



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE EXTRACTOS Y
COMPUESTOS OBTENIDOS DE *Verbesina persicifolia* DC.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MEJÍA FLORES MARCELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Mariano Martínez Vázquez

COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. Elena Calderón Segura
Dra. Patricia Ramos Morales

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2010

La presente tesis se realizó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en el laboratorio 1-4 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química y en el Departamento de Citogenética Humana del Centro de Ciencias de la Atmósfera.

AGRADECIMIENTOS

A todo el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias por las facilidades, apoyo y consejos otorgados para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Francisco Basurto por su colaboración y asesoría prestada para la recolección de la especie *Verbesina persicifolia*.

Al M. en C. Héctor Ríos de Resonancia Magnética Nuclear, a la Q. Rocío Patiño Maya de Infrarrojo, al I. Q. Luis Velasco de Masas y a la Q. Erendira García Ríos de HPLC; del Instituto de Química por su valiosa colaboración para la obtención de los espectros de esta tesis.

A los M. en C. Teresa Ramírez Apan y Antonio Nieto por su valiosa ayuda y apoyo en la realización de los ensayos biológicos de inhibición del crecimiento celular en células de cáncer y actividad antiinflamatoria en pabellón auricular de ratón.

A la Dra. Aida Nelly García Argáez por su apoyo y valiosos consejos en la elaboración de este trabajo.

A la Q.F.B. Arian Viridiana Martínez Galicia por su valioso apoyo y ayuda en el ensayo de genotoxicidad.

Al Dr. José Luis Figueroa, por su valiosa ayuda y colaboración para la obtención de los ratones utilizados en el ensayo de genotoxicidad.

A la Dra. María Elena Calderón Segura por su apoyo, invaluable consejos y supervisión de esta investigación.

A la Dra. Patricia Ramos Morales por sus valiosos consejos y observaciones durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por la valiosa dirección y enfoque de este trabajo, muchas gracias por su paciencia e invaluable consejos, porque sin todo eso, este trabajo no sería posible.

Al Dr. Carlos Gerardo Velazco Macías por su valiosa colaboración con el material fotográfico de la especie vegetal *Verbesina persicifolia* DC.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi siempre querida casa de estudios a la que tanto le debo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante la elaboración de este trabajo.

Al Posgrado de Ciencias Biológicas por la formación académica.

DEDICATORIAS

A mis padres Mary y Pedro con todo mi corazón porque gracias a su apoyo, paciencia y cariño estoy aquí y soy todo lo que soy, sin ustedes no sería nada, gracias por impulsarme siempre a alcanzar mis metas, los adoro con todo mi ser.

A mi abuelita Constanza con muchísimo amor.

A mis abuelitos Bernarda y Concepción con mucho amor.

A mi hermano Daniel, gracias por ser parte de mi vida, te quiero muchísimo.

A mis tres sobrinos Daniel, Joaquín y Jimena que son mi adoración y la alegría de mi vida.

A Anabel, Mai y Rosaura mis mejores amigas y cómplices, gracias por ser parte de mi vida y compartir los mejores y peores momentos, las adoro.

A doña Isi y Elvi, porque junto con Ana siempre me han hecho sentir como de la familia, gracias por escucharme, apoyarme siempre y sobretodo por aguantarme, las adoro.

A Abril, Gaby, Julia y Arcelia mis mejores amigas de la carrera porque junto a ustedes he vivido los mejores y más divertidos momentos triple "i" y sin duda espero que sigamos haciendo de las nuestras, las quiero muchísimo, gracias por estar en todo momento.

A Carlos Güido, Vicky Leyva y Alejandro Martínez Mena, gracias por su valiosa amistad, sus valiosos consejos y su apoyo, los quiero muchísimo.

A Jose y Vero, las quiero muchísimo, gracias por su amistad, apoyo, consejos y siempre escucharme, las quiero mucho, mucho, mucho.

A Aída, gracias por tu valiosa amistad, consejos, apoyo, paciencia y ayuda, te quiero mucho.

A Adry y Viri, porque ustedes hicieron mi estancia en ese laboratorio increíblemente grata, gracias por todos esos momentos tan padres y divertidos.

A Iris, Enrique y José, gracias por su valiosa amistad, consejos y divertidas comidas en la Facultad de Ciencias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	4
I.I. Antecedentes	6
I.I.I. Compuestos anticancerosos de importancia clínica obtenidos de especies vegetales	7
I.I.II. Genotoxicidad de fármacos anticancerosos obtenidos de fuentes naturales	14
I.I.III. Micronúcleos	17
I.I.IV. <i>Verbesina persicifolia</i>	20
I.I.IV.I. Descripción taxonómica de <i>Verbesina persicifolia</i>	20
I.I.IV.II. Antecedentes químicos del género <i>Verbesina</i>	21
I.I.IV.III. Antecedentes químicos de <i>Verbesina persicifolia</i>	25
I.I.V. Actividad biológica de sesquiterpenos de tipo eudesmano	26
II. OBJETIVOS	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
III.I. Condiciones generales	29
III.II. Material vegetal	30

III.III. Preparación de extractos y aislamiento de compuestos	30
III.III.I. Aislamiento del 4α – cinamoiloxi, 1β,3α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (1) a partir del extracto hexánico	30
III.III.II. Aislamiento del 4α – cinamoiloxi, 1β,3α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (1) a partir del extracto de acetato de etilo	33
III.III.III. Aislamiento del 4α – cinamoiloxi, 1β,3α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (1) a partir del extracto diclorometano-metanol	39
III.III.IV. Obtención del 4α-(2.fenil) etil, 1β,3α-dihidroxieudesmano (2)	41
III.III.V. Obtención del extracto acuoso	41
III.III.VI. Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	41
III.IV. Actividad biológica	42
III.IV.I. Evaluación de la inhibición de la proliferación de células cancerosas	42
III.IV.II. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	43
III.IV.III. Evaluación de la actividad genotóxica	46
IV. RESULTADOS	48
IV.I. Identificación del compuesto 1	48
IV.II. Identificación del compuesto 2	48
IV.III. Análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución	51

IV.IV. Actividad biológica	54
IV.IV.I. Inhibición de la proliferación de células cancerosas	54
IV.IV.II. Actividad antiinflamatoria	55
IV.IV.III. Actividad genotóxica	56
V. DISCUSIÓN	59
VI. CONCLUSIONES	68
VII. BIBLIOGRAFÍA	69

RESUMEN

Bajo el nombre de cáncer se agrupan enfermedades que tienen en común una proliferación celular acelerada, la cual no responde a los controles normales de la célula y a largo plazo puede derivar en metástasis. No obstante que en el presente se cuenta con varios fármacos anticancerosos, desafortunadamente no son selectivos lo cual acarrea serios efectos secundarios. Aunado a lo anterior, con el tiempo, las células cancerosas presentan resistencia a los fármacos utilizados en la clínica.

La necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer demanda la exploración de todas las estrategias. Entre las posibles aproximaciones, la referente a los llamados productos naturales ha hecho contribuciones únicas para el descubrimiento de nuevos fármacos.

Verbesina persicifolia, también conocida como huichín, se utiliza en la medicina tradicional mexicana, principalmente para el tratamiento de inflamación, dolor, cáncer y diabetes. Tomando en cuenta los usos etnobotánicos de *V. persicifolia* se decidió evaluar la inhibición de proliferación de células cancerosas, la actividad antiinflamatoria así como la actividad genotóxica del extracto acuoso de esta especie. Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el metabolito secundario mayoritario presente en *V. persicifolia*, el 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**) inhibía la proliferación celular de varias líneas de cáncer humano. Con el fin de realizar estudios de variación estructural con la actividad biológica se obtuvo el derivado 4α -(2-fenil) etil- $1\beta,3\alpha$ -dihidroxieudesmano (**2**) a partir de **1**.

El compuesto **2** mostró inhibición de la proliferación de células cancerosas en las seis líneas celulares ensayadas. Los valores de IC_{50} se ubicaron entre 5.79 y 22.13 μ M. Por otro lado, el extracto acuoso mostró una actividad muy baja en el ensayo primario con un porcentaje de inhibición del 39.51% a una concentración de 50 μ g/mL en la línea de leucemia linfoblástica crónica (K562). Adicionalmente ni el extracto acuoso ni el compuesto **2** mostraron actividad antiinflamatoria.

De manera interesante los sesquiterpenos **1**, **2** así como el extracto acuoso no inducen daño cromosómico. Los resultados indican que los eudesmanos **1** y **2** muestran

inhibición de la proliferación de células de varios tipos de cáncer, pero no son genotóxicos.

ABSTRACT

Under the name of cancer are grouped a number of diseases which have in common a rapid cell proliferation, which does not respond to the normal controls of the cell and show metastases. Although in the present there are several anticancer drugs, unfortunately, they are not selective which results in serious side effects. Added to this, over time, cancer cells are resistant to the drugs used in the clinic.

The need to discover and develop new drugs for cancer treatment demands explorer all strategies for drug discovery. Among the possible approaches, that of the so-called natural products has made unique contributions to the discovery of new drugs.

