oleánico	36

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Aislar y caracterizar químicamente compuestos con actividad antiproliferativa presentes en *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl.

### **Objetivos Particulares**

- Evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos crudos, fracciones, sub-fracciones y compuesto aislado de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl en la línea celular A549.
- Caracterizar químicamente compuestos aislados de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl que presentaron actividad antiproliferativa en la línea celular A549.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de compuestos aislados de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl en las líneas celulares A549, HeLa, LS180 y ARPE-19.

## RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial, la OMS lo posiciona dentro de los principales problemas de salud pública. Estudios realizados sobre el extracto metanólico de las cáscaras del fruto de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl, han demostrado tener actividad antiproliferativa sobre la línea celular A549. Este estudio procuró aislar e identificar el o los compuesto responsables de dicha actividad antiproliferativa en la línea celular A549. Para ello, se realizó un estudio biodirigido basado en el fraccionamiento y sub-fraccionamiento en orden de polaridad de los compuesto presentes en *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl mediante el uso técnicas cromatográficas, a la par de un monitoreo de la actividad antiproliferativa en la línea celular A549 mediante el ensayo de proliferación celular MTT. Una vez aislado el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa, fue determinada la actividad antiproliferativa de la molécula en las líneas celulares LS180, HeLa, ARPE-19, y la línea celular monitor A549. También fue analizado por técnicas de espectroscopia HPLC-MS y RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y COSY para determinar el peso molecular y la estructura de la molécula con el fin de identificarlo. Los resultados indican la presencia de un compuesto con una relación m/z de 1104.9, mismo que se encuentra conformado por un triterpeno unido a cuatro motivos de carbohidratos, el cual se ha identificado como Primulasaponina 1. Esta molécula perteneciente a la familia de las saponinas, no cuenta con reportes en la literatura de actividad antiproliferativa en otras líneas celulares, fue aislada del precipitado de la fracción residual (FxR2) obtenida a partir del extracto metanólico de las cáscaras del fruto. La mayor actividad antiproliferativa registrada para este compuesto, se observa en las líneas celulares LS180 y A549 con una  $\text{IC}_{50}$  de 9.3  $\mu\text{M}$  y 13.6  $\mu\text{M}$  respectivamente. Se sugiere realizar más investigaciones al triterpeno glicosilado

con el fin de determinar el tipo de muerte celular y las vías de señalización que se encuentran implicadas en dicho proceso.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública y una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial, caracterizado por la proliferación descontrolada de células anormales o cancerosas en el organismo (OMS, 2014). Existe un gran problema con las terapias brindadas contra el cáncer debido a que, en su mayoría, son inespecíficas produciendo la aparición de ciertos efectos secundarios (Komen, 2009; ACS, 2013). Aunado a esto, células cancerosas han desarrollado algunos mecanismos que les permiten contrarrestar el efecto de ciertos fármacos que se utilizan en la quimioterapia, reduciendo de esta manera las vías de tratamiento clínico posible para tratar el cáncer (Paredes, et al., 2006).

Es por ello que grupos de investigación están dedicados a la búsqueda de nuevos medicamentos contra el cáncer. Una de las áreas que ha tenido gran éxito en la producción de medicamentos contra el cáncer, es la de los productos naturales. Las plantas como parte de su metabolismo producen una serie de compuestos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales se han descrito por su amplia actividad biológica (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009). En la búsqueda de nuevos principios activos contra células cancerosas y procurando reducir la aparición de efectos secundarios, los científicos recurren al conocimiento de la medicina tradicional con el fin de evaluar a nivel fitoquímico, farmacológico y toxicológico aquellos productos naturales que se señala poseen efectos curativos (Cragg & Newman, 2005).

*Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl (*J. macrocarpa*) es utilizada en la medicina tradicional como remedio para diferentes malestares y enfermedades. Estudios *in vitro* del extracto metanólico de *J. macrocarpa* dieron a conocer su actividad antiproliferativa sobre la líneas celulares A549, HeLa, M12A<sup>k</sup>.C3.F6, RAW 264.7 y L929 (Vidal Gutiérrez, 2014). Esta investigación tiene como objetivo el aislamiento y caracterización química



de compuestos de *J. macrocarpa* con actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerosas.

## **ANTECEDENTES**

### **Generalidades del Cáncer**

El cáncer es un problema de salud caracterizado por ser una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial. Esta enfermedad se distingue por la proliferación descontrolada de células anormales o cancerosas en el organismo y es ocasionado por diferentes factores de riesgo como los son los genéticos, físicos, químicos y biológicos (OMS, 2014). Estos agentes tienen la particularidad de alterar regiones del ADN afectando la expresión de proteínas necesarias para funcionamiento normal de la célula. Otro tipo de mutación es aquella que sufren las regiones del ADN que codifican a una proteína en particular afectando la función de la misma. En conjunto, estas afecciones al material genético tienen la capacidad de convertir el genoma de la célula de normal a canceroso (NIH, 2012).

### **Epidemiología del Cáncer**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial. En el año 2012 se registraron 8.2 millones de muertes a causa de este padecimiento en el mundo y 14 millones de nuevos casos el mismo año. Se pronostica que las muertes por cáncer seguirán aumentando y se esperan alrededor de 13 millones de muertes para el 2030 (OMS, 2014).

En los países desarrollados el cáncer es la enfermedad con mayor índice de mortalidad, solamente superado por las enfermedades cardiovasculares, los principales tipos de cáncer en países de primer mundo son: próstata, pulmón, mama y colon. Mientras que en los países en desarrollo como los de América del Sur y Asia, los tipos de cáncer más frecuentes son hígado, pulmón, estómago y cuello uterino. En México, el INEGI registró en 2011, 71 mil 350 muertes por

cáncer, siendo las principales causas de muerte el cáncer asociado a vías respiratorias, cáncer de próstata y asociado a aparato digestivo con 9.4%, 8% y 7.8% de la cifra respectivamente (INEGI, 2014).

### **Medicina Tradicional y Productos Naturales**

Se le conoce como medicina tradicional al conjunto de conocimientos y técnicas que se fundamentan en el empleo de productos naturales, ya sean plantas o animales y sus derivados, para la prevención, mejora y/o tratamiento de diferentes enfermedades. Esta práctica se desarrolla principalmente en las regiones rurales o suburbanas donde los servicios de salud son escasos. La medicina tradicional es un legado que ha sido otorgado por nuestros antepasados y que se ha transmitido de generación a generación a través de los años. En el mundo se conocen 250 mil especies vegetales, de las cuales entre 35,000 y 70,000 especies han sido utilizadas como remedio medicinal, sin embargo, independientemente de las plantas que han sido utilizadas como medicamento, de las 250,000 especies, solo el 17% han sido investigadas por su potencial biológico (Villa-Ruano, et al., 2011; Mamedov, 2012).

Las plantas como organismos autótrofos además del metabolismo primario, poseen un metabolismo secundario mediante el cual producen compuestos químicos de distinta naturaleza conocidos como metabolitos secundarios. Esta serie de compuestos son elaborados a partir de la fotosíntesis y son característicos entre especies o grupos de especies relacionadas entre sí. Poseen una gran variedad de propiedades biológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros usos (Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009).

## **El Cáncer y los Productos Naturales**

Las terapias que reciben los pacientes afectados por cáncer, suelen traer repercusiones en la persona que las recibe debido a la poca especificidad de muchos tratamientos los cuales no discriminan entre las células tumorales y las células normales no cancerosas, los que se traduce en diferentes efectos secundarios característicos que el paciente puede sufrir (Komen, 2009).

En la quimioterapia los fármacos utilizados actúan generalmente bloqueando puntos específicos del ciclo celular, por lo que afectan el desarrollo de células que están en mitosis activa como las células cancerosas, así mismo inhiben la proliferación de células normales no cancerosas de crecimiento rápido como las de médula ósea, folículos pilosos, células del sistema digestivo etc., provocando la aparición de efectos secundarios. Aunado a este problema se encuentra la resistencia que presentan algunos tumores a la quimioterapia, en este sentido, se habla de resistencia innata cuando las células cancerosas son resistentes a los fármacos aún sin haber tenido contacto previo, y resistencia adquirida cuando esta aparece después del contacto con la droga. La cinética de crecimiento y las mutaciones espontáneas son las características tumorales que determinan la resistencia (Paredes, et al., 2006; ACS, 2013). Es por ello que la ciencia está buscando alternativas que permitan la prevención y/o remisión a través de nuevos medicamentos para esta enfermedad. Los grupos de investigación que se encargan de evaluar las propiedades biológicas de los productos derivados de la naturaleza utilizan las bases de la medicina tradicional con el fin elucidar nuevos principios activos que posean mayor especificidad por las células cancerígenas procurando de esta manera una mayor eficiencia que las terapias actuales.

Los productos naturales juegan un papel muy importante en cuanto al descubriendo de nuevas drogas contra el cáncer, se sabe que alrededor de 3,000 plantas han sido utilizadas de alguna manera contra el cáncer, y un gran número

de moléculas procedentes de esta fuente han demostrado tener un efecto potencial anticancerígeno, cabe destacar que más del 60% de los agentes quimioterapéuticos proceden de los productos derivados de la naturaleza. Entre los ejemplos más conocidos de agentes quimioterapéuticos aislados de plantas tenemos a la Vinblastina de *Catharanthus roseus* y Taxol de *Taxul brevifolia* (Amos & Löwe, 1999; Cragg & Newman, 2005; Villa-Ruano, et al., 2011).

### ***Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl (*J. macrocarpa*) Características y Uso Medicinal**

*J. macrocarpa* es una planta perteneciente a la familia *Theophrastaceae*; es un árbol pequeño que puede llegar a alcanzar los seis metros de altura, tiene un color de corteza gris oscuro y una corona densa de hojas verde oscuro, se encuentra en llanuras y cerros áridos en diferentes regiones de Sonora y Sinaloa. Como remedio medicinal, la cultura Mayo utiliza la flor macerada en agua como tratamiento para la deshidratación, en cambio, para el dolor de pulmones se cuecen las cáscaras del fruto para beberse el producto del cocimiento, para los mareos se lava la cara con una infusión de sus flores, y esa misma infusión se dice funciona como remedio para el dolor de oído (López Estudillo & Hinojosa García, 1988; Yetman & Van Devender, 2002).

### **Actividad Biológica del Género *Jacquinia***

Existen diferentes especies del género *Jacquinia* distribuido por lo amplio del territorio mexicano, desde el estado de Sonora hasta Yucatán, y algunas de ellas son utilizadas como remedio medicinal por las tribus locales. Independientemente del uso medicinal que se les ha atribuido a especies del género *Jacquinia*, en los laboratorios de investigación se les han demostrado actividad biológica como la antifúngica y la antiproliferativa, así como el aislamiento e identificación de

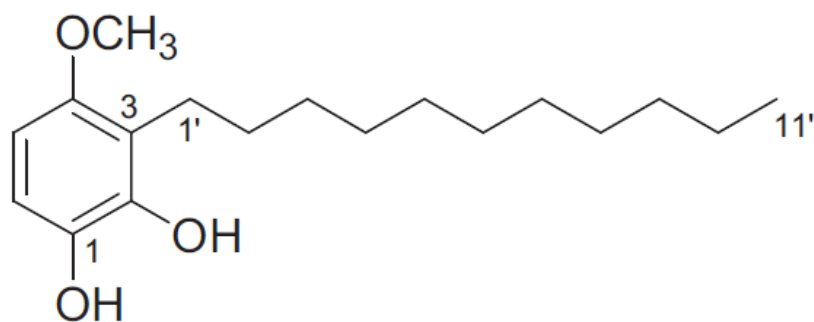
moléculas a las que se les atribuye dicha actividad. Según lo estipulado por el National Cancer Institute (NCI), un extracto obtenido a partir de un producto natural se considera citotóxico cuando la IC<sub>50</sub> (concentración media máxima para inhibir el 50% de la proliferación celular) es menor a 30 µg/mL, la fracción hexánica obtenida del extracto metanólico de *Bonellia albiflora* (*Jacquinia albiflora*) posee actividad antiproliferativa considerada como citotóxica para las líneas celulares cancerosas KB (carcinoma nasofaríngeo, HeLa (carcinoma de cérvix), Hep-2 (carcinoma de laringe) y SiHa (carcinoma escamoso de cérvix), aún no han sido identificados los posibles compuestos responsable de dicha actividad en *Bonellia albiflora* (Zapata, et al., 2009; Moo-Puc, et al., 2013). Estudios de especies del género *Jacquinia* han dado como resultado el aislamiento de compuestos con actividad biológica. A partir del extracto metanólico de las raíces de *Jacquinia flammea* fue aislado e identificado el triterpeno glicosilado sakurasosaponina (Figura 1), a través de ensayos antifúngicos biodirigidos (Yetman & Van Devender, 2002; García-Sosa, et al., 2011), de la misma manera a partir del extracto metanólico de las raíces de *Jacquinia macrocarpa*, con la diferencia de que el estudio biodirigido fue de actividad antiproliferativa, se aisló e identificó a bonediol (Figura 2), compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en las líneas celulares KB, Hep-2 y SiHa que se encuentra presente en las raíces de *J. macrocarpa* (Caamal-Fuentes, et al., 2011b).



## Líneas Celulares

La línea celular A549 (carcinoma alveolar humano) fue utilizado como línea celular monitor en los ensayos de proliferación celular para identificar los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa de *J. macrocarpa*, ya que se ha demostrado ser la línea celular más susceptible dentro de un panel de líneas celulares evaluadas (Vidal Gutiérrez, 2014).

Una vez aislado el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa se evaluó dicha actividad antiproliferativa de la molécula en las líneas celulares HeLa (carcinoma de cérvix humano), LS-180 (cáncer de colon humano) y ARPE-19 (retina humana). Estas líneas celulares fueron seleccionadas debido a que cada una de ellas representa aquellos tipos de cáncer que se presentan con gran incidencia y mortalidad en los registros clínicos; en cuanto a la línea celular ARPE-19, la cual, a diferencia del resto es no cancerosa, por lo que es utilizada como referencia para observar el comportamiento de la molécula aislada en una línea celular no cancerosa en el ensayo de proliferación celular.



**Figura 2.** Estructura de bonediol. Compuesto con actividad antiproliferativa presente en las raíces de *J. macrocarpa* (Caamal-Fuentes, et al., 2011b).



Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagles's Medium (Sigma-Aldrich™) suplementado al 5% con suero fetal bovino (Gibco®) (D5F), a 37°C en una incubadora (Thermo Fisher Scientific) con una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub>. La manipulación de los cultivos celulares se llevó a cabo en un gabinete de bioseguridad tipo II (LABCONCO®) equipada con filtros HEPA.

### **Actividad Antiproliferativa por el ensayo del Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)**

El ensayo del MTT se basa en la reducción metabólica realizada por la mitocondria sobre este compuesto por la enzima succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado llamado formazan. De esta manera se determina la funcionalidad de las mitocondrias de las células expuestas al agente. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido (Mosmann, 1983).