Verbesina persicifolia also known as huichin, is used in Mexican traditional medicine, mainly for the treatment of inflammation, pain, cancer and diabetes. Taking into account the ethnobotanical uses of *V. persicifolia* it was decide to evaluate the inhibition of cancer cells proliferation, the anti-inflammatory activity and genotoxic activity of an aqueous extract of this species. Previous studies by our group demonstrated that the main secondary metabolite present in *V. persicifolia*, 4 α -cinamoiloxy-1 β , 3 α -dihydroxyeudesm-7.8-ene (**1**) inhibited cell proliferation of several lines of human cancer. In order to study the relation of the structural variation with biological activity it was obtained 4 α -(2-fenil)etil-1 β ,3 α -dihydroxyeudesmane (**2**) from **1**.

Compound **2** showed inhibition of proliferation of cancer cells in the six cell lines tested. Its IC₅₀ values ranged between 5.79 and 22.13 μ M. On the other hand, the aqueous extract showed a very low activity in the primary test with 39.51 percent inhibition at a concentration of 50 μ g / mL in chronic lymphoblastic leukemia cell line (K562). Additionally the aqueous extract and **2** were inactive as anti-inflammatory agent.

Interestingly sesquiterpenes **1**, **2** as well as the aqueous extract did not induce chromosomal damage. In summary, our results indicate that eudesmane **1** and **2** showed inhibition of cell proliferation of several types of cancer, but they are not genotoxic.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad de descubrir y desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer demanda la exploración de todas las estrategias posibles. Una de las más importantes ha sido el aprovechamiento de productos naturales, la cual ha permitido el aislamiento de algunos metabolitos secundarios usados en la clínica.

Un dato que ilustra la importancia de los metabolitos secundarios, como fármacos o precursores anticancerosos, es el hecho de que en el año 2000, aproximadamente el 53% de los compuestos usados en ensayos clínicos como agentes antitumorales, en todo el mundo, fueron obtenidos de metabolitos secundarios o algunos de sus derivados producidos a partir de modificaciones químicas así como fármacos diseñados a partir de unidades farmacóforas presentes en la estructura de algunos de estos compuestos (Newman *et al.*, 2003)

Entre los fármacos anticancerosos empleados actualmente en la clínica y que son de origen vegetal están los alcaloides de la vinca, la vinblastina y vincristina, también se encuentra el paclitaxel y otros taxanos, compuestos inicialmente aislados de especies del género *Taxus*, así como los derivados de camptotecina, y de la epipodofilotoxina.

Adicionalmente a lo anterior, diversos compuestos, basados en su actividad selectiva contra blancos moleculares relacionados con el cáncer, incluyendo flavopiridol y fosfato de combrestatina A4 están actualmente siendo evaluados en estudios clínicos (Cragg & Newman 2005).

Como se ha comentado anteriormente, la importancia de los llamados productos naturales ha sido fundamental para el desarrollo de algunos de los fármacos anticancerosos más utilizados hoy en día. En este contexto, la medicina tradicional o herbolaria es un referente obligado para la obtención de información primaria acerca del uso de especies vegetales para el tratamiento del cáncer.

Algunas plantas pueden ser farmacológicamente y clínicamente efectivas, pero no necesariamente libres de toxicidad y efectos secundarios.

A principios de la década de los 70 Schmid y Heddle propusieron el ensayo de micronúcleos como una aproximación para evaluar el daño en cromosomas *in vivo*. Los micronúcleos han sido considerados como un índice confiable para detectar rompimiento y pérdida de cromosomas. Para estudios de toxicología genética, la formación de micronúcleos en medula ósea y eritrocitos de sangre periférica es reconocido como uno de los métodos establecidos para ensayos de citogenética *in vivo* (Shahrim *et al.*, 2006). Por lo que estudios de genotoxicidad pueden ayudar a evaluar la seguridad y efectividad de las plantas medicinales.

Verbesina persicifolia es una planta que se utiliza dentro de la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos entre los que se encuentran la inflamación, cáncer, dolor y diabetes (Martínez *et al.*, 2001). De esta especie vegetal se logró aislar un sesquiterpeno de tipo eudesmano; el 4 α -cinamoiloxi, 1 β ,3 α -dihidroxi eudesm-7,8-eno (**1**), el cual mostró inhibición del crecimiento en líneas celulares de cáncer y actividad antiinflamatoria, en el ensayo de sulforrodamida B y el ensayo de edema inducido por TPA en el pabellón auricular de ratón, respectivamente (Mejía, 2007).

Dadas las propiedades y el uso de esta especie, en el presente trabajo se dan a conocer los resultados de la actividad genotóxica del extracto acuoso, el compuesto **1** y un derivado semisintético de **1**. Adicionalmente se presentan los resultados de actividad antiinflamatoria y de inhibición del crecimiento de células cancerosas del extracto acuoso y del derivado obtenido a partir de **1**.

I.I. ANTECEDENTES

En la medicina tradicional mexicana el consumo de plantas en forma de infusiones o emplastos es una práctica muy extendida, y la persistencia en el uso de especies medicinales en comunidades rurales o urbanas debe ser considerada una buena evidencia de su eficacia (Popoca *et al.*, 1998). Es por ello que las plantas medicinales han sido una vasta fuente de sustancias biológicamente activas las cuales, eventualmente, permitirán el desarrollo de nuevos fármacos.

Tomando en cuenta lo anterior, se han implementado algunos programas para el descubrimiento e investigación de fármacos anticancerosos a gran escala, tales como el promovido por el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, los cuales han sido clave en el desarrollo de compuestos anticancerosos a partir de fuentes naturales. Adicionalmente, el advenimiento de nuevas tecnologías ha incrementado la obtención de fármacos a partir de productos naturales.

Vincristina, irinotecano, etoposido y paclitaxel son los ejemplos clásicos de compuestos derivados de plantas; actinomicina D, mitomicina C, bleomicina, doxorubicina y L-asparginasa son fármacos provenientes de fuentes microbianas y citarabina es el primer fármaco de origen marino. A la fecha, nuevas generaciones de taxanos, antraciclinas, alcaloides de la vinca, camptotecinas, así como una nueva clase de epotilonas han sido desarrollados, algunos de estos compuestos están en la clínica mientras que otros están en ensayos clínicos. Estos fármacos presentan diferentes mecanismos de acción incluyendo por ejemplo, la interacción con microtúbulos, inhibición de topoisomerasas I o II, alquilación de DNA e interferencia con la transducción de señales en células cancerosas.

Varios compuestos de origen vegetal, los cuales han demostrado tener efectos positivos en la terapia del cáncer, tienen una larga historia detrás de ellos, tal es el caso de *Camelia sinensis*, cuyo uso está documentado en antiguos textos japoneses. Recientemente se ha demostrado que el antioxidante de esta especie, la EGCG (epigallocatequina-3-galato), redujo significativamente la velocidad del crecimiento del cáncer de mama en ratones hembra.

La mirra es derivada de la resina de *Commiphora myrrha*, históricamente ha sido usada para enfermedades tan diversas como dolor de estómago, indigestión, mala circulación, curación de heridas, enfermedades de la piel y ciclos menstruales irregulares. Esta resina tiene actividad citotóxica sobre células cancerosas en general, pero también es efectiva para aquellas que son resistentes a otros fármacos anticancerosos. Se cree que inactiva a la proteína Bcl-2, un factor natural que es sobreproducido por las células de cáncer, particularmente en mama y próstata (Nobili *et al.*, 2009).

I.I.I. Compuestos anticancerosos de importancia clínica obtenidos de especies vegetales.

En la década de los 60 el Instituto Nacional del Cáncer inició un estudio prospectivo de una serie de plantas colectadas, incluyendo un extracto del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* (Fig.1), colectado en 1962 por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Después de varios años de investigación se aisló el principio activo, el taxol, ahora llamado paclitaxel (Fig.2), el cual ha sido uno de los fármacos más efectivos contra el cáncer de mama y ovario y ha sido aprobado alrededor del mundo para el tratamiento clínico de pacientes con cáncer. Sin embargo, el rendimiento del paclitaxel es extremadamente bajo y su demanda muy alta, esto llevó a la búsqueda de nuevas estrategias para la obtención de este fármaco. En 1990, Robert A. Holton logró sintetizar el paclitaxel a partir del 10-deacetil bacatina III extraído de las hojas del tejo inglés (*Taxus baccata*), el cual es común en Europa y Estados Unidos (Song & Dumais, 1991).



Fig. 1. *Taxus brevifolia*.

Es conocido que varios cánceres desarrollan resistencia a los fármacos, entre ellos al taxol, con el propósito de reducir esta resistencia, se han obtenido nuevos análogos de taxanos, entre los que están el abraxano, CT-2103 y el docosa-hexenoato de paclitaxel. Estos nuevos taxanos han mostrado ser efectivos en cánceres que son resistentes al taxano y contra tumores que no han respondido al tratamiento con paclitaxel, estos tienen un perfil toxicológico más seguro y su administración no requiere pre – medicación para reacciones de hipersensibilidad.

El paclitaxel y el docetaxel son compuestos hidrofóbicos caracterizados por un núcleo anillo de taxano, esterificación en el C-13 con un complejo grupo ester, y un inusual cuarto anillo en el C-4,5. Las dos últimas características estructurales son esenciales para su actividad biológica (Nobili *et al.*, 2009).

Los taxanos exhiben una actividad citotóxica única estabilizando los microtúbulos más que desestabilizándolos como lo hacen los alcaloides de la vinca. En particular estos compuestos promueven el ensamblaje de los microtúbulos evitando que se desensamblen; el paclitaxel y el docetaxel se unen a la subunidad 3 de la tubulina.

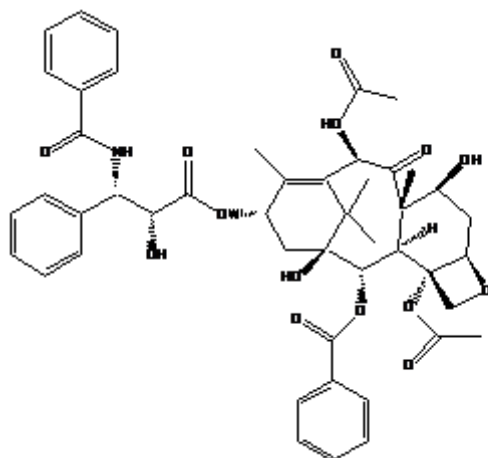


Fig. 2. Paclitaxel.

El paclitaxel y el docetaxel tienen efectos diferentes en el ciclo celular, el primero lo inhibe en la fase G2-M, mientras que el segundo produce su efecto en la fase S (Dorr, 1997)

Ha sido informado que los taxanos presentan otros efectos antitumorales que no están directamente asociados con la acción clásica hacia los microtúbulos. La apoptosis

inducida por paclitaxel y docetaxel ha sido asociada con el incremento de la fosforilación de Bcl-2. En adición, el paclitaxel induce la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la disminución de la expresión de receptores TNF (Ding *et al.*, 1990).

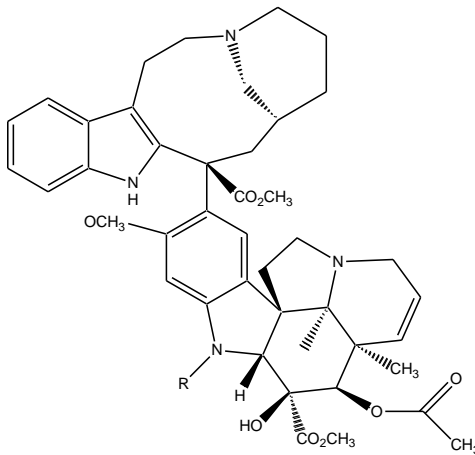
Paclitaxel y docetaxel tienen una alta actividad en un espectro de tumores sólidos (ovario, mama, pulmón, gastroesofágico, vejiga, testículos y endometrio).

Otra especie vegetal de suma importancia para la clínica es *Catharanthus roseus* (Fig. 3) de la cual se aislaron los alcaloides de la vinca. Los extractos de esta especie poseen muchos efectos terapéuticos incluyendo la actividad antitumoral. Vincristina, vinblastina (Fig. 4) y vindesina fueron los primeros alcaloides de la vinca con actividad antitumoral en ser identificados. Por otro lado la vinorelbina fue de los primeros alcaloides de la vinca de segunda generación junto con la vinflunina, la cual es un derivado bis-fluorinado de la vinorelbina. Debido a su favorable actividad antitumoral, incluyendo la desorganización en la dinámica de los microtúbulos y su efecto de antiangiogénesis, la vinflunina está en fase clínica I-III (Nobili *et al.*, 2009)



Fig. 3. *Catharanthus roseus*.

Los alcaloides de la vinca son compuestos diméricos asimétricos que consisten de dos subunidades multi-anilladas, vindolina y catharantina, ligadas por un puente C-C.



Vincristina, R = CHO
 Vinblastina, R = CH₃

Fig. 4. Vincristina y vinblastina obtenidos de *Catharanthus roseus*.

Los alcaloides de la vinca desorganizan el ensamblaje del huso mitótico mediante la interacción con tubulina. En particular, se unen específicamente a la β -tubulina y bloquea su capacidad para polimerizarse con la α tubulina, inhibiendo la formación de microtúbulos y evitando que la célula forme husos mitóticos (Ngan *et al.*, 2001).

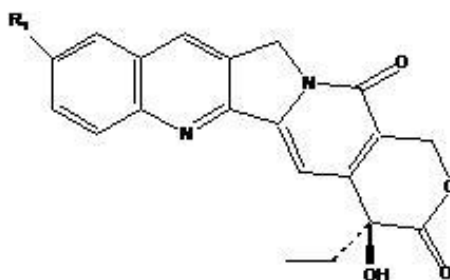
La vincristina se utiliza en el tratamiento de neoplasias hematológicas y linfáticas, así como en varios tumores sólidos. Por otro lado, la vinblastina se emplea para el tratamiento de cáncer de mama, testicular, coriocarcinoma y la vindesina para el cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de mama, entre otros.

Los efectos secundarios comunes de estos fármacos son la mielosupresión y neurotoxicidad. La vinorelvina es usada para el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de mama metastásico. La vinflunina ha sido usada en el tratamiento de cáncer de vejiga, células de pulmón no pequeñas y cáncer de mama.

Por otra parte, durante la década de los 50 se obtuvo un extracto de *Camptotheca acuminata* (Fig. 5), el cual se caracterizó por tener una actividad citotóxica contra una variedad de leucemias y tumores sólidos. En 1966 la camptotecina (Fig. 6) fue identificada como el constituyente activo del extracto. Sin embargo, a pesar de la prometedora actividad antitumoral preclínica y clínica, este compuesto mostró toxicidad muy elevada.



Fig. 5. *Camptotheca acuminata*.



R₁ = H, Camptotecina

Fig. 6. Camptotecina, aislada de *Camptotheca acuminata*.

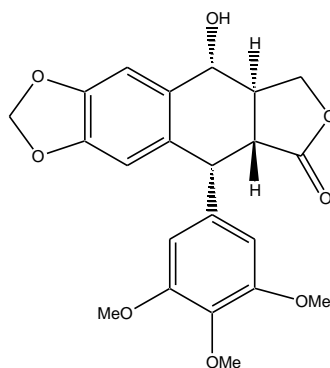
Después de años de intensa investigación, en 1996 dos análogos semisintéticos, de la camptotecina, el irinotecano y topotecano, se introdujeron a la clínica para el tratamiento de cáncer colorectal y ovárico, respectivamente.

Hoy en día, varios análogos de camptotecina están siendo evaluados en fases clínicas, como el lurtotecano, mesilato de exatecano, karenitecina y gimatecano, éstos presentan varias ventajas comparado con las clásicas camptotecinas semisintéticas, como ser activos en cánceres resistentes a éstas. Los agentes mencionados están siendo evaluados en fase clínica I-II (García-Carbonero & Supko, 2002).

La posición de algunos grupos funcionales en los derivados de camptotecina son fundamentales para su actividad biológica, como lo son el hidroxilo en la posición 20 en la

lactona terminal y el N,N – dimetilaminometil en el C-9. Las camptotecinas causan daño al DNA estabilizando el complejo covalente topoisomerasa I-DNA.

Por otro lado, las podofilotoxinas tienen una larga historia terapéutica, extraídas de las raíces de *Podophyllum peltatum*, la podofilotoxina (Fig. 7) fue usada como remedio por sus efectos eméticos, catárticos y antihelmínticos. De un amplio programa de síntesis química emergieron dos compuestos activos, etopósido y tenipósido. La topoisomerasa II es el blanco clave para ambos, estos forman un complejo ternario con la topoisomerasa II y el DNA.



Podofilotoxina

Fig. 7. *Podophyllum peltatum* y su compuesto aislado, la podofilotoxina.

El etopósido se utiliza para el tratamiento de cáncer de pulmón, coriocarcinoma, cáncer testicular y ovárico, linfoma y leucemia mieloide aguda. El tenipósido es aprobado para tumores de sistema nervioso central, linfomas y cáncer de vejiga (Nobili *et al.*, 2009).

Otros ejemplos de compuestos derivados de plantas actualmente bajo investigación son el flavopiridol, homoharringtonina, β -lapacona y combrestatina A4.

El flavopiridol es una flavona sintética derivada del alcaloide rohitukina, la cual fue aislada de las hojas y tallos de *Amoora rohituka* y posteriormente de *Dysoxylum binectariferum*. El flavopiridol es un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, este agente está en fase clínica I-II. Evidencia disponible indica una respuesta alentadora en una variedad de neoplasias hematológicas y sólidas.

La homoharringtonina es un alcaloide aislado de *Cephalotaxus harringtonia*, este es caracterizado por su eficacia contra varios tipos de leucemias y se encuentra en fase clínica II-III. El mecanismo de acción principal de este compuesto es la inhibición de la síntesis de proteínas, bloqueando la progresión del ciclo celular.

La β -lapacona es una quinona obtenida de la corteza de *Tabebuia avellanedae*, este compuesto es un inhibidor de la topoisomerasa I y está siendo investigado en fase clínica I-II.

La combrestatina A4, aislada de *Combretum caffreum*, es un agente antiangiogénico, inhibe el crecimiento de vasos sanguíneos, causando la muerte de las células del tumor. Los ensayos de fase I han mostrado actividad clínica y un perfil toxicológico favorable (Nobili *et al.*, 2009)

I.I.II. Genotoxicidad de fármacos anticancerosos obtenidos de fuentes naturales.