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos, fracciones y la del compuesto aislado, las muestras fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO [SIGMA-ALDRICH]) a una concentración de 40 mg/mL. De esta solución se tomaron 10 µL y se suspendieron en 990 µL del medio D5F para obtener una concentración final del extracto de 400 µg/mL. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas a concentraciones de 400 µg/mL a 3.1 µg/mL. Una vez realizadas las soluciones de las muestras se preparó una suspensión de células con 200,000 cel/mL que se distribuyó en una placa de 96 pozos colocando 50 µL a cada pozo de la placa de ELISA. Se incubó la placa con 10,000 células por pozo en condiciones de cultivo por un tiempo de 24 h. Después de este tiempo, se le adicionó a cada pozo 50 µL de cada una de las diluciones de las muestras a evaluar, se dejó incubar en condiciones de cultivo por un periodo de 48 h con observaciones periódicas al microscopio a lapsos de 24 y 48 h. Una vez

realizadas las observaciones pertinentes, después de las 48 h la placa fue lavada con una solución reguladora de fosfatos (PBS) 1X para añadirle nuevamente 100  $\mu$ L de D5F, en ese momento se le adicionaron 10  $\mu$ L de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS 1X, la cual se dejó reposar por 4 h en condiciones de cultivo. Una vez concluido el tiempo de incubación, los cristales de formazan que se formaron fueron disueltos en 100  $\mu$ L de isopropanol acidificado para ser analizados en un lector de placas de ELISA (Benchmark microplate reader: Bio-Rad: Hercules CA. USA) a una longitud de onda de 570 nm y otra de 630 nm como referencia. Se utilizaron concentraciones de DMSO de 0.01-0.5% como control del vehículo (Rascón-Valenzuela, et al., 2015; Torres-Moreno, et al., 2015).

### **Obtención de Extractos Crudos de *J. macrocarpa***

Se utilizaron separadamente, partes aéreas y cáscaras de fruto. Se usó hexano (Hx), diclorometano (DiClMe), acetato de etilo (EtOAc) y metanol (MeOH) para obtener 4 extractos de cada muestra dando un total de 8 extractos crudos obtenidos, todos los solventes y muestras fueron manipuladas bajo la siguiente metodología: en principio, el material vegetal fue secado a temperatura ambiente, después se trituraron las muestras en un molino tipo Wiley, una vez trituradas se dejaron reposar en el solvente con relación 1:10 p/v durante 10 días con periodos regulares de agitación. La solución resultante se sometió a filtración para posteriormente ser secada a presión reducida a una temperatura de 40 °C en un evaporador rotatorio. El extracto crudo resultante fue secado a temperatura ambiente y almacenado en recipientes color ámbar a 4°C hasta su empleo en las pruebas posteriores (Jiménez Estrada, et al., 2013).

## **Aislamiento y Separación por Técnicas Cromatográficas de las Muestras con Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549**

El aislamiento del compuesto responsable de la actividad antiproliferativa fue realizado en conjunto con la monitorización de la actividad antiproliferativa mediante el método del MTT sobre la línea celular A549 estableciéndose el siguiente protocolo: en un embudo de separación fue colocada una solución integrada por 20 g del extracto metanólico (ExMeOH) de las cáscaras del fruto en 125 mL de metanol y agua (3:2), posteriormente se procedió a fraccionar la solución por gradiente de polaridad comenzando por Hx (FxHx), después EtOAc (FxAc) y terminando con 2 fracciones residuales; fracción residual 1 soluble (FxR1) y fracción residual 2 insoluble (FxR2), las cuatro fracciones fueron secadas a presión reducida en un evaporador rotatorio a 40 °C. De FxR2, dos gramos fueron inyectados en una columna cromatográfica (4.5 cm x 45 cm) con sílica gel (Sigma-Aldrich™) de 200-400 mesh el tamaño de las partículas como fase estacionaria, el fraccionamiento se realizó aumentando la polaridad de la fase móvil con la mezcla de solventes EtOAc:MeOH (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100) obteniendo 8 sub fracciones (FxR2S1-FxR2S8), las FxR2S6 y FxR2S7 (fracciones con actividad antiproliferativa en A549) fueron utilizadas como referencia en la cromatografía de capa fina para realizar una nueva separación de la FxR2 a las mismas condiciones en la columna cromatográfica, donde la sub-fracción 8, extraída con la mezcla EtOAc:MeOH (6:4), resultante de esta separación se sometió a los análisis espectroscópicos para la elucidación de la estructura molecular.

La monitorización de las muestras, fracciones y sub-fracciones se realizó por cromatografía en capa fina con cromatofolios (Sigma-Aldrich™) 5 cm x 10 cm utilizando la fase móvil de EtOAc:MeOH (4:6) y vainillina fosfórica como revelador. Brevemente, se siembra la muestra disuelta en MeOH a 7 mm de la base del cromatofolio con la ayuda de un capilar, se coloca una línea a 5 mm antes del final de la placa cromatográfica que indica hasta donde llegara la fase

móvil, se satura la cámara con la mezcla de solventes de tal manera que la altura del líquido no supere los 5 mm dentro del recipiente, esto para no interferir con el punto de aplicación de la muestra en el cromatofolio, una vez saturada la cámara de solvente, se introduce la placa dentro del recipiente y se tapa, se espera hasta que la fase móvil alcance la línea indicativa del final de la fase móvil, se retira la placa cromatográfica de la cámara y se deja secar, una vez seco el cromatofolio, este es rociado con vainillina fosfórica para finalmente ser calentado a una temperatura de 120 – 160 °C por 5 – 15 min. El agente revelador reacciona con esteroides, esteroides, triterpenos, curcubitacinas, glicósidos digitales, prostaglandinas y saponinas, formando un color que va desde el morado – violeta hasta el negro, ciertos compuestos una vez revelada la placa fluorescen a 365 nm, como es el caso de ciertos glicósidos digitales, curcubitacinas y esteroides.

### **Caracterización Química del Compuesto con Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549 por Técnicas de Resonancia Magnética Nuclear y HPLC-MS**

Para la determinación del peso molecular fue utilizado un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Agilent Technologies) equipado con una columna Synergi 4u Polar-RP 80A 150 x 2.0 mm y con un espectrómetro de masas Bruker Squire 6000.

Las condiciones en la que se llevó a cabo el experimento fueron las siguientes, se montaron en la columna 2 mg de la muestra y se comenzó a eludir con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O relación 40:60, y después de 20 minutos terminó con 100:0 de la misma mezcla, esto con un flujo de 0.2 mL/min. En el espectrómetro de masas, fue seleccionada la técnica de ionización por electroaspersión (ESI) de ion positivo (Na<sup>+</sup>), el barrido se realizó con una ventana de 50-2500 m/z, una temperatura de secado de 300 °C, en el nebulizador se manejó un flujo de gas de 7 L/min y 30 psi de presión.

Para la elucidación estructural se utilizaron técnicas de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y COSY, el experimento se llevó a cabo en un equipo Bruker ascend console advance III de 700 MHz utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolvente de la muestra, los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportaron en ppm y las constantes de acoplamiento en Hz.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Obtención de los Extractos Crudos de *J. macrocarpa* y Evaluación de la Actividad Antiproliferativa**

Se realizó la extracción de las muestras con cuatro solventes diferentes, lo que dio un total de ocho extracciones, sin embargo, solo siete fueron obtenidas (Tabla I). El mayor rendimiento se observó en el ExMeOH, por lo tanto, el presente resultado nos indica que la naturaleza de la mayoría de los compuestos que integra el material vegetal seco es de naturaleza polar. Posteriormente, para realizar la selección del extracto crudo con el cual se trabajó, se procedió a realizar la evaluación de la actividad antiproliferativa de los siete extractos obtenidos sobre la línea celular A549, ya que se ha demostrado que esta línea celular es lábil a los compuestos que integran esta planta. Los resultados indicaron que la menor IC<sub>50</sub> (mínima concentración requerida para inhibir el 50% de la proliferación celular) de cada muestra la presentó el ExMeOH (Tabla II). Comparando la actividad antiproliferativa de los dos ExMeOH, la mayor actividad la obtuvo aquella que fue extraída de las cáscaras del fruto; este resultado, concuerda con las investigaciones realizadas sobre los ExMeOH de *J. macrocarpa*, donde el ExMeOH de las cáscaras del fruto posee mayor actividad antiproliferativa que el ExMeOH de las partes aéreas sobre la línea celular A549 (Vidal Gutiérrez, 2014). Dichas evaluaciones indican que los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa en A549, se encuentran mayoritariamente en el ExMeOH de las cáscaras del fruto, por lo tanto, la línea de investigación continuó por este camino.

## Fraccionamiento del Extracto Metanólico de las Cáscaras del Fruto y Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Obtenidas

Al tratarse de un estudio biodirigido, los pasos subsecuentes se basaron en la selección de aquellas fracciones que presentaron el menor valor de IC<sub>50</sub> sobre la línea celular A549 para posteriormente ser fraccionadas nuevamente hasta obtener el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa sobre dicha línea celular.

**Tabla I.** Rendimientos de extractos crudos de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl<sup>a</sup>

Muestra	Hx	DiCIME	EtOAc	MeOH
Partes aéreas	0.6	2.3	2.3	11.8
Cáscara de fruto	SN <sup>b</sup>	0.9	1.1	11.1

<sup>a</sup> Valores expresados en % respecto al peso del material seco utilizado para la extracción.

<sup>b</sup> Sin rendimiento.

En el fraccionamiento realizado sobre el ExMeOH de las cáscaras del fruto se obtuvieron cuatro fracciones; FxHx, FxAc, FxR1 y FxR2, con rendimientos de 0.71%, 8.19%, 55.2% y 35.9% respectivamente, a estas fracciones se les determinó la actividad antiproliferativa en A549 (Tabla III).

Se conoce un compuesto procedente de *J. macrocarpa* que posee actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, se trata de bonediol, un alquil catecol (Figura 2) aislado del ExMeOH de las raíces de la planta (Caamal-Fuentes, et al., 2011). En un principio, el ExMeOH de las raíces de *J. macrocarpa* fue probado para medir su actividad antiproliferativa en las líneas celulares A549 y HeLa con IC<sub>50</sub> de >50 µg/mL y 39.4 µg/mL respectivamente. Este resultado difiere con la actividad antiproliferativa que se obtiene del ExMeOH de las

cáscaras del fruto, donde la IC<sub>50</sub> para la LC A549 es de 33.1 µg/mL, sin embargo, la posibilidad de encontrar bonediol en nuestras muestras continuó hasta este punto. La diferencia se observó al realizar los ensayos de proliferación celular de las fracciones del ExMeOH, ya que en la investigación donde se aisló bonediol (molécula poco polar), se partió de la FxHx procedente del ExMeOH de las raíces, por lo tanto, al observar que la menor IC<sub>50</sub> mostrada en las fracciones de las cáscaras del fruto pertenece a FxR2 (fracción polar) se descarta a bonediol como la molécula responsable de la actividad antiproliferativa de las cáscaras del fruto de *J. macrocarpa* debido a la diferencia en la naturaleza polar de las fracciones de trabajo (Caamal-Fuentes, et al., 2011a; Caamal-Fuentes, et al., 2011b).

**Tabla II.** Actividad antiproliferativa de extractos crudos de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl en la línea celular A549<sup>a</sup>

Muestra	Hx	DiCIME	EtOAc	MeOH
Partes aéreas	ND <sup>b</sup>	170 ± 18	170.5 ± 23.3	84.8 ± 1.9
Cáscara de fruto	NE <sup>c</sup>	169.5 ± 12	ND	33.1 ± 0.9

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> en [µg/mL].

<sup>b</sup> No detectada a la máxima concentración evaluada de 200 µg/mL.

<sup>c</sup> No evaluada; sin rendimiento en la extracción.

**Tabla III.** Actividad antiproliferativa de las fracciones del extracto metanólico de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl <sup>a</sup>

Línea celular	FxHx	FxAc	FxR1	FxR2
A549	46.4 ± 0.8	ND <sup>b</sup>	62.2 ± 1.8	28.5 ± 0.8

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> en [µg/mL].

<sup>b</sup> No detectada a la máxima concentración evaluada de 100 µg/mL.



## **Separación de la Fracción Residual 2 y Actividad Antiproliferativa de las Sub-Fracciones Obtenidas**

De la FxR2, precipitado obtenido después del fraccionamiento con Hx y EtOAc del ExMeOH, se obtuvieron ocho sub-fracciones (Tabla IV), a las cuales se les evaluó la actividad antiproliferativa en la LC A549 (Tabla V), siendo FxR2S6 y FxR2S7 aquellas que presentaron la mayor actividad antiproliferativa de las ocho sub-fracciones obtenidas.

A diferencia de otras plantas que han sido investigadas por su actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, donde por lo general los compuestos de interés se encuentran en polaridad media, este estudio nos llevó a un punto donde tanto FxR2 como como sus respectivas sub-fracciones activas, obtenidas mediante una mezcla de solventes que resultó en una solución polar (EtOAc y MeOH 6:4), realizando una pequeña comparación con una planta perteneciente a la etnofarmacopea del Noroeste de México, de la cual ya se tiene identificado el compuesto responsable de actividad antiproliferativa de la misma; *Ibervillea sonoreae*, de ella se obtiene a kinoína A, esta molécula fue aislada a partir de una fracción de EtOAc obtenida del ExMeOH de la raíz y después de ciertos pasos finalmente fue aislada por HPLC con una mezcla de solventes de Hx, isopropanol y etanol (84:10:6), mezcla que resulta en una polaridad menor a la utilizada para la obtención de las fracciones activas de *J. macrocarpa* (Torres-Moreno y col., 2015). No hay relación alguna entre la naturaleza polar de las moléculas con la actividad antiproliferativa que presentan.

## **Aislamiento y Caracterización Química del Compuesto con Actividad Antiprolifertiva en A549**

Una vez obtenidas las sub-fracciones activas (FxR2S6 y FxR2S7) de FxR2, se procedió a identificar el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en la línea celular A549. Uno de los principales inconvenientes que se presentó durante la separación de los compuestos que integran estas sub-fracciones, fue la cantidad de muestra, como solución a este problema se procedió a realizar otra columna cromatográfica de FxR2 con el objetivo de generar una mayor cantidad de muestra activa para realizar los análisis correspondientes hacia la caracterización e identificación del compuesto activo. Se tomaron los factores de retención de cromatografía en capa fina de FxR2S6 y FxR2S7 como referencia para esa segunda columna cromatográfica de FxR2.

**Tabla IV.** Rendimiento de las sub-fracciones obtenidas de FxR2

Sub-fracción	Rendimiento <sup>a</sup>
FxR2S1	1.92
FxR2S2	3.45
FxR2S3	13.0
FxR3S4	5.31
FxR2S5	2.76
FxR2S6	26.14
FxR2S7	11.25
FxR2S8	8.94

<sup>a</sup> Valores expresados en % respecto al peso del material seco utilizado para el fraccionamiento.

## **Columna Cromatográfica**

Una vez identificados los sistemas de solventes a los cuales son arrastradas las fracciones de interés en la columna cromatográfica, el separar las fracciones activas se torna más sencillo, bajo las mismas condiciones que la primer columna cromatográfica de FxR2, se obtuvo la sub-fracción 8 (NFxR2S8), extraída con la mezcla de EtOAc:MeOH relación 6:4, esta nueva sub-fracción posee el mismo factor de retención (Rf) de 0.48 en cromatografía de capa fina con la fase móvil conformada por la mezcla de solventes EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O relación 6:3:1 que tienen las sub-fracciones FxR2S6 y FxR2S7. La gran diferencia, es que tanto FxR2S6 y FxR2S7 presentan un patrón de corrimiento por debajo de la banda mayoritaria con Rf de 0.48 que no se encuentra en NFxR2S8 cuando se es revelada con vainillina fosfórica en cromatografía en capa fina, es decir, NFxR2S8 solo muestra una banda con una Rf de 0.48.

**Tabla V.** Actividad antiproliferativa de las sub-fracciones obtenidas de FxR2 en A549

Sub-fracción	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
FxR2S1	ND <sup>b</sup>
FxR2S2	ND
FxR2S3	ND
FxR3S4	ND
FxR2S5	ND
FxR2S6	11.02 ± 0.28
FxR2S7	13.28 ± 0.35
FxR2S8	20.95 ± 0.62

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> en [µg/mL]

<sup>b</sup> No detectada a la máxima concentración evaluada de 50 µg/mL

En el transcurso del fraccionamiento de las muestras activas, se probaron diferentes reveladores en las cromatografías de capa fina con el objetivo de observar con mayor detalle la complejidad de la muestra así como para identificar familias de compuestos en los siguientes fraccionamientos. Se comenzó utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% y sulfato sérico para observar todo compuesto orgánico presente en la muestra a revelar, después, con el fin de tratar de identificar familias de compuestos, se probaron diferentes reveladores como lo son el reactivo de Dragendorff para alcaloides y vainillina fosfórica para triterpenos, esteroides y saponinas. El revelador a base de vainillina fosfórica fue el que reveló los cromatofolios exponiendo la complejidad de la mezcla en la cromatografía de capa fina. La alta polaridad a la que se extraen los compuestos de la cromatografía en columna, así como la mezcla de solventes que resulta polar utilizada para separar los componentes que integran las fracciones activas, el revelado con vainillina fosfórica que muestra patrones de bandeo en el cromatofolio una vez revelado y el antecedente de la identificación de saponinas como sakurasosaponina de plantas del género *Jacquinia* (García-Sosa, et al., 2011), lleva a la posibilidad de encontrar compuestos tipo saponinas como responsables de la actividad antiproliferativa en la sub-fracción activa.

### **Determinación del Peso Molecular por HPLC–MS**

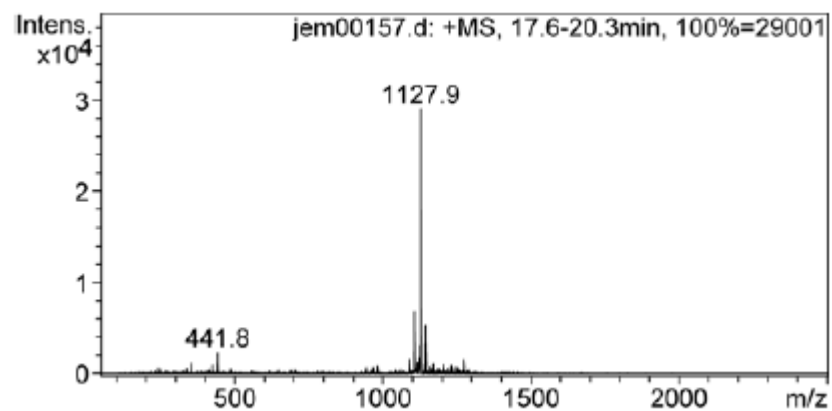
Debido a la hipótesis generada durante la fase de fraccionamiento y monitorización por cromatografía en capa fina, se optó por utilizar técnicas que permitieran la determinación del peso molecular de saponinas; cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC–MS por sus siglas en inglés [*High performance liquid chromatography – mass spectrometry*]) equipado con columna de fase reversa y equipo de ionización por electrospray de ion positivo (Na<sup>+</sup>) (ESI<sup>+</sup>) para obtener el patrón de corrimiento del compuesto así como la correcta fragmentación e ionización de moléculas tipo saponinas

respectivamente (Han, et al., 2009). Bajo las condiciones establecidas en la sección de materiales y métodos, la sub-fracción activa presentó un tiempo de retención de 17.6 – 20.3 min y en el espectro de masas se obtuvo un valor de 1127.9 m/z (Figura 3). La característica de la técnica ESI<sup>+</sup>, es que el bombardeo de Na<sup>+</sup> que sucede dentro de la cámara del espectrómetro de masas con el fin de fraccionar y cargar los fragmentos de la molécula, enlaza el Na<sup>+</sup> a los fragmentos moleculares, de tal manera que una vez obtenido el valor m/z que arroja el espectrómetro de masas, se tiene que restar el valor de Na<sup>+</sup> a dicho valor, por lo tanto es necesario realizar la siguiente operación, donde el valor de m/z obtenido por la técnica ESI<sup>+</sup> es 1127.9 y el valor de m/z de Na<sup>+</sup> en 23, entonces:

$$m/z = 1127.9 - 23$$

$$\underline{m/z = 1104.9}$$

Por lo tanto, la relación m/z correspondiente a nuestra molécula de interés es de 1104.9, valor que fue comparado con el peso molecular resultante de la elucidación estructural por las técnicas de RMN utilizadas. El tiempo de retención obtenido y la m/z de este compuesto no fueron suficientes para identificar la muestra analizada solo con el uso de esta técnica.



#	m/z	I
1	441.8	2265
2	1106.0	6792
3	1106.9	3578
4	1123.0	1755
5	1125.9	3051
6	1127.9	29001
7	1128.5	17923
8	1129.6	7088
9	1143.7	5278
10	1144.6	3353

**Figura 3.** Tiempo de retención y espectro de masas de sub-fracción activa.

## **Caracterización Química por RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y COSY a 700 MHz**

Las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), son de las principales herramientas utilizadas para la elucidación de las estructuras químicas de compuestos aislados, brevemente, dependiendo del tipo de análisis seleccionado, el objetivo principal es observar el ambiente químico en el cual se encuentran los átomos que integran la molécula, por ejemplo, el espectro de un análisis de  $^1\text{H}$  muestra el ambiente químico de los átomos de  $^1\text{H}$  que contiene la molécula y sucede lo mismo para el espectro de un análisis de  $^{13}\text{C}$ . En el caso de los análisis bidimensionales, estos correlacionan las señales de dos espectros para determinar la relación entre un átomo y otro; HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), mediante este análisis se correlacionan los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con el objetivo de concretar que átomo de hidrógeno se encuentra enlazado directamente con cual átomo de carbono; HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), al igual que HSQC también se correlacionan los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , sin embargo, este análisis determina la correlación que existe entre un protón y un carbono a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia; COSY (*Correlation Spectroscopy*) nos indica la correlación que existe entre patrón y protón de dos a tres enlaces de distancia mediante el análisis de correlación de dos espectros de  $^1\text{H}$ . La frecuencia utilizada en los análisis de esta investigación es de 700 MHz, tal potencia confiere una mayor resolución y nitidez a cada señal ilustrada en los espectros de cada experimento, de esta manera, las señales, al ser más claras permite distinguir los diferentes desplazamientos que presentan los átomos que integran la molécula al momento del análisis.

El correcto análisis de los experimentos de RMN (Anexo 1 – Anexo 5) ha permitido elucidar el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa presente en las cáscaras de fruto de *J. macrocarpa* (Tabla VI, VII y VIII) (Figura 4 y 5).

**Tabla VI.** Datos de  $^1\text{H-RMN}^a$ 

Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)	Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)
1	1.72	m	16	3.87	m
1'	0.98	m	18	1.50	m
2	2.01	m	19	2.37	dd(11.91, 14.47)
2'	1.74	m	19'	1.18	d (5.35)
3	3.19	d (4.65)	21	2.08	m
5	0.726	dd (2.28, 11.9)	21'	1.88	m
6	1.485	m	22	1.77	m
6'	1.435	m	22'	1.50	m
7	1.53	m	23	1.05	s
7'	1.22	m	24	0.859	s
9	1.26	m	25	0.888	s
11	1.595	qd (12.95, 12.8, 12.8, 4.62)	26	1.14	s
11'	1.455	m	27	1.22	s
12	2.03	m	28	3.48	d (7.5)
12'	1.28	dd (3.83, 6.28)	28'	3.11	d (7.51)
15	2.09	m	29	0.942	s
15'	1.23	m	30	0.901	s

<sup>a</sup> El espectro fue medido en metanol- $d_4$  a 700 MHz. Las asignaciones son derivados de HSQC y COSY.



El compuesto identificado es un triterpeno glicosilado perteneciente a la familia de las saponinas llamado Primulasaponina 1, molécula formada por un triterpeno y cuatro motivos de carbohidratos el cual ha sido previamente identificado en *Primula sp.*, (*Primula veris* y *Primula elatior*) utilizada en Europa como expectorante para la bronquitis, (Siems, et al., 1998).

**Tabla VII.** Datos de  $^1\text{H-RMN}$ : protones de azúcar <sup>a</sup>

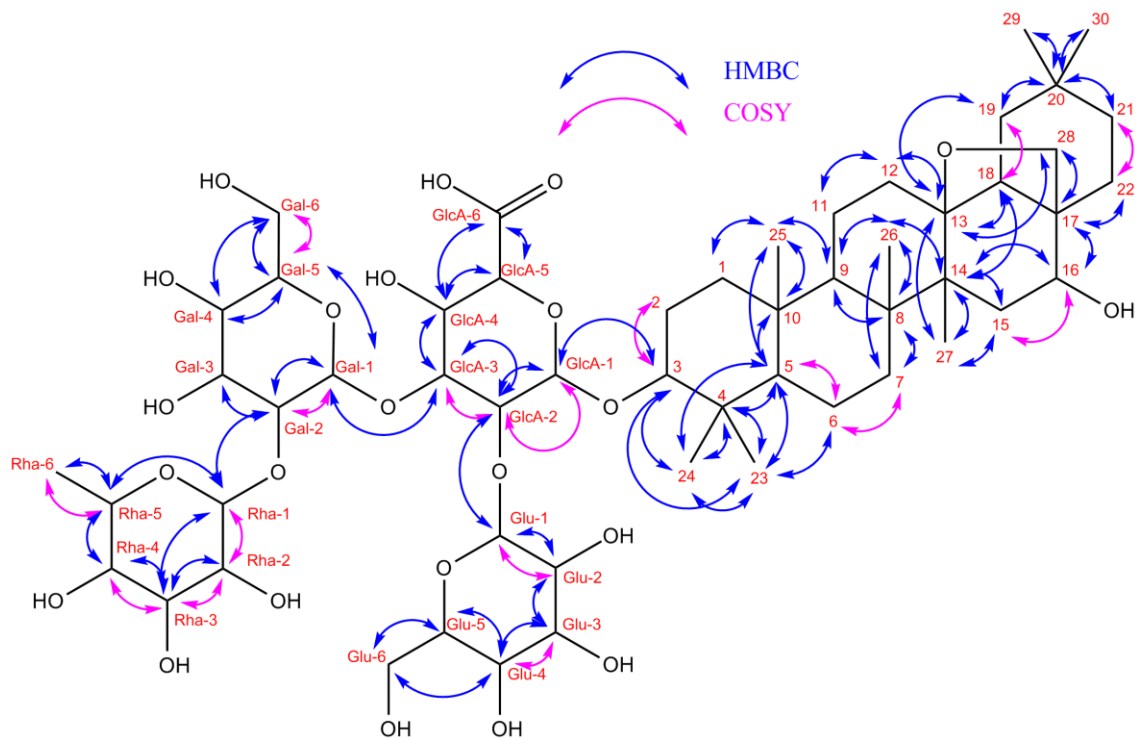
Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)	Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)
GlcA-1	4.44	d (7.89)	Rha-2	3.94	dd (1.61, 3.36)
GlcA-2	3.9	dd (7.9, 8.95)	Rha-3	3.7	m
GlcA-3	4.05	t (9,9)	Rha-4	3.4	d (9.54)
GlcA-4	3.58	d (9.34)	Rha-5	4.1	dq (5.85, 6, 6, 9.55)
GlcA-5	3.63	d (9.34)	Rha-6	1.25	d (2.09)
Gal-1	5.18	d (7.74)	Glu-1	4.86	d (8.34)
Gal-2	3.78	m	Glu-2	3.22	dd (7.59, 9.5)
Gal-3	3.72	m	Glu-3	3.33	t (9.2, 9,2)
Gal-4	3.7	m	Glu4	3.05	dd (8.9,9.8)
Gal-5	3.52	m	Glu-5	3.38	m
Gal-6 <sub>1</sub>	3.8	d (2.23)	Glu-6 <sub>1</sub>	3.61	dd (2.7, 4.1)
Gal-6 <sub>2</sub>	3.65	dd (7.28, 4.66)	Glu-6 <sub>2</sub>	3.53	dd (3.7, 7.7)
Rha-1	5.27	d (1.57)			

<sup>a</sup> El espectro fue medido en metanol-d<sub>4</sub> a 700 MHz. Las asignaciones son derivados de HSQC y COSY.

**Tabla VIII.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN<sup>a</sup>

Carbón	ppm	Carbón	Ppm	Carbón	ppm	Carbón	ppm
1	40.28	15	37.37	29	33.93	Rha-1	101.99
2	27.02	16	78.09	30	24.98	Rha-2	72.63
3	92.04	17	45.37	GlcA-1	105.44	Rha-3	72.25
4	40.73	18	52.43	GlcA-2	79.27	Rha-4	73.72
5	56.85	19	39.78	GlcA-3	81.08	Rha-5	70.2
6	18.73	20	32.4	GlcA-4	72.1	Rha-6	17.93
7	35.18	21	37.04	GlcA-5	76.87	Glu-1	102.5
8	43.27	22	32.14	GlcA-6	175.93	Glu-2	76.15
9	51.4	23	28.25	Gal-1	100.79	Glu-3	77.88
10	37.8	24	16.78	Gal-2	75.88	Glu-4	72.63
11	19.81	25	16.81	Gal-3	76.1	Glu-5	78.13
12	33.35	26	18.83	Gal-4	72.98	Glu-6	63.51
13	88.39	27	19.93	Gal-5	76.87		
14	45.28	28	78.68	Gal-6	62.74		

<sup>a</sup> El espectro fue medido en metanol-d<sub>4</sub> a 700 MHz.