El uso de fármacos citotóxicos para la quimioterapia del cáncer comenzó en los años 50. A pesar del innegable avance en la obtención de nuevos fármacos anticancerosos, todavía no se han obtenido resultados que a la par de su eficacia sean selectivos y no causen efectos secundarios importantes.

Los fármacos más efectivos proveen un sinnúmero de síntomas de toxicidad directa. Adicionalmente a lo anterior, hay numerosos informes de formación de cánceres secundarios seguidos de la quimioterapia del cáncer original (Ferguson & Pearson, 1996).

Se conoce que las alteraciones en el número y estructura de los cromosomas aumentan el riesgo de enfermedades hereditarias y de carcinogénesis, por lo que existen baterías de pruebas a corto plazo para evaluar dichas alteraciones.

Se ha demostrado la genotoxicidad de los alcaloides de la vinca, usando ensayos de micronúcleos en células de médula ósea de ratón *in vivo* y en células de mamífero *in vitro*. Maier y Schmid (1976) también encontraron resultados positivos en el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón y sangre periférica en dosis terapéuticas de estos alcaloides (0.01-40 mg).

Adicionalmente, se ha informado que tanto vincristina como vinblastina tienen actividad aneugénica (rezago de cromosoma debido a la alteración del huso mitótico) y clastogénica (rompimiento de cromosoma). La vincristina, presentó una menor acción clastogénica demostrada en una prueba de DNA donde se detectaron centrómeros en micronúcleos de linfocitos humanos.

También se ha observado que las modificaciones estructurales de la vincristina, la cual es un derivado de la vinblastina, afectan su genotoxicidad, ya que este último compuesto es más genotóxico que el primero (Tiburi *et al.*,2002).

Heddle y Bruce (1977) encontraron efectos positivos en la prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón *in vivo*, así como para anomalías en espermatozoides. Mueller y colaboradores (1978) describieron resultados positivos para la inducción de micronúcleos y anomalías nucleares.

Por otro lado, con el fin de evaluar posibles daños genéticos, en 1992 Perera y colaboradores examinaron pacientes tratados con cisplatino/carboplatino y etopósido o vinblastina usando varias aproximaciones, tales como ADN o aductos, intercambio de cromátidas hermanas, micronúcleos o mutaciones somáticas. Todas las muestras post tratamiento mostraron tasas de incidencia de genotoxicidad elevada.

Adicionalmente tanto el etopósido como el tenipósido inducen el rompimiento en cromosomas mediado por la topoisomerasa II.

En 1992 Ferguson y Pearson encontraron que la podofilotoxina causaba cambios estructurales y numéricos en una línea celular de hámster chino. Cambios en el número de cromosomas posteriores a la exposición han sido mostrados en células de cebolla.

Hermine y colaboradores (1997) informaron que el etopósido y la podofilotoxina indujeron la formación de micronúcleos en líneas celulares de hámster chino. Adicionalmente, utilizando la técnica de marcaje del cinetócoro con anticuerpos hallaron que el etopósido provocó fragmentos acéntricos predominantemente, sin embargo, también encontraron de un 20 al 40% de micronúcleos con marcaje positivo para cinetócoro, por lo que este compuesto es tanto clastogénico como aneugénico. Por otro, lado la podofilotoxina indujo aproximadamente el 90% de micronúcleos con marcaje positivo para cinetócoro, por lo que este compuesto es aneugénico (Hermine *et al.*, 1997).

Tinwell y Ashby (1994) demostraron la actividad genotóxica del paclitaxel en el modelo de micronúcleos en médula ósea de ratón a una dosis de 50 mg/kg, la cual es cercana a la dosis terapéutica.

Cambios en el número (aneuploidía y poliploidía) y la estructura están relacionados con la conversión maligna y progresión del cáncer debido a la inestabilidad cromosómica.

Por lo tanto, cualquier fármaco anticanceroso con estas propiedades lleva el riesgo de inducir cánceres secundarios así como la promesa de curar el cáncer primario.

La evaluación cuidadosa del riesgo así como de los beneficios de la administración del fármaco debe ser considerada.

Para reducir el daño de los efectos secundarios a las células somáticas normales, se han implementado varias estrategias entre las cuales se encuentran el buscar un blanco más específico para las células cancerosas así como el uso de terapia combinacional que pueda usar dosis mucho más bajas que las que se utilizan individualmente (Volders & Parry, 1996).

I.I.III. Micronúcleos

Los micronúcleos se caracterizan por ser pequeños fragmentos redondos, que contienen ADN, los cuales se localizan en el citoplasma. Fueron encontrados por primera vez en eritrocitos en 1891 por Howell y posteriormente fueron descritos por Jolly, por lo que se les conoce también con el nombre de cuerpos de Howell-Jolly.

Se sabe que los micronúcleos pueden ser formados como una consecuencia tanto del rompimiento del cromosoma como de la disfunción del huso mitótico. A principios de los 70 Schmid y Heddle trabajaron un método llamado prueba de micronúcleos, usando la presencia de estos fragmentos como un indicador de daño cromosómico (Heddle, 1973)

La necesidad de métodos para la detección de agentes químicos genotóxicos era urgente a la luz de la hipótesis presentada por Ames y colaboradores (1973) de que los carcinógenos son también mutágenos.

Con el método de Schmid y colaboradores la inducción de micronúcleos es estudiada durante la eritropoyesis, este ensayo tiene como ventaja el hecho de que los mamíferos expulsan el núcleo de las células rojas de la sangre pre-maduras, sin embargo, el micronúcleo formado durante el último ciclo celular del eritroblasto permanece en el eritrocito joven debido a que éste no se incorporó a ninguno de los núcleos de las células en división (Fig. 8) (Jenssen, 1982).

Los micronúcleos pueden estar presentes en casi cualquier tipo celular, pero en células nucleadas algunos de los micronúcleos no son fácilmente observables debajo del núcleo principal.

Usando los micronúcleos como un indicador de daño cromosómico, se han realizado estudios en plantas, con diferentes sistemas tanto *in vivo* como *in vitro*. Los micronúcleos también han sido estudiados en células de la médula ósea y en linfocitos periféricos de humanos.

Generalmente es encontrado uno por célula, bien delimitado y redondeado con propiedades de tinción de ADN nuclear y son usualmente de 1/20 a 1/5 del tamaño del núcleo principal (Jenssen, 1982).

El ensayo *in vivo* es especialmente relevante para la evaluación del daño genotóxico ya que éste permite la consideración de factores del metabolismo *in vivo*, farmacocinética y procesos de reparación del ADN. Este ensayo detecta tanto clastogenicidad (rompimiento de cromosomas) como aneugenicidad (rezago del cromosoma completo debido a la alteración del aparato mitótico).

Un incremento en la frecuencia de eritrocitos policromáticos (eritrocitos jóvenes) micronucleados (EPMN) en los animales tratados con el agente de prueba es indicador de daño cromosómico inducido. Este ensayo está ideado principalmente para evaluar la capacidad de los agentes de prueba a inducir daño estructural y/o numérico (Krishna & Hayashi, 2000).

El eritrocito policromático (EP) es una etapa transitoria del desarrollo del eritrocito que tarda de 10-20 horas en la médula ósea. El periodo entre la última mitosis y la formación de un eritrocito policromático es de 8-12 horas y el daño genotóxico en eritrocitos de sangre periférica se detecta entre las 20-25 horas (Grawé, 2005). Por otro lado, el tiempo de maduración hacia eritrocito normocromático (eritrocito maduro) excede las 30 h (Maier & Schmid, 1976).

La investigación del potencial mutagénico o antimutagénico de las plantas usadas en la medicina tradicional está generando un creciente interés ya que se busca que el consumo de éstas sea seguro y no tengan efectos genotóxicos a largo plazo (Cherdshewasart *et al.*, 2008)

Por otro lado, además de evaluar la toxicidad general de los metabolitos secundarios aislados de especies vegetales, también es importante y necesario analizar su actividad genotóxica (Mittal *et al.*, 2009).

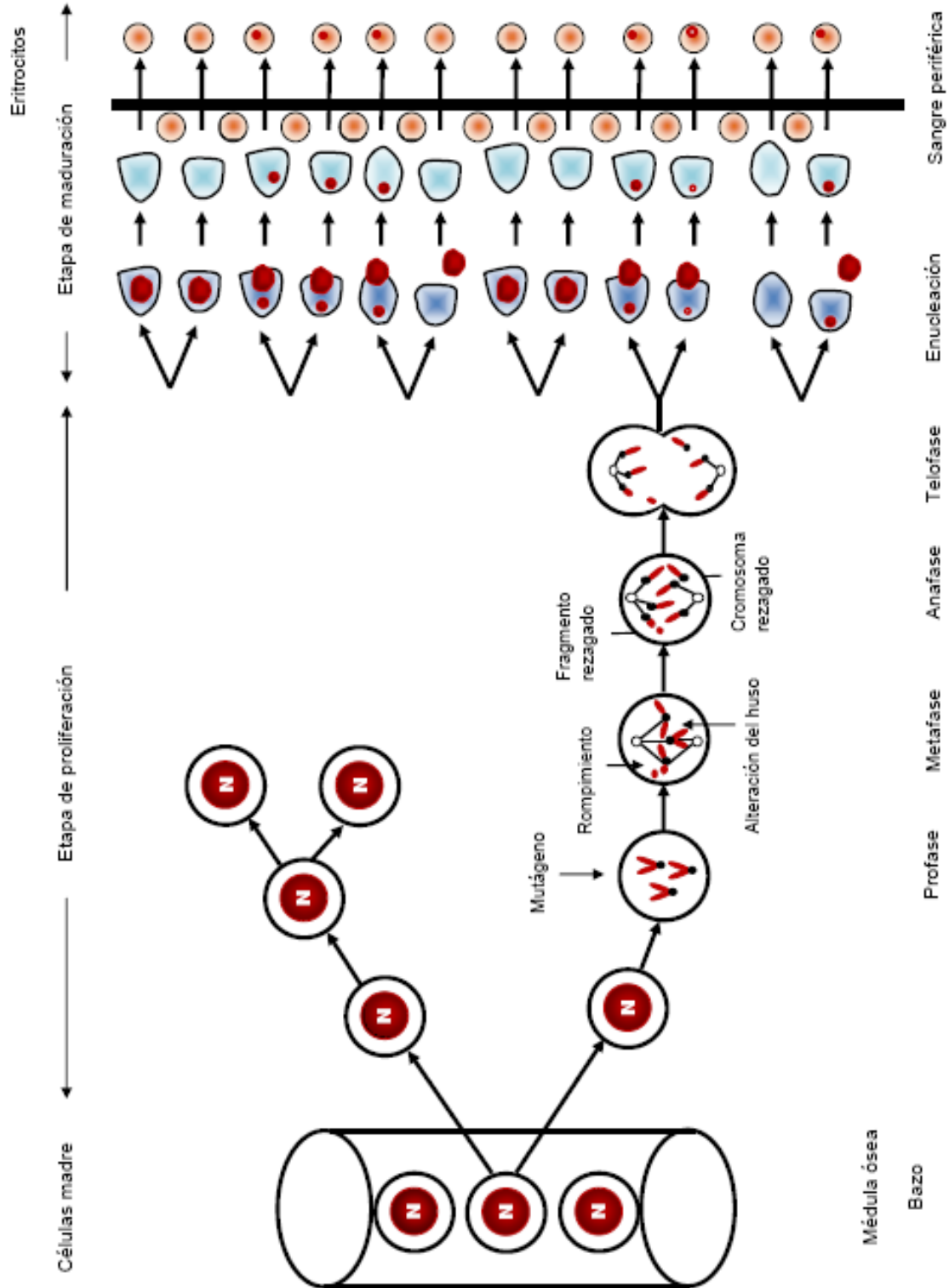


Fig. 8. Proceso de eritropoyesis y mecanismo de formación de micronúcleos (tomado y modificado de Krishna y Hayashi, 2000)

I.I.IV. *Verbesina persicifolia*

I.I.IV.I. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE *Verbesina persicifolia*

Ubicación taxonómica de *Verbesina persicifolia* DC.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Verbesina* (Cronquist, 1981)

Especie: *Verbesina persicifolia* DC. (Fig.9) Prodr. 5:614. 1836

Descripción botánica de la especie: Arbusto que mide aproximadamente 4 metros de alto, de tallos estriados diminutamente puberulentos o glabros, hojas alternadas y con un pecíolo corto, estrechamente lanceoladas que miden de 15-25 centímetros de largo y de 3-5.5 centímetros de ancho, de largo acuminado, base atenuada, márgenes serrados, esencialmente glabras en ambas superficies; inflorescencias corimbosas, cabezas radiadas, usualmente numerosas, los pedicelos son adpreso – puberulentos, los involucros son pateliformes, en anthesis miden de 6-10 milímetros de ancho; filarias triseriadas, oblongas, redondeadas a subagudas, 3-4 milímetros de largo, cilioladas; paleas lineares glabras o casi glabras, triangulares a subagudas en el apéndice; flores del radio 12-21, las ligulas amarillas, 4-5 milímetros de largo; flores del disco numerosas, aquenios del radio glabrosos, alados; vilano de flores del radio de 1 o 2 aristas; vilano de flores del disco de 2 aristas cortas (Nash, 1976).

Nombres comunes: huichin (Puebla), huichim (Hidalgo), taxiwua (Veracruz) y tlamacas (Tlaxcala) (Gallardo *et al.*, 1994).

Usos: se utiliza comúnmente en Veracruz, Tlaxcala y Puebla para tratar diversos problemas de salud tales como heridas, cáncer, inflamación del hígado, úlcera estomacal, dolor de riñones, disentería, dolor de estómago, diabetes, granos en los dedos y dolor muscular, la forma de empleo es generalmente como decocción, fomento e infusión (Martínez *et al.*, 2001).

Altitud: entre los 200 y los 1850 msnm (Gallardo *et al.*, 1994).

Vegetación: asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, así como a matorral xerófilo (Gallardo *et al.*, 1994).

Distribución: Puebla, Veracruz, Tlaxcala, Tamaulipas, San Luís Potosí, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Chiapas y Tabasco (Gallardo *et al.*, 1994 y United States Department of Agricultura Agricultural Research Service, Beltsville Area Germplasm Resources Information Network).



Fig. 9. *Verbena persicifolia*

I.I.IV.II. Antecedentes químicos del género *Verbesina* L.

El género *Verbesina* L. contiene aproximadamente 150 especies, las que en su mayoría crecen en áreas tropicales y sólo unas pocas se extienden hacia áreas templadas (Cronquist, 1981; Nash, 1976).

A pesar del gran número de especies que presenta este género, solamente se ha investigado la fitoquímica de algunas de ellas. Estos estudios han indicado la presencia de compuestos de tipo cadinano, bisaboleno, terpenoide, flavonoide, poliacetileno, benzoquinona, guanidina, derivados de acetofenona y ácidos aromáticos libres y formando ésteres del tipo caféico, ferúlico, cinámico, siríngico, entre otros.

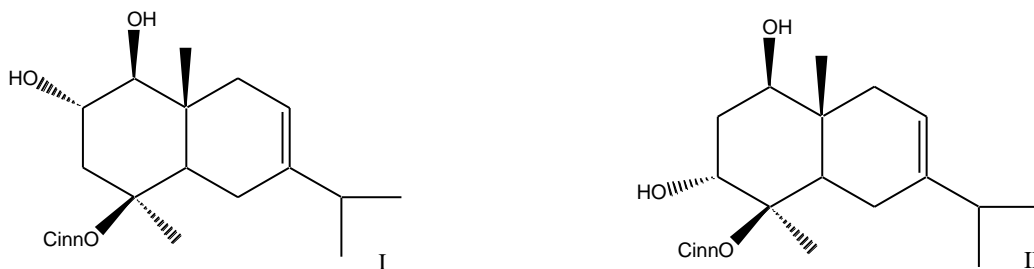
En cuanto a los terpenoides exhibidos en el género, los resultados muestran que el género no es uniforme. Sin embargo, dentro de las especies de *Verbesina* investigadas se observa que hay un grupo de éstas que se caracteriza por la presencia de terpenos, esterificados con el ácido cinámico y otros ácidos relacionados, siendo este tipo de compuestos los que muestran mayor distribución (Bohlmann *et al.*, 1980).

Otras especies del género poseen lactonas sesquiterpénicas, principalmente de tipo eudesmano, germacrano, elemenano, algunos de estos también esterificados con los ácidos cinámico, cumárico y caféico.

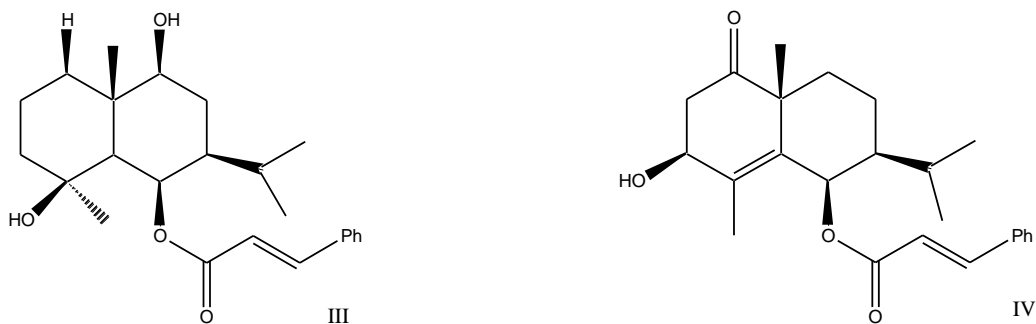
También están presentes los diterpenos de tipo kaureno y triterpenos tipo lupeol y taraxasterol.

A la fecha, son pocos los compuestos, aislados de *Verbesina*, que se han evaluado por su acción biológica. A continuación se presentan algunos eudesmanos existentes en especies de este género.

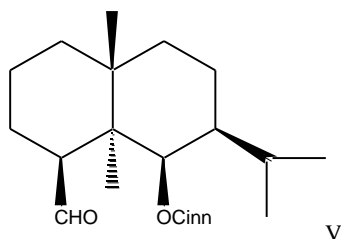
De las partes aéreas de *V. virgata* Cav. se aislaron el 4 β -cinamoiloxi-1 β ,2 α -dihidroxi-eudesm-7-eno (I) y el 4 β -cinamoiloxi-1 β , 3 α -dihidroxi-eudesm-7-eno (II) (Martínez *et al.*, 1983).