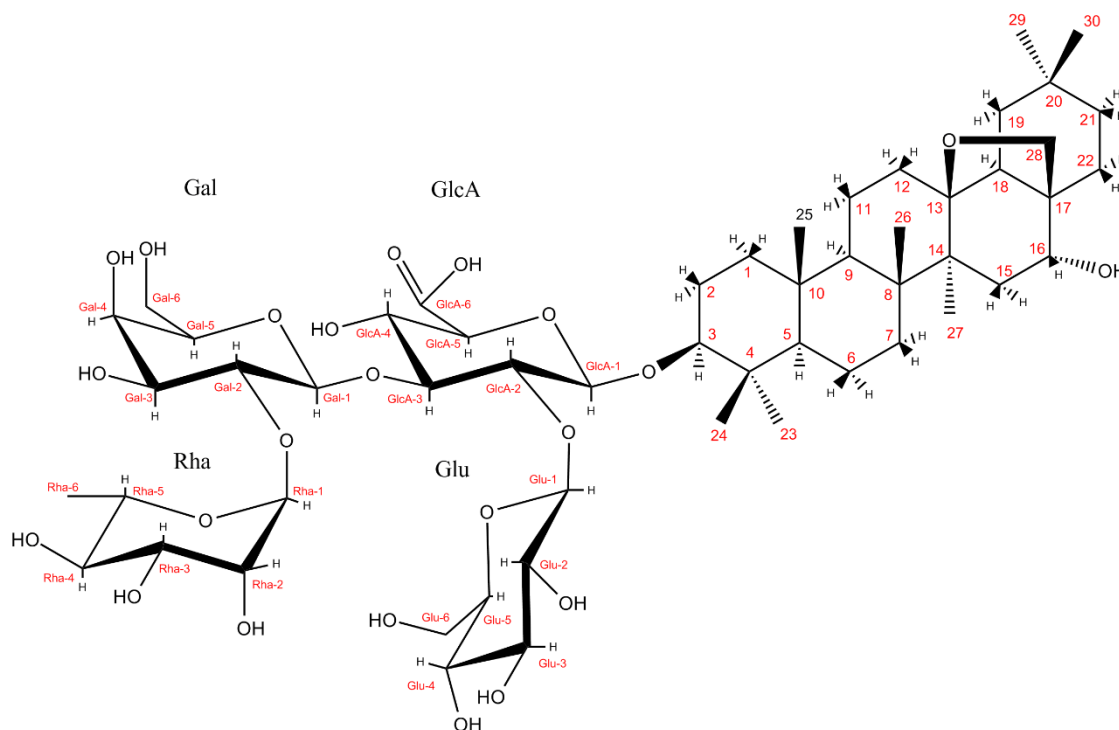
**Figura 4.** Análisis de correlación de los diferentes espectros de RMN para la elucidación de Primulasaponina 1.

La elucidación de la compleja estructura de esta saponina, fue gracias al análisis y correlación de los datos obtenidos de los espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC y COSY (Figura 4), una vez obtenida y analizada la información correspondiente de la tabla VI, VII y VIII, con ayuda de HMBC, COSY y los análisis de acoplamiento en  $J$  (Hz) del espectro de  $^1\text{H}$ , fue posible determinar la estructura que se observa en la Figura 5, estos resultados fueron cotejados con el estudio de Siems y col. (1998) donde identifican esta misma molécula en el extracto de raíz de *Primula sp* con los análisis de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, NOE, HMQC y HMBC a 400 MHz a diferencia de  $^{13}\text{C}$  que fue a 100 MHz observándose

los mismos desplazamientos tanto para los átomos de  $^1\text{H}$  como para los de  $^{13}\text{C}$  (Anexo 6, 7 y 8) (Siems, et al., 1998).

### Primulasaponina 1, El Triterpeno Glicosilado Aislado de *J. macrocarpa* con Actividad Antiproliferativa en A549

Primulasaponina 1 no cuenta con reportes de actividad antiproliferativa sobre ninguna línea celular. Esta molécula lleva dicho nombre debido al género de planta donde fue reportada por vez primera, *Primula sp.*, misma que es utilizada en Europa como expectorante para la bronquitis, sin embargo, no se ha determinado si dicha actividad expectorante es efecto de Primulasaponina 1 (Siems, et al., 1998).



**Figura 5.** Estructura elucidada a base de los espectros de RMN.

GlcA: ácido glucoronico, Gal: galactosa, Glu: glucosa; Rha, ramnosa

El termino saponina define a un grupo de compuestos que consisten en una aglicona derivada de isoprenoides, llamada genina o sapogenina, unido covalentemente a uno o más residuos de azúcar, resultando en compuesto anfipático que en solución acuosa produce una característica espuma. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos por la naturaleza, el contenido de saponinas, así como la naturaleza de las mismas se ve alterado por factores como la especie de la planta, el origen genético, la región donde la planta fue examinada, el ambiente y los factores agronómicos asociados con el crecimiento del organismo vegetal. La naturaleza química única de las saponinas demanda la necesidad de sofisticadas tecnologías para su aislamiento del material vegetal y para el posterior análisis en la elucidación estructural. Si bien el rol que las saponinas juegan en la naturaleza como metabolito secundario es poco conocido, se ha demostrado que poseen diversas actividades biológicas. Entre las más estudiadas se encuentra la actividad hemolítica, esto se debe a la naturaleza anfipática que le confieren los motivos de carbohidrato y la genina, de tal manera que le permiten interactuar con la membrana de los eritrocitos (y otras células), particularmente con el colesterol que se encuentra interactuando con los fosfolípidos, dando como resultado un aumento de la permeabilidad de la mismas afectando la ósmosis del eritrocito produciendo lisis celular. También se han descrito actividades biológicas del tipo expectorante, antibacteriano y antifúngico (Chindo, et al., 2012).

A demás de Primulasaponina 1, existe otra saponina con actividad biológica aislada de una planta del género *Jacquinia*. Esta molécula es sakurasosaponina (Figura 1), identificada mediante ensayos y fraccionamientos bioguidados para la actividad antifúngica del ExMeOH de las raíces de *Jacquinia flammea*. Primulasaponina 1 y sakurasosaponina tienen ciertas características estructurales en común, ambas están formadas por la misma genina, la cual lleva por nombre 13,28-epoxy-3,16-oleanano-diol, esto sin los motivos de carbohidratos que ambas saponinas poseen en el carbono 3 del triterpeno. En

cuanto a los motivos de carbohidratos que presentan ambos triterpenos glicosilados, sakurasaponina contiene los mismos carbohidratos y enlaces glucosídicos que Primulasaponina 1 con la diferencia de contar con una ramnosa más, la cual forma enlace glucosídico en el carbono 2 de la ramnosa 1 (Figuras 1 y 5) (Yannai, 2012; García-Sosa, et al., 2011).

Como ya fue mencionado anteriormente, una gran cantidad de compuestos naturales, y sus derivados, son utilizados en la medicina contra el cáncer. En el particular caso de las saponinas, además de las diferentes actividades biológicas que se les han descrito, moléculas como dioscina, gracilina entre otras saponinas, han sido estudiadas por su efecto antiproliferativo, estudios más específicos de estas moléculas señalan la inducción de muerte celular por apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón, así como el estar involucradas en diferentes procesos relevantes de la inhibición del crecimiento tumoral pulmonar (Li, et al., 2013).

#### **Actividad Antiproliferativa de Primulasaponina 1 en las Líneas Celulares A549, HeLa, LS180 y ARPE-19**

Como antecedente a este estudio se cuenta con la actividad antiproliferativa del ExMeOH de las partes aéreas y de las cáscaras del fruto de *J. macrocarpa* en las líneas celulares A549, HeLa, M12.C3.F6, RAW264.7 y L929, mostrando la mayor actividad antiproliferativa en A549 utilizando el ExMeOH de las cáscaras del fruto con una  $IC_{50}$  de 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que la  $IC_{50}$  del ExMeOH de las partes aéreas fue de 43.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la misma línea celular (Vidal Gutiérrez, 2014). En la tarea de reproducir los datos de la referencia, se trabajó con el ExMeOH de las cáscaras del fruto y de las partes aéreas por separado, los resultados arrojaron una  $IC_{50}$  de 33.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y otra de 84.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tabla II), respectivamente en A549, aunque los valores de  $IC_{50}$  aumentaron de un estudio a otro, la tendencia de que el ExMeOH de las cáscaras de fruto posee mayor actividad antiproliferativa que

el obtenido de las partes aéreas se mantiene. Es por ello que en esta investigación se trabajó con las cáscaras del fruto de *J. macrocarpa*.

Una vez determinada la actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1 sobre A549 (Tabla IX) no se observó disminución de la actividad antiproliferativa en comparación con las sub-fracciones FxR2S6 y FxR2S7 (Tabla V) de donde proviene Primulasaponina 1 (tomando en cuenta que el peso molecular de Primulasaponina 1 es 1105.26 g/mol). No obstante, la diferencia en el valor de IC<sub>50</sub> del ExMeOH de las cáscaras del fruto (Tabla II) hacia la molécula purificada (15 µg/mL que representan 13.6 µM para Primulasaponina 1; Tabla IX) en A549 es de 18 µg/mL, de tal forma que la actividad antiproliferativa se vio aumentada en un 54.5% desde el extracto crudo hasta la purificación de la molécula.

**Tabla IX.** Actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1\*

Compuesto	Líneas celulares			
	A549	HeLa	LS180	ARPE-19
Primulasaponina	13.61 ± 1.47 <sup>b</sup>	23.54 ± 0.96 <sup>c</sup>	9.35 ± 0.78 <sup>a</sup>	22.25 ± 2.15 <sup>c</sup>
Doxorrubicina <sup>Ω</sup>	8.31 ± 0.18	5.64 ± 0.22	4.69 ± 0.29	7.77 ± 0.35

\*Los valores de IC<sub>50</sub> (µM ± desviación estándar) representan el promedio de tres experimentos independientes.

<sup>Ω</sup> Control positivo de compuesto con actividad antiproliferativa conocido.

<sup>a-c</sup> Análisis estadístico de Tukey (p < 0.05).

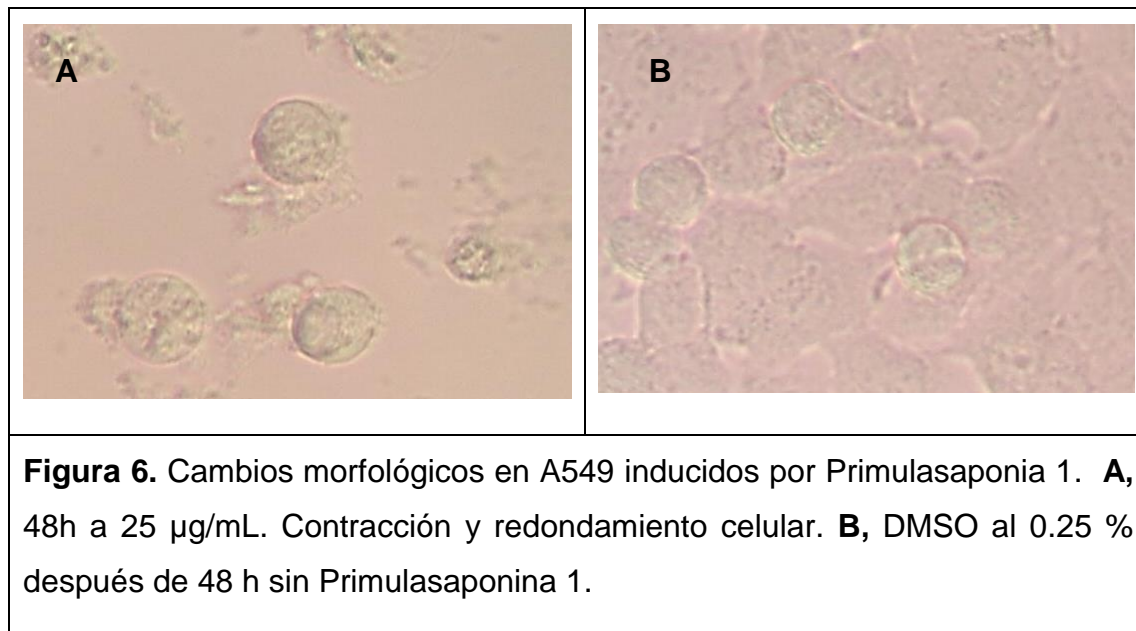
Además de A549 (cáncer de pulmón humano), se amplió el panel de líneas celulares a utilizar a tres líneas más, HeLa (carcinoma de cérvix humano), LS180 (carcinoma de colon humano) y ARPE-19 (retina humana) con el objetivo de representar tipos de cáncer comunes en humano en los experimentos *in-vitro* y

referenciar la actividad antiproliferativa en una LC no cancerosa humana como lo es ARPE-19. Si bien, la LC utilizada para el aislamiento del compuesto responsable de la actividad antiproliferativa fue A549, en LS180 se observó una  $IC_{50}$  más baja que A549 con  $9.3 \mu M$  y  $13.6 \mu M$  respectivamente, este valor posee diferencias estadísticamente significativas con el resto de las LC haciendo a LS180 la LC más susceptible a la presencia de Primulasaponina 1. No obstante, ambas líneas celulares presentan cambios morfológicos similares debido a la presencia del triterpeno glicosilado observándose una contracción y redondamiento celular (Figuras 6 y 7). De la misma manera, la actividad antiproliferativa que mostró Primulasaponina 1 frente a A549 presentó diferencias estadísticamente significativas en los valores de  $IC_{50}$  respecto a LS180 (A549 con valor de  $IC_{50}$  más alto), y con las LC HeLa y ARPE-19 (A549 con valor de  $IC_{50}$  más bajo) las cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla IX). El presente resultado sugiere una mayor investigación en los mecanismos de acción envueltos en la actividad antiproliferativa presente en LS180 y A549.