De las raíces de *V. sordescens* DC. se aislaron el 4 β , 9 β -dihidroxi-6 β -cinamoiloxi-eudesmano (III) y el 3 β -hidroxi-6 β -cinamoiloxi-eudesm-4-en-1-ona (IV) (Bohlmann *et al.*, 1982)



De las partes aéreas de *V. glabrata* Hook. et Arn. Se logró aislar el 6 β -cinamoiloxi-eudesm-15-al (V) (Bohlmann *et al.*, 1980).

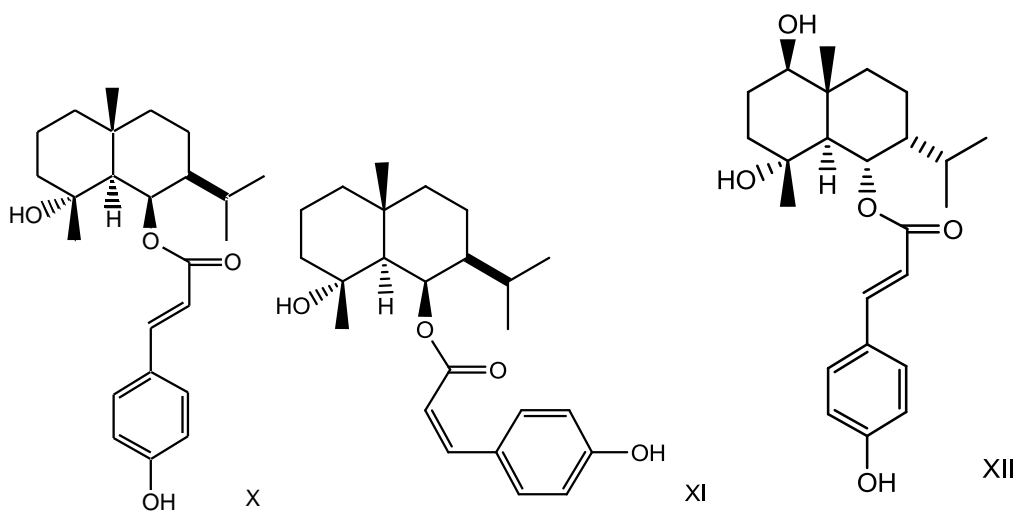


De las raíces de *V. luetzelburgii* Mattf. se aislaron el 6 β -cinamoiloxi-1 β -hidroxieudesm-4(15)-eno (VI), 6 β -cinamoiloxi-1 β -hidroxieudesm-3,4-eno (VII), 6 β -cinamoiloxi-4 β -hidroxieudesmano (VIII) y 6 β -cinamoiloxi-1 β , 4 β -dihidroxieudesmano (IX) (Bohlmann *et al.*, 1980).

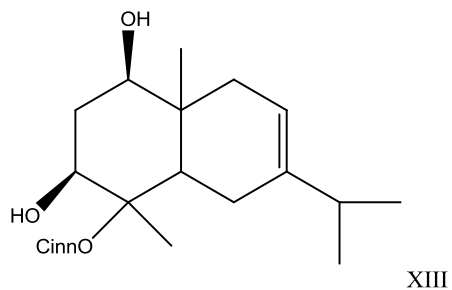




De las partes aéreas de *V. virginica* se aislaron el 6-O- β -E-p-cumaril-4 α -hidroxieudesmano (X), el 6-O- β -Z-p-cumaril-4 α -hidroxieudesmano (XI) y el 6-O- α -E-p-cumaril-1 β -4 α -dihroxieudesmano (XII) (Xu *et al.*, 2010).



De *V. perymenoides* Sch. Bip. Ex Klatt se aisló el 1 β , 3 β -dihidroxi-4-cinamoiloxi-7-en-eudesmano (X) (Villarreal *et al.*, 1994).



I.I.IV.III. Antecedentes químicos de *Verbesina persicifolia*

En 1987 Jakupovic y colaboradores realizaron un estudio químico de esta especie el cual reveló la presencia de los compuestos α -pineno, γ -cadineno, aromadendreno, cariofileno, germacreno D, espatulenol, cubebol, epóxido de cariofileno, 2 OH- α -curcumeno, 6 β -cinamoiloxi-1 β -OH-eudesm-3-eno (Fig. 10), 6 β -cinamoiloxi-1 β -OH-eudesm-4-(15)-eno (Fig. 10), oplodiol-4-O-cinamato, α -humuleno, tridecapentaineno, anhidro-oplopanona; arbusculina B, α -ciclocostunólida y su isómero en Δ^3 , en la raíz y partes aéreas de la planta (Jakupovic *et al.*, 1987).

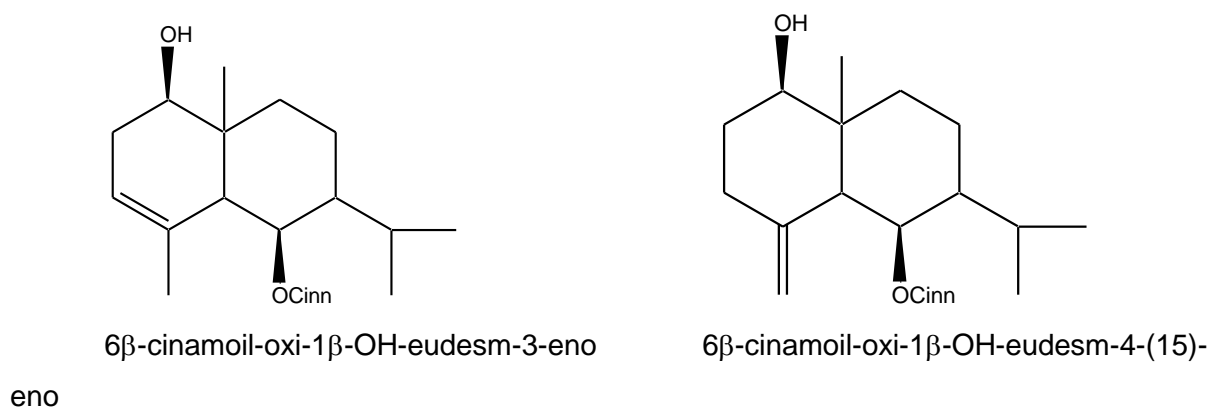


Fig. 10. Eudesmanos aislados de *Verbesina persicifolia*

En 2007 se realizó otro estudio fitoquímico de la especie, el cual mostró la presencia de estigmasterol y un sesquiterpeno de tipo eudesmano el 4 α - cinamoiloxi, 1 β ,3 α - dihidroxieudesm - 7,8 - eno (Fig. 11) (Mejía, 2007).

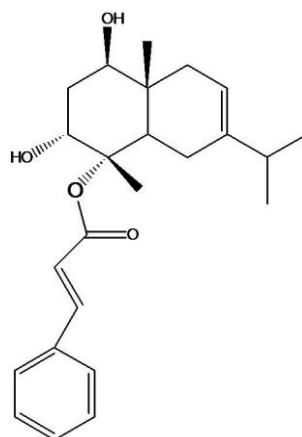


Fig. 11. 4 α - cinamoiloxi, 1 β ,3 α - dihidroxieudesm - 7,8 - eno.

I.I.V. Actividad biológica de sesquiterpenos de tipo eudesmano

La familia Asteraceae contiene entre 25 000 y 30 000 especies pertenecientes a más de 1 000 géneros. Esta familia es una rica fuente de sesquiterpenos naturales, especialmente aquellos de estructura eudesmano.

Los eudesmanoides se biosintetizan a partir del farnesil pirofosfato. Aproximadamente 1000 eudesmanoides naturales han sido identificados en la familia Asteraceae, los que presentan diversos patrones de oxigenación.

Los eudesmanos oxigenados son la principal clase de sesquiterpenoides en las especies de la familia Asteraceae e incluyen, alcoholes, ésteres, epóxidos, peróxidos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y lactonas. La presencia de estos grupos funcionales es importante en cuanto a su actividad biológica.

En particular, los sesquiterpenos ejercen una amplia variedad de efectos biológicos y farmacológicos, tales como: actividad citotóxica, antimicrobiana, antialimentaria sobre insectos y antitumoral, entre otras.

Esta diversa actividad biológica ha permitido el aislamiento y la caracterización de varios sesquiterpenos. Es así que durante las dos últimas décadas, los sesquiterpenoides de tipo eudesmano y las actividades biológicas de las especies de la familia Asteraceae de donde se han aislado, han sido la fuente de numerosos estudios fitoquímicos, farmacológicos y sintéticos.

Dentro de este grupo de sesquiterpenoides de tipo eudesmano las lactonas sesquiterpénicas, llamadas eudesmanólidas, han sido las sustancias más estudiadas por su marcada actividad biológica (Wu *et al.*, 2006).

Entre los eudesmanos que no tienen la función lactona se ha evaluado el efecto citotóxico del 1 β , 3 β -dihidroxi-4-cinamoiloxi-7-en-eudesmano (Fig. 12) aislado de *Verbesina perymenioides* sobre líneas de cáncer cultivadas de carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma nasofaríngeo resistente a vinblastina (KB-VI) y leucemia murina (P388) en donde después de realizar la curva de dosis-respuesta los valores de IC₅₀ fueron calculados como: >4 μ g/mL para la línea KB, >3.63 μ g/mL para la línea P388 y de >4 μ g/mL para la línea

KB-VI. Cabe señalar, que aunque los autores refieren la estructura de este compuesto como el 1 β , 3 β – dihidroxi – 4 – cinamoiloxi – 7 – en – eudesmano no proporcionan ninguna evidencia química o espectroscópica que avale esta asignación estructural (Villarreal *et al.*, 1994).