El compuesto 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil ácido oleánico (Figura 8) es un triterpeno glicosilado que difiere en ciertos aspectos de Primulasaponina 1, contiene igualmente cuatro motivos de carbohidratos, sin embargo, estos se encuentran distribuidos en diferente posición a Primulasaponina 1, además de que los motivos de carbohidratos son diferentes, otra desigualdad es un doble enlace entre el carbono 12 y 13, y un grupo carboxilo en el carbono 17 del triterpeno, no obstante es lo más semejante a Primulasaponina 1 que se le ha evaluado la actividad antiproliferativa. Este compuesto presenta actividad antiproliferativa en las líneas celulares A549 y HeLa con  $IC_{50}$  de  $9.9 \mu M$  y  $15.5 \mu M$ , respectivamente, esa misma tendencia presenta Primulasaponina 1 para las mismas líneas celulares con  $13.6 \mu M$  para A549 y  $23.5 \mu M$  para HeLa (tabla IX), observándose una mayor actividad en A549 que en HeLa en ambas saponinas,

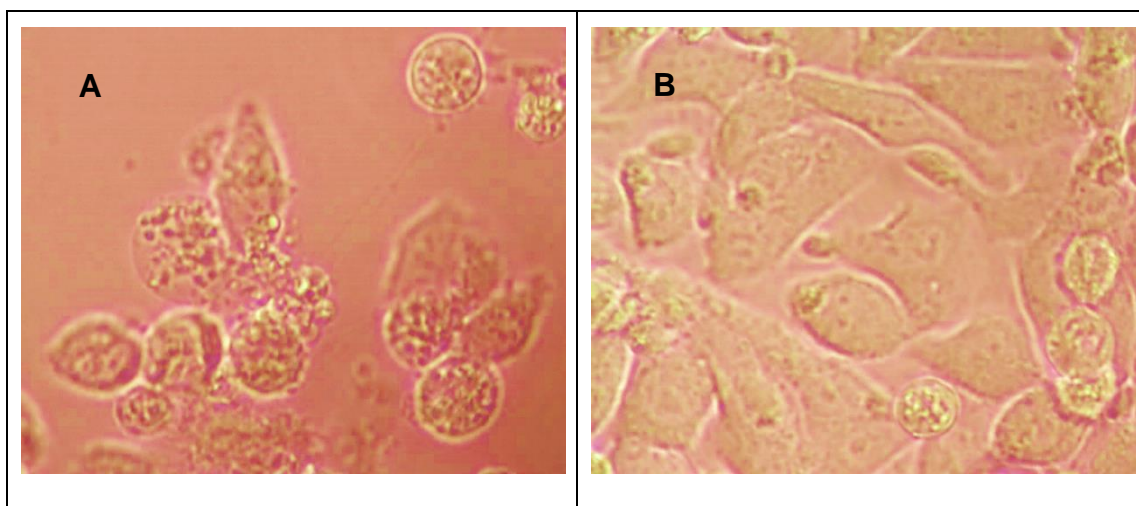


sugiriendo un comportamiento similar entre ambos compuestos en cuanto a la inducción de la actividad antiproliferativa (Wang, et al., 2014).

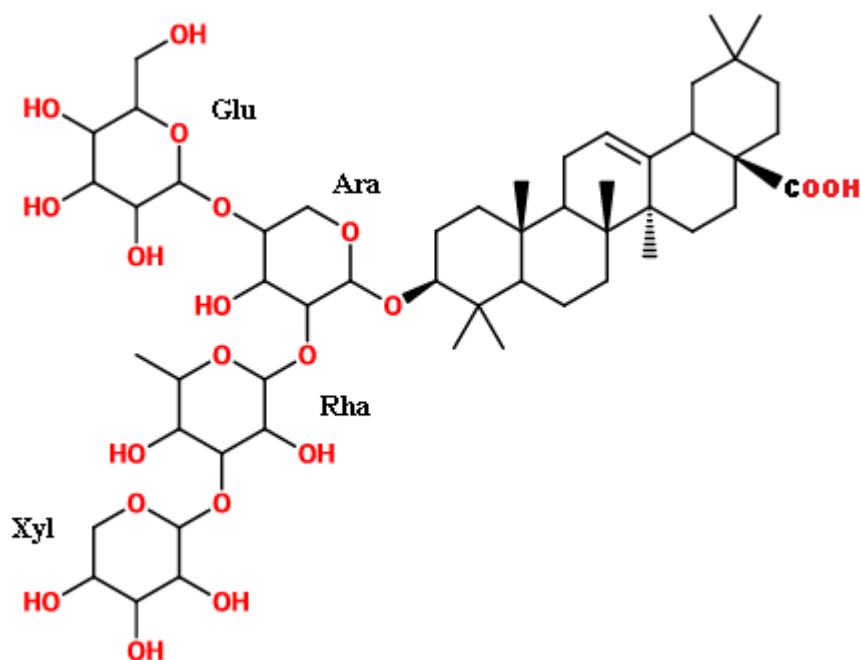


En general se han descrito un gran número de saponinas para diversas actividades biológicas, incluso para el cáncer. Un estudio realizado con una mezcla de saponinas conocidas demostró tener diversos efectos en pruebas con ratones y en la LC A549. A grupos de ratones se les inoculó un tumor con células de Lewis (carcinoma de pulmón murino), les fue administrado por un periodo de 14 días dosis de 2.5, 5 y 7.5 mg/kg de la mezcla de saponinas conocida y los resultados fueron los siguientes; a dosis dependencia, se observó un retraso en el crecimiento tumoral en comparación con el control positivo, así como en su consecuencia, disminución del radio, volumen y peso del tumor. Los análisis de citocinas indican un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-8 y IL-10 en los ratones tratados con 7.5 mg/kg, como consecuencia la posible estimulación a NF-kappa B en las células cancerosas. De igual manera se demostró la muerte celular por apoptosis por citometría de flujo en A549. A una dosis de 7.5 mg/mL la muerte

celular por apoptosis es comparable con la obtenida por el cisplatino a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Li, et al., 2013). La mezcla de saponinas utilizada para ese experimento posee triterpenos glicosilados en C-3 al igual que Primulasaponina 1, a la cual solo se le ha determinado la actividad antiproliferativa en las cuatro LC utilizadas en esta investigación.



**Figura 7.** Cambios morfológicos en LS180 inducidos por Primulasaponina 1. **A**, 48 h a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Contracción y redondamiento celular. **B**, DMSO a 0.25% después de 48 h sin Primulasaponina 1.



**Figura 8.** 3-O- $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil ácido oleánico. Ara: arabinosa, Glu: glucosa, Rha: ramnosa, Xyl: xilosa (Wang, et al., 2014).

Como se observa en la Tabla IX, la actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1 muestra valores diferentes de IC<sub>50</sub> para cada línea celular. Un punto importante es precisamente las diferencias entre los valores de IC<sub>50</sub> que se observan en las diferentes líneas celulares, si bien no existe selectividad de Primulasaponina 1 hacia las líneas celulares cancerosas por el hecho de que HeLa y ARPE-19 no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus valores de IC<sub>50</sub>, las IC<sub>50</sub> que muestra la saponina para LS180 y A549 hacen de Primulasaponina 1 una molécula candidata para posteriores investigaciones relacionadas al cáncer de colon y pulmón.

## CONCLUSIONES

El extracto metanólico de la cáscara del fruto de *Jacquinia macrocarpa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl posee el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en la línea celular A549.

Se aisló e identificó a Primulasaponina 1 como el compuesto responsable de la actividad antiproliferativa en línea celular A549

La mayor actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1 se encuentra en la línea celular LS180 y en A549 con IC<sub>50</sub> de 9.35 µM y 13.61 µM respectivamente.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda determinar el mecanismo de muerte celular que induce Primulasaponina 1 sobre las líneas celulares LS180 y A549. También se sugiere evaluar la actividad antiproliferativa de Primulasaponina 1 en otras líneas celulares.

## REFERENCIAS

- ACS, 2013. Principios de la Quimioterapia. *American Cancer Society*, p. 30.
- Amos, L.A., Löwe, J. 1999. How Taxol Stabilises Microtubule Structure. *Chem And Biol.* 6(3):65-69.
- Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 3(2):119-145.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S.R., Moo-Puc, R. 2011a. Screening of plants used in mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journ of Ethnophar.* 135:719-724.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Cedilla-Rivera, R., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S.R. 2011b. Boneidol, a new alkyl catechol from *Bonellia macrocarpa*. *Phytochem let.* 4 :345-347.
- Chindo, B. A., Adzu, B., Gamaniel, K. S. 2012. Saponins: Structural Diversity, Properties and Applications Ch. 1. in *Saponins: Properties, Applications and Health Benefits*. Nova Science Publishers. p. 1-50.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Jour of ethnophar.* 100: 72-79.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxic Pato.* 35(4):495-516.
- García-Sosa, K., Sánchez-Medina, A., Álvares, S.L., Zacchino, S., Veitch, N.C., Simá-Polanco, P., Peña-Rodríguez, L.M. 2011. Antifungal activity of sakurasaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Nat Prod rese*, 25(12):1185-1189.

- Han, L.-T, Li J., Huang F., Yu S.-G., Fang N.-B. 2009. Triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* induce apoptosis activity in HeLa cells. *Jour of Asian Nat Prod Res.* 11(2):122-127.
- INEGI. 2014. Estadísticas a Propósito de Día Mundial Contra el Cáncer (4 de Febrero). *Inst Nac de Est y Geo* , p. 1-11.
- Jiménez-Estrada M., Velázquez-Contreras C., Garibay-Escobar A., Sierras-Canchola D., Lapizco-Vázquez R., Ortiz-Sandoval C., Burgos-Hernández A., Robles-Zepeda R.E. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Comp and Alte Med.* 13(12):1-8.
- Komen, S. G. 2009. Datos para la vida, la quimioterapia – cómo enfrentar los efectos secundarios. *Susan G. Komen for the Cure.*
- Li, Y., Gu J.-F., Zou X., Wu J., Zhang M.-H., Jiang Jun., Qin D., Zhou J.-Y., Liu B.-X.-Z., Zhu Y.-T., Jia X.-B., Feng L., Wang R.-P. 2013. The Anti-Lung Cancer Activities of Steroidal Saponins of *P. pollyphylla* Smith var. *Chinensis* (Franch.) Hara Through Enhanced Immunostimulation in Experimental Lewis Tumor-Bearing C57BL/6 Mice and Induction of Apoptosis in the A549 Cell Line. *Molecules.* 18:12916-12936.
- López Estudillo, R., Hinojosa García, A. 1988. *Catalogo de Plantas Medicinales Sonorenses* :Universidad de Sonora.
- Mamedov, N. 2012. Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. *Med Aromat Plants*, 1(8):1-2.
- Moo-Puc, R., Chale-Dzul, J. & Caamal-Fuentes, E. 2013. *Bonellia albiflora*: a mayan medicinal plant that induces apoptosis in cancer cells. *Evid-Bas Comp and Alt Med.* p. 8.

- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Jour of Immuno Meth*, 65:55-63.
- NIH. 2012. Cell Biology and Cancer. Colorado Springs: National Institutes of Health.
- OMS, 2014. Cáncer. *Organización Mundial de la Salud*, 11 Febrero, p. 1-6.
- Paredes, A., Blanco, J. L., Echenique-Elizondo, M. 2006. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cir Esp*, 4(79):202-14.
- Rascón-Valenzuela, L. Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Coqueiro, A., Robles-Zepeda, R.E. 2015. Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Ind Crops and Prod*. 2015(69):48-54.
- Roche. 2008. *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*. Fourth ed. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- Siems, K., Jaensch, M., Jakupovic, J. 1998. Structures of the Two Saponins Isolated from Commercially Available Root Extract of *Primula* sp.. *Planta Med*. 64:272-274.
- Torres-Moreno, H. Velázquez, C.A., Garibay-Escobar, A., Curini, M., Marcotullio, M.C., Robles-Zepeda, R.E. 2015. Antiproliferative and apoptosis induction of curcubitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Ind Crops and Prod*. 77:895-900.
- Vidal Gutiérrez, M. 2014. *Actividad antioxidante y antiproliferativa de seis plantas medicinales sonorenses*. Hermosillo: Universidad de Sonora.
- Villa-Ruano, N. Pacheco-Hernández, Y., Lara-Zaragoza, E.B., Franco-Monsreal, J., Cardeña-Bozziere, M., Galván-Valencia O.T., Ruiz-Gómez, L.M. 2011.



Biotecnología de Plantas Medicinales: Generando Fármacos de un Futuro Tornado Presente. *Tem de Cie y Tec*, 15(43):13-20.

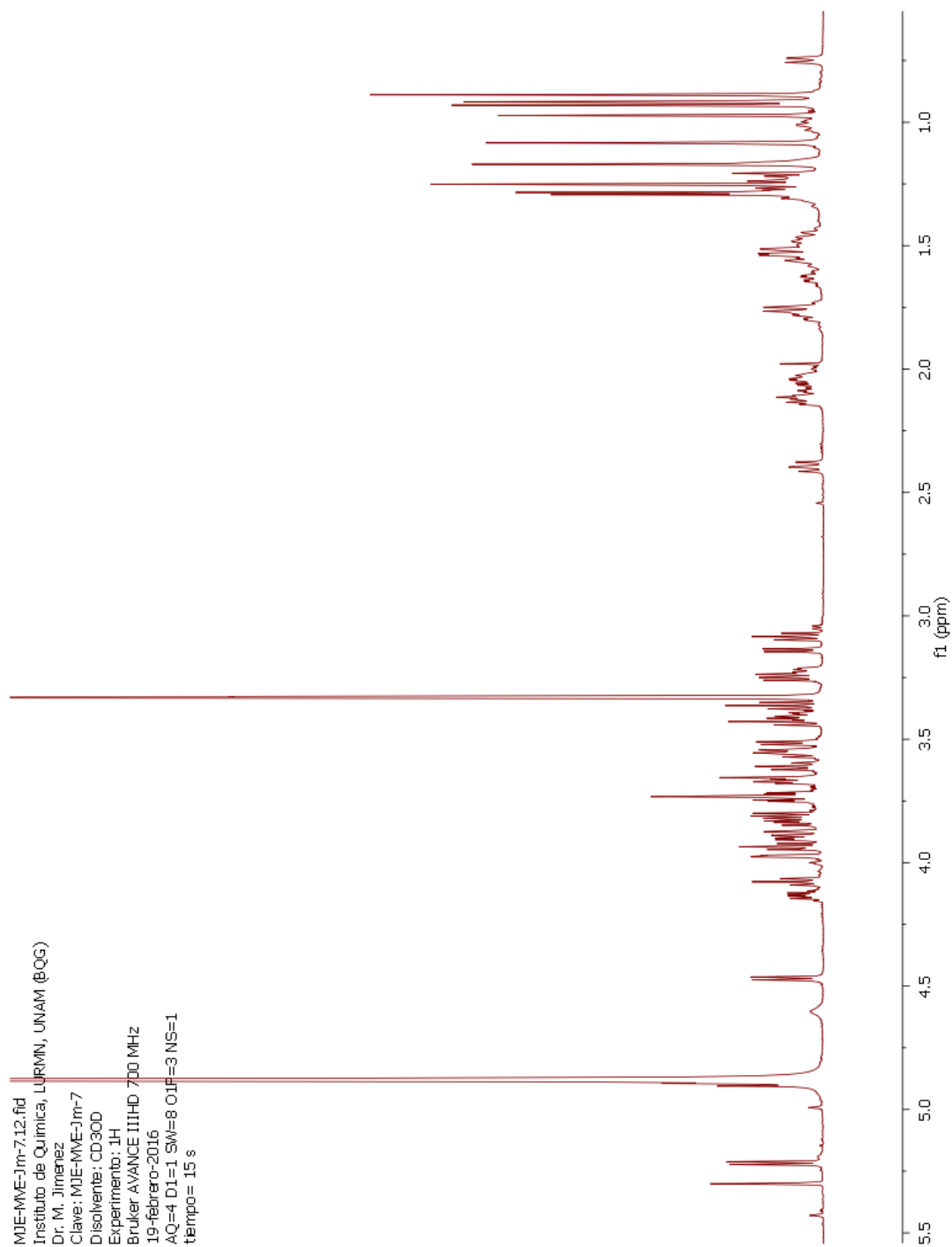
Wang, X., Wang, M., Xu, M., Wang, Y., Tang, H., Sun, X. 2014. Citotoxic Oleanane-Type Triterpenoid Saponins from the Rhizomes of *Anemone rivularis* var. *flore-minone*. *Molecules*. 19:2121-2134.

Yetman, D., Van Devender, T. R. 2002. *Mayo Ethnobotany: Land, history and traditionl knowledge in northwest Mexico*. University of California Press.

Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Correa-Royero, J., Betancur-Galvis, L. 2009. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Salud UIS*, 41:215-222.

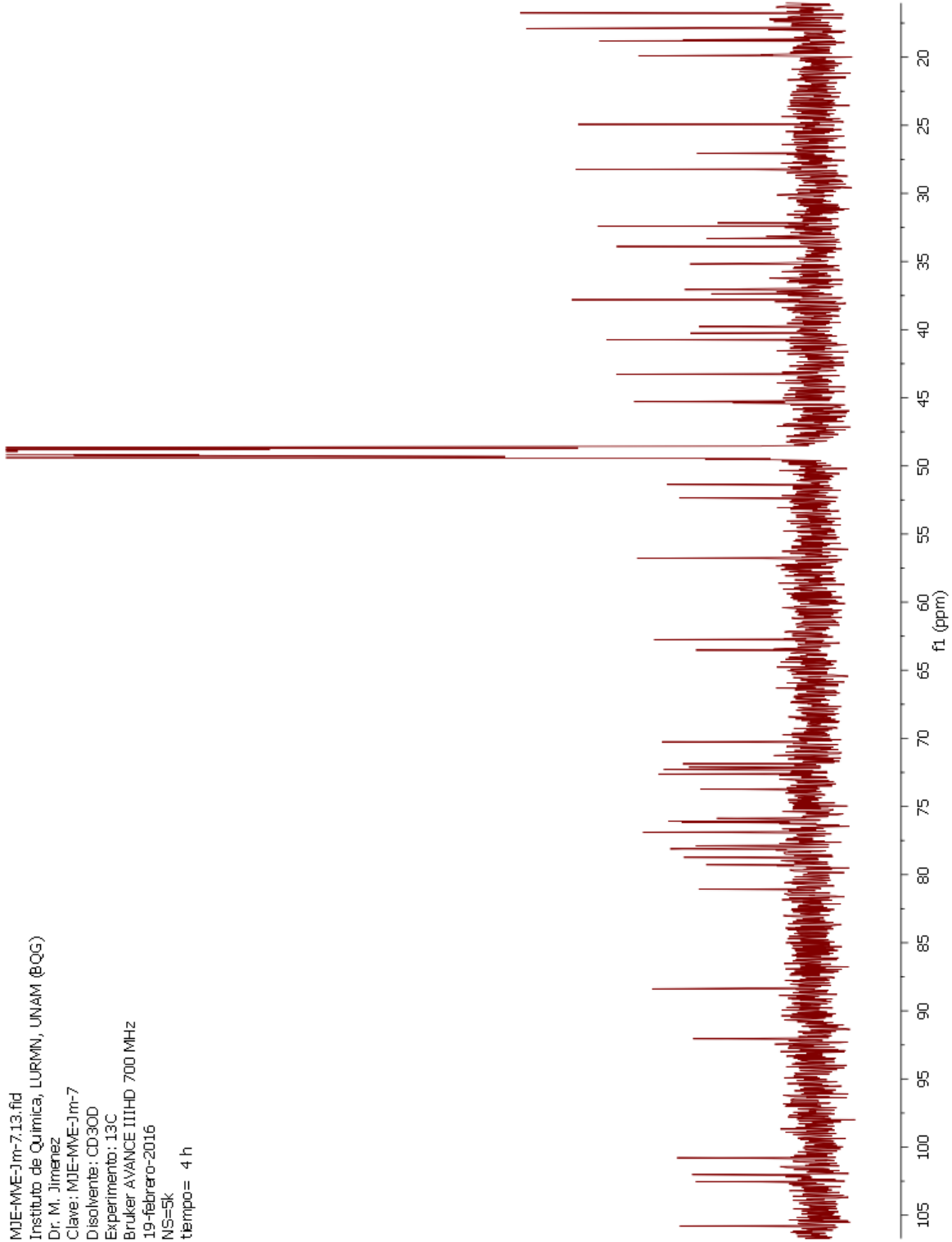
## ANEXOS

### Anexo 1. Espectro de $^1\text{H}$ a 700 MHz.

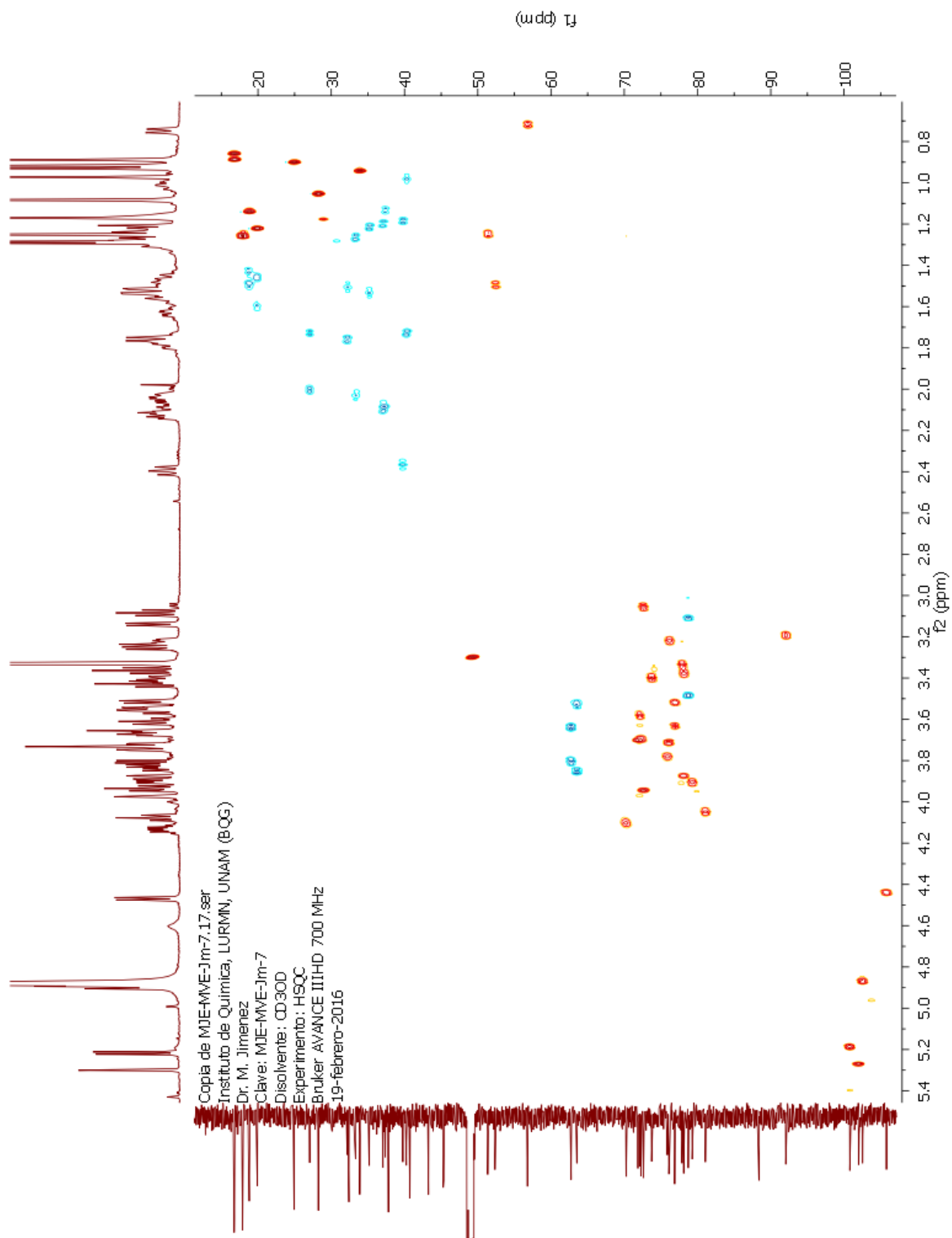


## Anexo 2. Espectro de $^{13}\text{C}$ a 700 MHz.

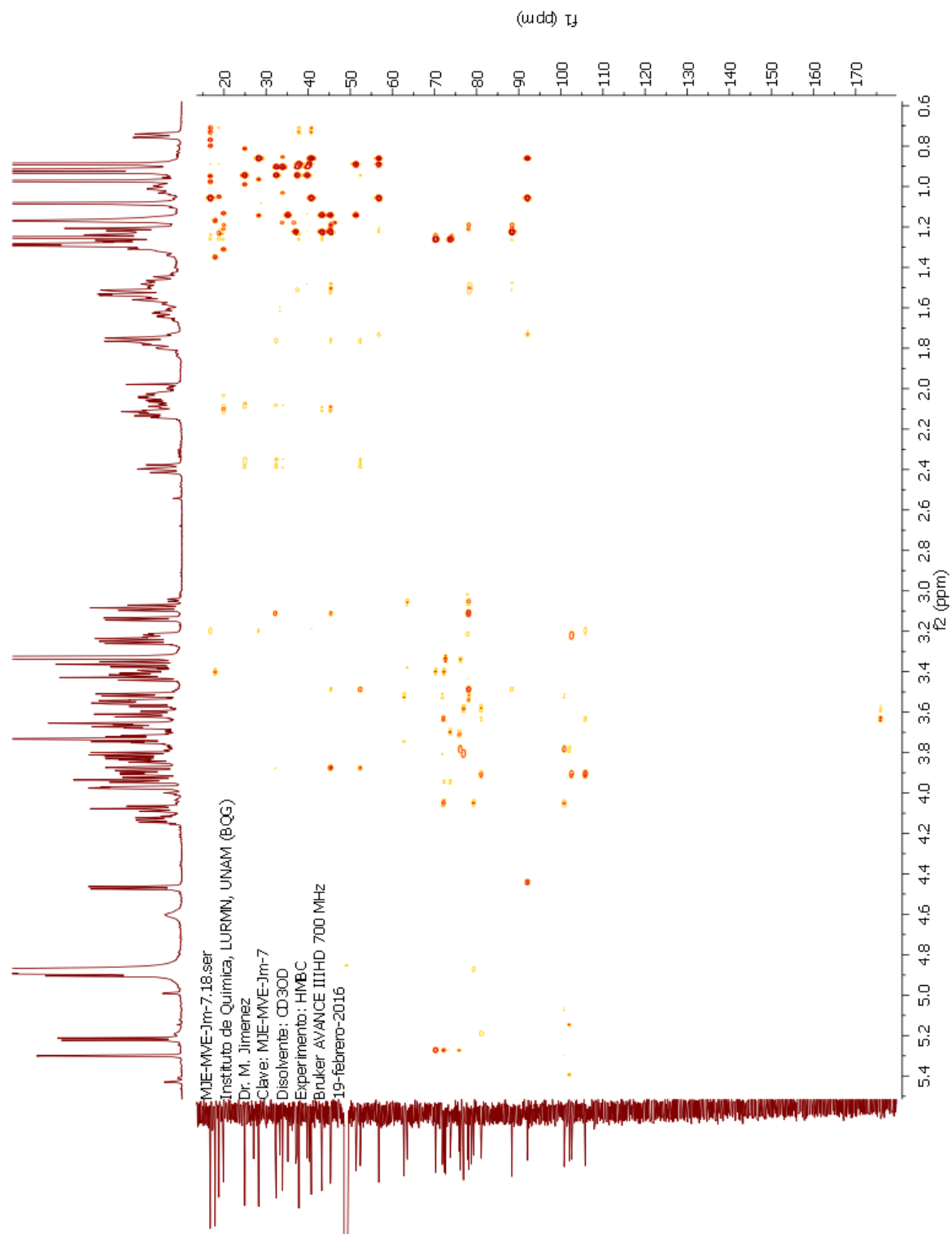
MJE-MME-Jm-7.13.fid  
Instituto de Química, LURMN, UNAM (BQG)  
Dr. M. Jimenez  
Clave: MJE-MME-Jm-7  
Disolvente: CD<sub>3</sub>OD  
Experimento: 13C  
Bruker AVANCE IIIHD 700 MHz  
19-febrero-2016  
NS=5k  
tiempo= 4 h



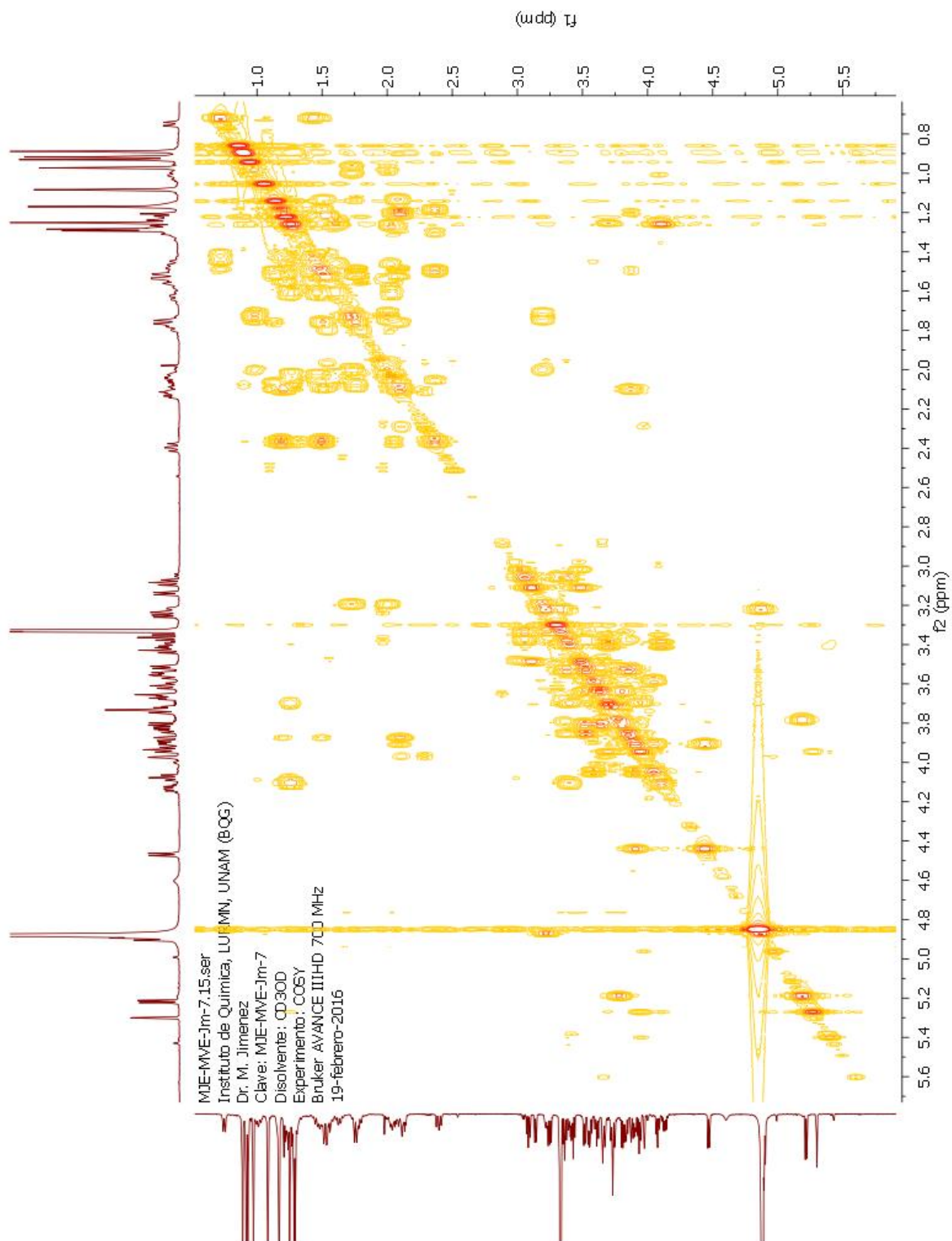
### Anexo 3. Espectro del experimento HSQC a 700 MHz.