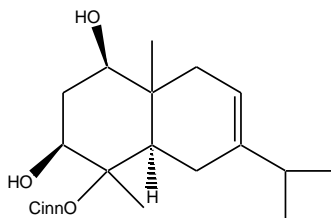


Fig. 12. 1 β , 3 β – dihidroxi – 4 – cinamoiloxi – 7 – en – eudesmano aislado de *V. perymenoides*.

Por otro lado, en 2007 se evaluó también la actividad citotóxica y antiinflamatoria del 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**), obtenido de *Verbesina persicifolia*. La actividad citotóxica se evaluó sobre líneas celulares de cáncer humano cultivadas de HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), K-562 (leucemia linfoblástica crónica), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata) y SKUL-1 (pulmón) en donde se obtuvieron los valores de IC₅₀ (Mejía, 2007) (Cuadro I).

Cuadro I. Concentración inhibidora 50 de 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno sobre líneas celulares de cáncer humano.

Muestra	Concentración Inhibitoria 50 (μ M)					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
1	57.1\pm1.95	29.7\pm0.83	35.5\pm3.38	53.1\pm4.42	28.6\pm2.60	52.29\pm2.34

Adicionalmente se evaluó la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA en el pabellón auricular de ratón, en el cual se obtuvo una DE₅₀ de 0.34 μ mol/oreja (Mejía, 2007).

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad genotóxica mediante la técnica de micronúcleos en sangre periférica de ratón del extracto acuoso de *V. persicifolia*, así como de 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**), principal metabolito activo obtenido de esta especie y del derivado semisintético obtenido a partir de **1**.

Objetivos particulares

- Aislar y purificar el sesquiterpeno 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**) a partir de extractos orgánicos de las partes aéreas de *V. persicifolia*.
- Realizar la modificación estructural de **1** mediante una reacción de hidrogenación..
- Obtener el extracto acuoso a partir de las partes aéreas de *V. persicifolia*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso y del derivado semisintético de **1**.
- Evaluar la actividad de inhibición de proliferación de células cancerosas del extracto acuoso y del derivado semisintético de **1**.
- Evaluar el potencial genotóxico del extracto acuoso de las partes aéreas de *V. persicifolia* mediante la técnica de micronúcleos.
- Evaluar el potencial genotóxico del compuesto **1** así como de su derivado mediante la técnica de micronúcleos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.I. CONDICIONES GENERALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones, y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27, en solución, empleando como disolvente CHCl_3 .

Los espectros de ultravioleta se obtuvieron del espectrofotómetro de UV-VIS Shimadzu U-160 empleando como disolvente metanol.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron en un espectrómetro Varian Inova 500 MHz, utilizando como disolvente CDCl_3 y como referencia interna TMS. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz. La multiplicidad de las señales se indica como sigue: (s) señal simple, (d) señal doble, (t) señal triple y (m) señal múltiple.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Jeol JMS – AX505 HA.

La determinación de la actividad óptica de los compuestos puros se realizó en un polarímetro Perkin-Elmer 343.

El análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo de líquidos HP Series 1100, en una columna Synergi MAX-RP 150x2.00mm 4 μm .

Se utilizaron técnicas cromatográficas convencionales para separar y aislar los compuestos. Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60/UV250, Alugram) y se revelaron con luz UV y/ó sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N. Para la separación y purificación por cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice G (Macherey-Nagel) en columnas de vidrio de diferentes capacidades de acuerdo a la cantidad de muestra a analizar.

III.II. MATERIAL VEGETAL

La parte aérea de *Verbesina persicifolia* se recolectó en los alrededores de los poblados Santiago Yancuictlalplan, Ixtinco y Xiloxochico, de la región de la Sierra Norte de Puebla. Un ejemplar de herbario se encuentra depositado en el Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México con número de registro MEXU 1204333. La especie fue identificada por el M. en C. Francisco Basurto.

El material vegetal se deshidrató a temperatura ambiente durante un periodo de 3 semanas.

III.III. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y AISLAMIENTO DE COMPUESTOS.

Los extractos de hexano y de acetato de etilo fueron obtenidos al tratar sucesivamente 2.1 kg de material seco y molido con dichos disolventes. Se utilizaron 4 litros de disolvente por cada extracción con una duración de 24 horas cada una, se realizaron en total cinco extracciones para cada disolvente. Por otro lado, 110.47 g de material vegetal seco y molido, obtenidos de una colecta diferente, se trataron con una mezcla de diclorometano/metanol.

III.III.I. Aislamiento del 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno a partir del extracto hexánico.

Se realizó una partición del extracto hexánico agregando metanol. Se precipitaron 16.05 gramos de material lipofílico, el cual se separó por filtración al vacío. A la fracción soluble en metanol se le eliminó el disolvente, por destilación a presión reducida y se obtuvieron 60.83 gramos de extracto hexánico soluble en metanol (EHM).

Se adsorbieron 49.73 g del EHM en 60 g de gel de sílice y se colocaron en la parte superior de una columna cromatográfica abierta, empacada con 250 g de gel de sílice y se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de hexano, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo y metanol (Cuadro I). Se obtuvieron 222 fracciones de 50 mL cada una.

Cuadro I. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna del extracto EHM.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-38	hex 100%
39-85	9:1 hex:AcOEt
86-111	8:2 hex:AcOEt
112-158	7:3 hex:AcOEt
159-191	6:4 hex:AcOEt
192-201	5:5 hex:AcOEt
202-215	100% AcOEt
216-222	100% MeOH

Las fracciones que presentaron similitud cromatográfica en capa fina se reunieron dando un total de 18, las que se marcaron como: R1 (6-24), R2 (25-41), R3 (42-45), R4 (46-52), R5 (53-56), R6 (56-60), R7 (61-70), R8 (71-87), R9 (88-99), R10 (100-115), R11 (116-127), R12 (128-145), R13 (146-158), R14 (159-190), R15 (191-203), R16 (204- 209), R17 (210-217), R18 (218-222).

Se adsorbieron 2.5 g de la fracción **R14** en 5.3 g de gel de sílice y se separó por cromatografía en columna, la cual se empacó con 14.7 g de gel de sílice. La elución se llevó a cabo con mezclas de polaridad ascendente de hexano, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo y metanol (Cuadro II).

Cuadro II. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna de la fracción R14.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1	100% hex
2-20	8:2 hex:AcOEt
21-24	7:3 hex:AcOEt
25-28	5:5 hex:AcOEt
29	100% MeOH

Se obtuvieron un total de 29 fracciones de 25 mL cada una, que al reunirse por su similitud cromatográfica en capa fina, generaron tres nuevas que se marcaron como: R1a(4-13), R2a(14-26), R3a(27-29).

La fracción **R1a** mostró una sola mancha en cromatografía de capa fina (CCF) que representaba un posible compuesto, que no tenían las otras dos fracciones. No obstante la observación en CCF, era evidente que esta fracción contenía pigmentos. Con el fin de eliminar los pigmentos, R1a se disolvió en acetato de etilo y se agregaron 2 g de carbón activado, se dejó reaccionar por un periodo de 2 minutos aproximadamente sin dejar de agitar el matraz con movimientos circulares y suaves. Para eliminar el carbón activado, en un embudo büchner, sobre un kitasato, se colocó papel filtro y se le agregó una capa de celita, se filtró la fracción y se agregó más acetato de etilo al carbón activado/celita para asegurar una buena recuperación de la muestra. El disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida.

Posteriormente 1.2456 g de la fracción **R1a** se soportaron en 1.5 g de gel de sílice, se colocaron en una columna cromatográfica abierta que se empacó con 14 g de gel de sílice. La columna se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de hexano, hexano/acetato de etilo, acetato de etilo y metanol (Cuadro III). Obteniéndose un total de 22 fracciones de 25 mL cada una.

Cuadro III. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna de la fracción R1a.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-2	100% hex
3-10	2:1 hex:AcOEt
11-16	1:1 hex:AcOEt
17-19	1:2 hex:AcOEt
20-21	100% AcOEt
22	100% MeOH

Las fracciones con similitud cromatográfica se agruparon, obteniéndose las siguientes fracciones: R1b(5-8), R2b(9-13), R3b(14-21). De la **R1b** (2:1 hex:AcOEt) se obtuvo un sólido de color blanco que se cristalizó con mezclas de hex/CH₂Cl₂ en una proporción aproximadamente de 4:1. La identificación de este sólido como el 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**) se logró por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos publicados para este metabolito secundario.

III.III.II. Aislamiento del 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (1**) a partir del extracto de acetato de etilo.**

Con el fin de eliminar pigmentos, 56.27 g del extracto de acetato de etilo se percolaron en una columna empacada con tonsil y se eluyó con diclorometano.

En total se obtuvieron 41.17 g de extracto el cual se adsorbió en 58 g de sílice y se colocaron en una columna de vidrio abierta empacada con 150 g de sílice y eluida con mezclas de disolvente de polaridad ascendente, se obtuvieron en total 200 fracciones de 250 mL cada una (Cuadro IV).