#### Anexo 4. Espectro del experimento HMBC a 700 MHz.



## Anexo 5. Espectro del experimento COSY a 700 MHz.



**Anexo 6.** Desplazamientos del experimento de  $^1\text{H}$ -RMN para Primulasaponina 1 (triterpeno) de Siems y colaboradores de 1998<sup>a</sup>.

Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)	Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)
1	1.75	m	16	3.88	br s
1'	0.98	m	18	1.50	m
2	1.87	m	19	2.37	dd (11.5, 14)
2'	1.74	m	19'	1.18	m
3	3.17	dd (4.5, 11.5)	21	2.06	m
5	0.73	br dd (2.5, 11)	21'	1.14	m
6	1.55-1.40	m	22	1.77	m
6'	1.55-1.40	m	22'	1.51	m
7	1.55	m	23	1.05	s
7'	1.23	m	24	0.85	s
9	1.25	m	25	0.89	s
11	1.61	qd (13, 13, 13, 5)	26	1.14	s
11'	1.46	m	27	1.22	s
12	2.03	br ddd (5, 13, 13)	28	3.49	d (7.5)
12'	1.26	m	28'	3.11	d (7.5)
15	2.11	m	29	0.94	s
15'	1.21	m	30	0.90	s

<sup>a</sup> El espectro fue procesado con metanol- $d_4$  a 400 MHz.

**Anexo 7.** Desplazamientos del experimento de  $^1\text{H}$ -RMN para Primulasaponina 1 (azúcares) de Siems y colaboradores de 1998<sup>a</sup>.

Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)	Protón	ppm	<i>J</i> (Hz)
GlcA-1	4.50	d (8)	Rha-2	3.94	dd (1.5, 3.5)
GlcA-2	3.49	dd (8, 9)	Rha-3	3.70	dd (3.5, 9.5)
GlcA-3	4.02	dd (9,9)	Rha-4	3.41	dd (9.5, 9.5)
GlcA-4	3.62	dd (9, 10)	Rha-5	4.09	dq (9.5, 6.5)
GlcA-5	3.82	d (10)	Rha-6	1.27	d (6.5)
Gal-1	5.16	d (7.5)	Glu-1	4.85	d (7.5)
Gal-2	3.82-3.75	m	Glu-2	3.21	dd (7.5, 9.5)
Gal-3	3.73-3.70	m	Glu-3	3.33	dd (9.5, 9.5)
Gal-4	3.73-3.70	m	Glu4	3.05	dd (9.5, 9.5)
Gal-5	3.52	m	Glu-5	3.38	m
Gal-6 <sub>1</sub>	3.82-3.75	m	Glu-6 <sub>1</sub>	3.86	dd (2.5, 12.5)
Gal-6 <sub>2</sub>	3.63	dd (12, 3.5)	Glu-6 <sub>2</sub>	3.53	dd ( 8, 12.5)
Rha-1	5.27	d (1.5)			

<sup>a</sup> El espectro fue procesado con metanol-d<sub>4</sub> a 400 MHz.



**Anexo 8.** Desplazamientos del experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN para Primulasaponina 1 de Siems y colaboradores de 1998<sup>a</sup>.

$^{13}\text{C}$	ppm	$^{13}\text{C}$	ppm	$^{13}\text{C}$	ppm	$^{13}\text{C}$	ppm
1	39.83	16	78.10	GlcA-1	105.82	Rha-4	73.77
2	27.16	17	45.38	GlcA-2	78.98	Rha-5	70.22
3	92.31	18	52.36	GlcA-3	81.09	Rha-6	17.85
4	40.68	19	40.21	GlcA-4	72.33	Glu-1	102.61
5	56.79	20	32.39	GlcA-5	76.11	Glu-2	76.98
6	18.73	21	37.09	GlcA-6	-	Glu-3	77.94
7	35.19	22	32.15	Gal-1	100.94	Glu-4	71.61
8	43.28	23	28.31	Gal-2	75.95	Glu-5	78.15
9	51.37	24	16.74	Gal-3	75.95	Glu-6	63.56
10	37.83	25	16.74	Gal-4	71.61		
11	19.85	26	18.80	Gal-5	76.53		
12	33.33	27	19.95	Gal-6	62.79		
13	88.37	28	78.73	Rha-1	102.10		
14	45.31	29	33.90	Rha-2	72.56		
15	37.37	30	24.95	Rha-3	72.56		

<sup>a</sup> El espectro fue procesado con metanol- $\text{d}_4$  a 100.6 MHz.

- Señal perdida.

## Anexo 9. Artículo de Investigación

### **Primulasaponin 1, a Glycosylated-triterpene with Antiproliferative Activity Isolated from *Jacquinia macrocrapa* Cav. ssp. *pungens* (A. Gray) B. Ståhl**

Vidal Gutiérrez Max <sup>a</sup>

Velázquez Contreras Carlos Arturo <sup>a</sup>

Garibay Escobar Adriana <sup>a</sup>

Jiménez Estrada Manuel <sup>b</sup>

Robles Zepeda Ramón Enrique <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, División de Ciencias biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora México

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

\* Correspondence author: *Blvd. Luis Donaldo Colosio y Rosales, Hermosillo Sonora 83000, México.* E-mail address: [rrobles@guayacan.uson.mx](mailto:rrobles@guayacan.uson.mx)

## Abstract

*Jacquinia macrocarpa* Cav. *ssp. pungens* (A. Gray) B. Ståhl is a plant used like medical remedy for several illness in the northwest of Mexico, in spite of, little is known of their bioactive metabolites. A glycosylated-triterpene primulasaponin 1 was isolated and identified by chromatographic and spectroscopic techniques from the fruit shells of *Jacquinia macrocarpa* Cav. *ssp. pungens* (A. Gray) B. Ståhl. By the MTT assay its antiproliferative activity was evaluated in the A549, HeLa and LS180 cancerous cell lines, and the ARPE-19 non-cancerous cell line with IC<sub>50</sub> of 13.6, 23.5, 9.3 and 22.5 µM respectively. The higher antiproliferative activity was in the LS180 and A549 cell lines with statistical significance difference between them, and among HeLa and ARPE-19, these last ones without statistical significance difference among them. This is the first antiproliferative activity report in the literature of primulasaponin 1.

Keywords:

Antiproliferative activity

*J. macrocarpa*

IC<sub>50</sub>

## 1. Introduction

Cancer is a health problem with a high index of mortality in the world, this disease is characteristic for the uncontrolled proliferation of malignant cells in the organism. The therapy's against cancer have big problems, because a lot of there are unspecific and bring with them a variety of side effects. However, some cancer cells have developed mechanisms of defense for the effects of the chemotherapeutics agents. One of the research area of high impact for the investigation of new compounds against cancer is the natural products. A part of the metabolism of the plants produce a serial compounds knowledge like a secondary metabolites, which are described by their broad biological activity (ACS, 2013; Ávalos García & Pérez-Urria Carril, 2009; Mamedov, 2012; NIH, 2012; Paredes, et al., 2006; Torres-Moreno, et al., 2015; WHO, 2014). *Jacquinia macrocarpa* Cav. *ssp. pungens* (A. Gray) B. Ståhl (*J. macrocarpa*) is used like medical remedy in Mexico for cough, insolation, toothache, mouth sores and more illness. However, some biologically active compounds have been isolated from species of *Jacquinia* generous, like sakurasosaponin from *Jacquinia flammea* and bonediol from *Bonellia macrocarpa*, with antifungal and antiproliferative activity respectively, both isolated from the roots (Caamal-Fuentes, et al., 2011a; Caamal-Fuentes, et al., 2011b; García-Sosa, et al., 2011; López Estudillo and Hinojosa García, 1988; Yetman and Van Devender, 2002). Recent investigation suggest that the methanolic extract of fruit shell from *J. macrocarpa* has cytotoxicity activity against A549, HeLa, RAW264.7 and M12.C3F6 cancerous cell lines (CLC), when the CLC A549 showed the lowest proliferation of the four CLC tested with an IC<sub>50</sub> 9.2 µg/mL (Vidal Gutiérrez, 2014;

Zapata, et al., 2009). This work presents the isolation and characterization of the compound with antiproliferative activity from *J. macrocarpa* over the CLC A549 and the antiproliferative activity of the isolated compound in the A549, HeLa, LS180 CLC and the ARPE-19 non-cancerous cell line (CL).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant selection**

The fruit shell and aerial parts from *J. macrocarpa* were chosen based on its traditional use and background of the biological activity from the genus to which belongs. The plant was collected in the region of San Carlos Nuevo Guaymas in the state of Sonora, Mexico (Beach “Los Algodones”, 27° 57'43.15 N, 111° 6'3.57 W) during September 2014. The plant was taxonomically identified with a voucher number USON-22681 by Ing. Jesús Sánchez Escalante from the Herbarium of the Universidad de Sonora (Vidal Gutiérrez, 2014; Yetman and Van Devender, 2002).

### **2.2. Equipment**

HPLC-MS were acquired on Agilent Technologies (Agilent 1200 series binary SL) equipped with a Synergi 4u Polar-RP 80A 150 x 2.0 mm column and a mass spectrometer Bruker Squire 6000, the eluent begins with MeOH:H<sub>2</sub>O 40:60 and after twenty minutes ending in 100:0 of the same mixture with a flux of 0.2 mL/min. ESI ion positive (Na<sup>+</sup>), scan 50-2500 m/z, target of 1000 m/z, dry temperature of 300 °C, drying gas flux of 7 L/min and 30 psi of nebulization were the condition of mass spectrometer. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC and COSY NMR were recorded in CD<sub>3</sub>OD at 700 MHz on a Bruker ascend

console advance III. Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm. Coupling constants are given in Hz. Column chromatography was performed using Sigma-Aldrich (200-400 mesh). Fractions were monitored by TLC (Silica gel Sigma-Aldrich) and spots on TLC were visualized under UV light and after, staining with a solution of 1 g of vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) in ethanol, water and *ortho*-phosphoric acid (25:25:35) followed by heating at 120-160 °C for 5-15 minutes.

### 2.3. Extraction and isolation

Fruit shell from *J. macrocarpa* was air-dried to finally ground with a Wiley mill (200 mesh) and extracted with four different solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol (1:10 wt/vol) at room temperature to obtain the extracts HxEx, DICIMeEx, EtOAcEx and MeOHEx respectively. The solutions were maintained 10 days in the solvent with twice daily manual shaking. The extracts were filtered, dried under reduced pressure at 45 °C and weighed. (Jiménez-Estrada, et al., 2013). Twenty grams of the MeOHEx was pre-suspended in methanol-water (3:2) and fractionated in a funnel with hexane and ethyl acetate to obtain three fraction: Hexane fraction (FxHx), ethyl acetate fraction (EtOAcFx), residual fraction one (FxR1) and residual fraction two (FxR2). Briefly, two grams of the FxR2 was separated by column chromatography on silica (CC) and eluted with EtOAc- MeOH (v/v, 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 and 0:100). Six hundred fractions were obtained and analyzed by thin layer chromatography (TLC), those with similar motility were pooled and concentrated to get 11 sub-fraction (FxR2S1 to FxR2S11). The FxR2S8 was analyzed by the spectroscopy techniques NRM and HPLC-MS.

#### 2.4. Cell lines and cell culture

The CLC A549 (lung cancer) was chosen based upon their low proliferation against the methanolic extract from *J. macrocarpa*. HeLa (human cervix carcinoma), LS180 (human colon carcinoma) and ARPE-19 (human retina) cell lines were used for the isolated compound. The cell cultures were carried out in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% of inactivated fetal calf serum and grown at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> (Rascón-Valenzuela, et al., 2015).

#### 2.5. Cell proliferation assay

Before evaluating the effect of extract and fractions on the proliferation in the cell line, the samples were pre-suspended in DMSO and then diluted in DMEM. Cell proliferation was determinate using the standard MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol2-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Briefly, a cell suspension with a concentration of 200,000 cel/mL were plated 50 µL into each well of a flat 96 well plate, after 12 h incubation in culture condition to allow cell attachment, the cell culture was incubated with 50 µL of DMEM containing different concentrations of the samples. The cell cultures were incubated for 48 h, in the last 4 h of the cell culture, 10 µL of the MTT stock solution (5 mg/mL) were added to each well. Formazan crystals were dissolved with acidic isopropanol and after 15 min of isopropanol addition the plates were read in an ELISA plate reader, using a wavelength of 570 nm and a wavelength of 630 nm as reference. The antiproliferative activity of the samples were reported in IC<sub>50</sub> that represents the concentration of the sample necessary to inhibit the 50% of cell proliferation. The control

cell culture was incubated with DMSO at a final concentration of 0.06%-0.5%. Control cell did not show any evidence of cell damage (Jiménez-Estrada, et al., 2013; Rascón-Valenzuela, et al., 2015; Torres-Moreno, et al., 2015).

### 3. Results and discussions

The use of products derived from natural sources are millenary, and their use is not restricted only for humans, different primates consume some plants when they are afflicted (Halberstein, 2005). In the northwest of Mexico cultures like Mayo, located in the north and south of Sinaloa and Sonora estate respectively, have a complete ethnopharmacopeia, where the use of some plants are indicated for treating cancer. However, many of them doesn't have their active compounds determined. In this case, *J. macrocarpa* is use in Mayo culture, and the identification of its active compounds from fruit shell has not been found. Nevertheless, plants of *Jacquinia* genus have antiproliferative and apoptotic effect in CLC, and the isolation of one compound with antiproliferative activity in HeLa CLC has been characterized: Bonediol, a molecule isolated from the root methanolic extract of *Bonellia macrocarpa* (Caamal-Fuentes, et al., 2011a; Caamal-Fuentes, et al., 2011b; García-Sosa, et al., 2011; Moo-Puc, et al., 2013; Yetman and Van Devender, 2002).

Primulasaponin 1 (3-0-([ $\alpha$ -L- rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2))- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl)-protoprimulagenin A) was isolated and characterized from *Primula sp.* and doesn't have previous antiproliferative reports. However, the isolation and characterization of primulasaponin 1



from *J. macrocarpa* was possible across the fractionating and sub-fractionating of the MeOHEx, HPLC-MS and NMR-spectroscopy ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , HSQC, HMBC and COSY at 700 MHz) tests of the samples, coupling with the measure of antiproliferative activity of each fraction in A549 CLC. With data of NRM-spectroscopy (table 1) and 1104.9 m/z result of HPLC-MS, primulasaponin 1 structure (figure1) was elucidated. This result was confirmed with data of the saponin isolated from *Primula sp.* (Siems, et al., 1998).

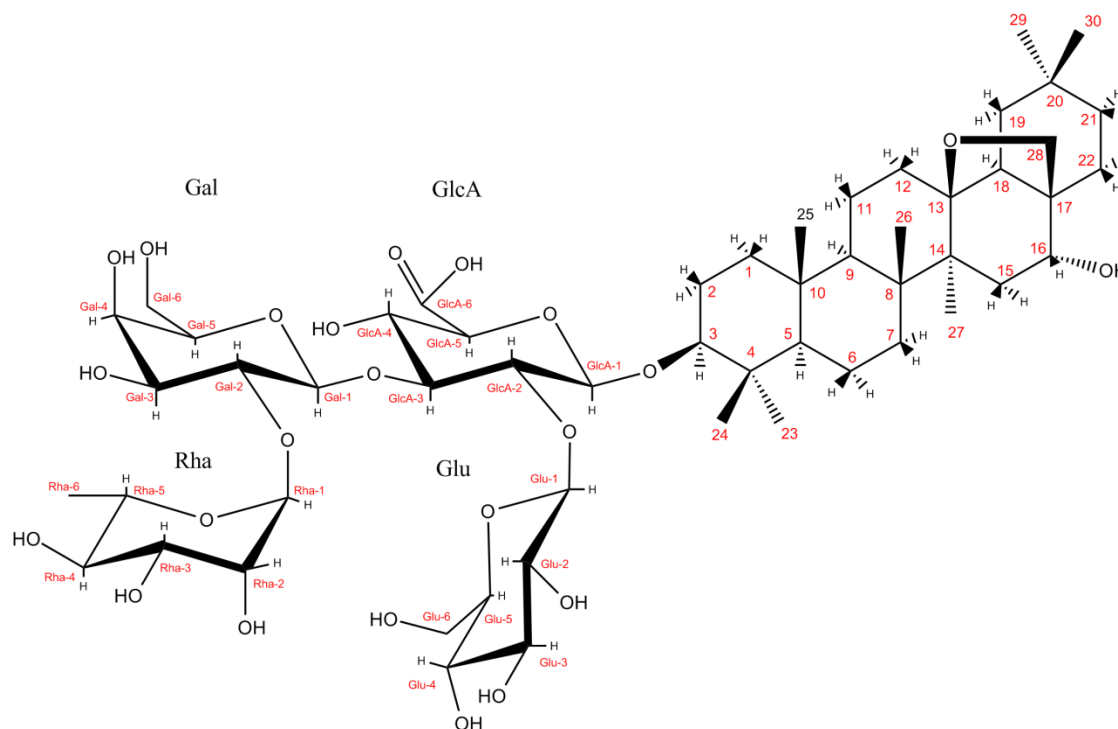
In these processes, the first  $\text{IC}_{50}$  was 33.1  $\mu\text{g/mL}$  for MeOHEx, and finished with  $\text{IC}_{50}$  of 15  $\mu\text{g/mL}$  (13.6  $\mu\text{M}$ ) for isolated primulasaponin 1 in A549. There is an increase of 54.5% in antiproliferative activity from the isolated compound in comparison to MeOHEx antiproliferative activity. Although, the CLC used for the isolation of the active compound was the A549, the LS180 shown a lower value of  $\text{IC}_{50}$  than A549 with 9.35  $\mu\text{M}$  and 13.6  $\mu\text{M}$  respectively, these values had significant statistical differences between them and among the rest of the cell lines, making LS180 the weaker cell line for primulasaponin 1 (table 2).

**Table 1.** Spectroscopy data of saponin from *Jacquinia macrocarpa subsp. pungens*<sup>a</sup>

C n <sup>o</sup>	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (m,J in Hz)	C n <sup>o</sup>	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (m,J in Hz)
1	40.28	1.72(m) 0.98(m)	28	78.68	3.48(d,7.5) 3.11(d,7.5)
2	27.02	2.01(m) 1.74(m)	29	33.93	0.94(s)
3	92.04	3.19(d, 4.65)	30	24.98	0.9(s)
4	40.73		GlcA-1	105.44	4.44(d,7.9)
5	56.85	0.726 (dd, 2.3,11.9)	GlcA-2	79.27	3.9(dd,7.9,9)
6	18.73	1.49(m) 1.44(m)	GlcA-3	81.08	4.05(t,9.9)
7	35.18	1.53(m) 1.22(m)	GlcA-4	72.1	3.58(d,9.3)
8	43.27		GlcA-5	76.87	3.63(d,9.3)
9	51.4	1.26(m)	GlcA-6	175.93	
10	37.8		Gal-1	100.79	5.18(d,7.7)
11	19.81	1.46(m)1.6(qd,12.9,12.8,12.8,4.6)	Gal-2	75.88	3.78(m)
12	33.35	2.03(m) 1.28(dd,3.8,6.3)	Gal-3	76.1	3.72(m)
13	88.39		Gal-4	72.98	3.7(m)
14	45.28		Gal-5	76.87	3.52(m)
15	37.37	2.09(m) 1.23(m)	Gal-6	62.74	3.8(d,2.2) 3.65(dd,7.3,4.7)
16	78.09	3.9(m)	Rha-1	101.99	5.27(d,1.6)
17	45.37		Rha-2	72.63	3.94(dd,1.6,3.4)
18	52.43	1.5(m)	Rha-3	72.25	3.7(m)
19	39.78	1.18(d,5.4) 2.37(dd,11.9,14.47)	Rha-4	73.72	3.4(d,9.5)
20	32.4		Rha-5	70.2	4.1(dq,5.9,6.6,9.6)
21	37.04	2.08(m) 1.88(m)	Rha-6	17.93	1.25(d,2.1)
22	32.14	1.77(m) 1.5(m)	Glu-1	102.5	4.86(d,8.34)
23	28.25	1.05(s)	Glu-2	76.15	3.22(dd,7.6,9.5)
24	16.78	0.86(s)	Glu-3	77.88	3.33(t,9.2,9.2)
25	16.81	0.89(s)	Glu-4	72.63	3.05(dd,8.9,9.8)
26	18.83	1.14(s)	Glu-5	78.13	3.38(m)
27	19.93	1.22(s)	Glu-6	63.51	3.61(dd,2.7,4.1)3.53(dd,3.7,7.7)

<sup>a</sup> The chemical shifts are expressed in  $\delta$  values (ppm), TMS was used as internal reference. Assignments were derived from HSQC, HMBC and COSY.

<sup>b</sup> Spectra recorded in CD<sub>3</sub>OD.



**Fig. 1** Estructure of primulasaponin 1.

It is known that certain saponins have antiproliferative activity for different CLC (Koh & Tay, 2012). However, a saponin 3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl] oleanic acid that is glycosylated-triterpene, has some differences in the structure as primulasaponin 1. Nevertheless, this molecule is the most similar compound to primulasaponin 1 that was tested for antiproliferative activity. For this molecule IC<sub>50</sub> values varied from 9.9  $\mu$ M for A549 to 15.5  $\mu$ M for HeLa, thus these results have the

same tendency of antiproliferative activity that primulasaponin 1 in both CLC with less activity in HeLa than in A549 (Wang, et al., 2014).

**Table 2.**

Antiproliferative activity

Cell lines IC <sub>50</sub> (μM)				
Compounds	A549	HeLa	LS180	ARPE-19
Primulasaponin 1	13.61 ± 1.47 <sup>b</sup>	23.54 ± 0.96 <sup>c</sup>	9.35 ± 0.78 <sup>a</sup>	22.25 ± 2.15 <sup>c</sup>
Doxorubicin*	8.31 ± 0.18	5.64 ± 0.22	4.69 ± 0.29	7.77 ± 0.35

IC<sub>50</sub> values represent a mean and standard deviation (±SD; n=3) of three independent experiments

\*Doxorubicin was used as a positive control

<sup>a-c</sup> Statistic analyses; Tukey (ANOVA one-way) with p>0.05

The saponins family is described for a variety of biological activity's in which they are involved. Saponins most known characteristic is the capacity to hemolyse; their amphipathic natural chemistry makes them a special permeator agent for erythrocytes membranes and for other types of cells too. This mechanism consist in the interaction of the saponin with the cholesterol of the membrane affecting directly the osmosis of the cell and producing the lysis. Though, some saponins are more specific in they biologically activity and induce the apoptosis cell death by different pathway, the most common observed is the inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase–protein kinase. For example, being more specific, the ginseng saponin derivate 20-O- (β-D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol induce the apoptosis by the cytochrome c-caspase 9-caspase 3 pathway in human cancer and other cell lines (Han, et al., 2009; Koh and Tay, 2012; Li, et al.,

2013). We know some saponin's behaviours, and even more specifically that primulasaponin 1 has an antiproliferative activity in CLC. However more studies are need of this saponin to be conducted in order to discover which type of death cell this molecule induces in these cell lines and the signaling pathways involved in this cell death.

#### **4. Conclusion**

Primulasaponin 1 is the molecule responsable for antiproliferative activity in CLC of *Jacquinia macrocarpa subsp. pungens*. The strongest antiproliferative activity of primulasaponin 1 is in LS180 and A549, it is recommended to determine the type of cell death of these cell lines, and to test this glycosylated-triterpene in others cell lines. This is the first report in the literature of primulasaponin 1 for this biological activity.

## References

- ACS, 2013. Principios de la quimioterapia. *American Cancer Society*, p. 30.
- Ávalos García, A. & Pérez-Urria Carril, E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Simá-Polanco, P., Peraza-Sánchez, S.R., Moo-Puc, R., 2011a. Screening of plants used in mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. *Journal of Ethnopharmacology*, 135:719-724.
- Caamal-Fuentes, E., Torres-Tapia, L.W., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S.R., 2011b. Boneidol, a new alkyl catechol from *Bonellia macrocarpa*. *Phytochemistry letters*, (4):345-347.
- García-Sosa, K., Sánchez-Medina, A., Álvarez, S.L., Zacchino, S., Veitch, N.C., Simá-Polanco, P., Peña-Rodríguez, L.M., 2011. Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product research*, 25(12):1185-1189.
- Halberstein, R. A., 2005. Medicinal plants: Historical and cross-cultural usage patterns. *AEP*, 15(6):686-699.
- Han, L.T., Li, J., Huang, F., Yu, S.G., Fang, N.B., 2009. Triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* induce apoptosis activity in HeLa cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(2):122-127.
- Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Sierras-Canchola, D., Lapizco-Vázquez, R., Ortiz-Sandoval, C., Burgos-Hernández, A., Robles-Zepeda, R.E., 2013. In vitro antioxidants and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(12):1-8.
- Koh, R., Tay, I., 2012. *Saponins; Properties, Applications and Health Benefits*. New York: Nova publishers.
- Li, Y., Gu, J.F., Zou, X., Wu, J., Zhang, M.H., Jing, J., Qin, D., Zhou, J.Y., Liu, B.X.Z., Zhu, Y.T., Jia, X.B., Feng, L., Wang, R.P., 2013. The Anti-Lung Cancer Activities of Steroidal Saponins of *P. pollyphylla* Smith var. *Chinensis* (Franch.) Hara Through Enhanced Immunostimulation in Experimental Lewis Tumor-Bearing C57BL/6 Mice and Induction of Apoptosis in the A549 Cell Line. *Molecules*, 18:12916-12936.
- López Estudillo, R. & Hinojosa García, A., 1988. *Catalogo de Plantas Medicinales Sonorenses*. Hermosillo Sonora, Universidad de Sonora.

- Mamedov, N., 2012. Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. *Med Aromat Plants*, 1(8):1-2.
- Moo-Puc, R., Chale-Dzul, J., Caamal-Fuentes, E., 2013. Bonellia albiflora: a mayan medicinal plant that induces apoptosis in cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013:8.
- NIH, 2012. *Cell Biology and Cancer*. Colorado Springs: National Institutes of Health.
- Paredes, A., Blanco, J. L., Echenique-Elizondo, M., 2006. Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos (MDR-proteínas) en tumores sólidos. *Cir Esp*, 79(4):202-214.
- Rascón-Valenzuela, L., Jiménez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, C., Garibay-Escobar, A., Vilegas, W., Campaner, L., Coqueiro, A., Robles-Zepeda, R.E., 2015. Chemical composition and antiproliferative activity of *Acalypha californica*. *Industrial Crops and Products*, 2015(69): 48-54.
- Siems, K., Jaensch, M., Jakupovic, J., 1998. Structures of the Two Saponins Isolated from Commercially Available Root Extract of *Primula* sp.. *Planta Medica* , (64):272-274.
- Torres-Moreno, H., Velázquez, C.A., Garibay-Escobar, A., Curini, M., Marcotullio, M.C., Robles-Zepeda, R.E., 2015. Antiproliferative and apoptosis induction of curcubitacin-type triterpenes from *Ibervillea sonorae*. *Industrial Crops and Products*, 77:895-900.
- Vidal Gutiérrez, M., 2014. *Actividad antioxidante y antiproliferativa de seis plantas medicinales sonorenses*. Hermosillo Sonora, Tesis: Universidad de Sonora.
- Wang, X., Wang, M., Xu, M., Wang, Y., Tang, H., Sun, X., 2014. Citotoxic Oleanane-Type Triterpenoid Saponins from the Rhizomes of *Anemone rivularis* var. *flore-minone*. *Molecules*, 19: 2121-2134.
- WHO, 2014. Cancer. *World Health Organization*, February, 297:6.
- Yetman, D., Van Devender, T. R., 2002. *Mayo Ethnobotany: Land, history and traditional knowledge in northwest Mexico*, University of California Press.
- Zapata, B., Durán, C., Stachenko, E., Correa-Royero, J., Betancur-Galvis, L., 2009. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. *Salud UIS*, (41): 215-222.