Cuadro IV. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna del extracto de acetato de etilo.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-16	100% hexano
17-41	hex:AcOEt 9:1
42-77	hex:AcOEt 8:2
78-93	hex:AcOEt 7:3
94-111	hex:AcOEt 6:4
112-160	hex:AcOEt 4:6
161-170	hex:AcOEt 3:7
171-175	hex:AcOEt 2:8
176-190	100% AcOEt
191-199	AcOEt:MeOH 1:1
200	100% MeOH

Las fracciones con similitud cromatográfica en capa fina (CCF) se agruparon, obteniéndose las siguientes fracciones: R1 (1-23), R2 (24-27), R3 (28-30), R4 (31-32), R5 (33-34), R6 (35-42), R7 (43-50), R8 (51-90), R9 (91-102), R10 (103-110), R11 (111-120), R12 (121-160) y R13 (161-170).

La fracción **R8** se disolvió en acetato de etilo y se adicionó carbón activado para eliminar los pigmentos, posteriormente se filtró sobre celita. La cromatografía en capa fina (CCF) de esta fracción mostró más de un compuesto, sin embargo el desplazamiento o factor de retención (fr) de una mancha coincidió con el del 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**).

Por otro lado, con el fin de obtener el compuesto **1** a partir de la fracción **R11**, ésta se sometió a un proceso de percolación en una columna empacada con gel de sílice. Se adsorbieron 2.76 g de **R11** en 3 g de sílice y se soportaron sobre 20 g de sílice.

Cuadro V. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la percolación de la fracción R11.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1	100%hex
2-3	2:1 hex:AcOEt
4-5	1:1 hex:AcOEt
6	1:2 hex:AcOEt
7	100%AcOEt
8	100%MeOH

El análisis de CCF demostró la presencia de **1** en la fracción **3** (Cuadro V), esta se trató con carbón activado para eliminar el exceso de pigmentos y posteriormente se adsorbieron 1.16 g de esta fracción en 1.5 g de sílice y se soportaron sobre 20 g de sílice, se obtuvieron 16 fracciones en total, de 25 mL c/u (Cuadro VI).

Cuadro VI. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la fracción 3.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-5	100% hex
6-13	2:1 hex:AcOEt
14-15	100% AcOEt
16	100% MeOH

Las fracciones se reunieron siguiendo su perfil cromatográfico como sigue: R1'a(1-8), R2'a(9-11) y R3'a(12-16). En la fracción R2'a se logró aislar **1**.

Adicionalmente, el análisis de CCF de la fracción **R12** demostró que también esta fracción contenía a **1**, por lo que se realizó una columna cromatográfica para aislarlo.

Se adsorbieron 8.26g de **R12** y se soportaron sobre 49.71g de sílice, se obtuvieron en total 133 fracciones, siendo cada una de 125 mL (Cuadro VII).

Cuadro VII. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la fracción R12.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-10	100% hexano
11-25	hex:AcOEt 9:1
26-61	hex:AcOEt 8:2
62-80	hex:AcOEt 7:3
81-90	hex:AcOEt 6:4
91-100	hex:AcOEt 4:6
101-111	hex:AcOEt 3:7
112-121	hex:AcOEt 2:8
122-131	100% AcOEt
132	AcOEt:MeOH 1:1
133	100% MeOH

Mediante el seguimiento por cromatografía en placa fina se agruparon las siguientes fracciones: R1a(1-17), R2a(18-21), R3a(22-25), R4a(26-27), R5a(28-30), R6a(31-35), R7a(36-40), R8a(41-60), R9a(61-64), R10a(65-70), R11a(71-80), R12a(81-84), R13a(85-90), R14a(91-93), R15a(94-101), R16a(102-110), R17a(112-120), R18a(121-125), R19a(126-133).

El análisis de la CCF demostró que **1** estaba en la mezcla de la fracción **R8a**. Con el fin de obtener **1**, se adsorbieron 811.5 mg de esta fracción en un gramo de sílice y se soportaron sobre 7 g de gel de sílice (Cuadro VIII).

Cuadro VIII. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la fracción R8a.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-2	100% hex
3-6	9:1 hex:AcOEt
7-11	2:1 hex:AcOEt
12-15	1:1 hex:AcOEt
16-18	1:2 hex:AcOEt
19	100% AcOEt

Las fracciones obtenidas de esta cromatografía se reunieron de acuerdo con su perfil cromatográfico en capa fina como sigue: R1b(1-6), R2b(7-8) y R3b(9-19). De la fracción **R2b** se logró obtener **1**.

Un análisis de CCF demostró la presencia de **1** en las fracciones **R8** y **R13**. Con el fin de aislar **1** a partir de dichas fracciones, estas se reunieron dando un total de 8.49 g, los que se adsorbieron en 8 g de gel de sílice y se soportaron sobre 18 g de gel de sílice. Se obtuvieron 85 fracciones de 50 mL cada una (Cuadro IX).

Cuadro IX. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la reunión de las fracciones R8 y R13.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-4	100% hex
5-20	9:1 hex:AcOEt
21-52	8:2 hex:AcOEt
53-63	7:3 hex:AcOEt
64-75	1:1 hex:AcOEt
76-84	100% AcOEt
85	100% MeOH

Las fracciones se reunieron, de acuerdo con su perfil cromatográfico en CCF, obteniéndose las siguientes reuniones: R1^a(1-5), R2^a(6-12), R3^a(13-15), R4^a(16-18), R5^a(19-20), R6^a(21-23), R7^a(24-42), R8^a(43-52), R9^a(53-63), R10^a(64-65), R11^a(66-75), R12^a(76-78) y R13^a(79-85).

Los resultados en la CCF indicaron que **1** estaba presente en la fracción **R7^a**, sin embargo, presentaba varias impurezas, por lo que se decidió someter esta fracción a un nuevo proceso de cromatografía. En 3 g de gel de sílice se adsorbieron 2.98 g de la fracción R7^a y se cromatografió en una columna abierta y empacada con 15 g de gel de sílice (Cuadro X).

Cuadro X. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la fracción R7^a.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-2	100% hex
3-15	9:1 hex:AcOEt
16-17	7:3 hex:AcOEt

Se reunieron las siguientes fracciones: R1^b(1-15) y R2^b(16-17). El compuesto se encontró en la **R2^b**, sin embargo debido a su impureza se tuvo que someter a una última cromatografía en columna.

Se colocaron 248.1 mg de la fracción sobre 1.6 g de sílice, se obtuvieron 9 fracciones de 25 mL c/u (Cuadro XI).

Cuadro XI. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas en la columna de la fracción R2^b.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1	100% hex
2-6	7:3 hex:AcOEt
7-8	100% AcOEt
9	100% MeOH

Se reunieron las fracciones como sigue: R1”c(1-2), R2”c(3-5) y R3”c(6-9). De la fracción **R2”c** se logró aislar **1**.

III.III.III. Aislamiento del 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno a partir del de extracto diclorometano-metanol

Se obtuvieron en total 44.4 g de extracto de diclorometano-metanol, los cuales se adsorbieron en 50 g de sílice. La cromatografía se realizó en una columna abierta empacada con 100 g de gel de sílice y eluida con mezclas de disolventes de polaridad creciente. Se obtuvieron un total de 115 fracciones de 50 mL c/u (Cuadro XII).

Cuadro XII. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna del extracto de diclorometano-metanol.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-10	100% hex
11-20	9:1 hex:AcOEt
21-50	8:2 hex:AcOEt
51-80	7:3 hex:AcOEt
81-100	1:1 hex:AcOEt
101-110	1:2 hex:AcOEt
111-115	100% AcOEt
115	100% MeOH

De acuerdo a su similitud cromatográfica en CCF se reunieron de la siguiente manera: R1(2-10), R2(11-44), R3(45-70), R4(71-80), R5(81-100), R6(101-110) y R7(111-115).

El eudesmano **1** precipitó en la fracción **R3**. El análisis de CCF reveló que las aguas madres de la fracción **R3** contenían **1**. Con la finalidad de aislar mayor cantidad de éste eudesmano, las aguas madres de **R3** se purificaron mediante una columna cromatográfica.

Se adsorbieron 1.82 g de dicha fracción en 2 g de sílice y se soportaron en 10 g de sílice. De esta manera se obtuvieron 17 fracciones (Cuadro XIII).

Cuadro XIII. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna de la fracción R3.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1-3	100% hex
4-8	8:2 hex:AcOEt
9-11	7:3 hex:AcOEt
12-14	1:1 hex:AcOEt
15-16	100% AcOEt
17	100% MeOH

Las fracciones se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica en CCF obteniéndose las siguientes reuniones: R1a(1-8), R2a(9-13), R3a(14-17).

En la fracción **R2a** se logró aislar **1** el cual se purificó mediante otra columna cromatográfica. Se adsorbieron 852.8 mg de R2a en 1 g de sílice y se empacó una columna abierta con 8 g de gel de sílice (Cuadro XIV).

Cuadro XIV. Mezclas de eluyentes para las fracciones obtenidas de la columna de la fracción R2a.

Fracción	Mezcla de eluyentes
1	100% hex
2-4	8:2 hex:AcOEt
5-7	7:3 hex:AcOEt
8	100% AcOEt
9	100% MeOH

Las fracciones se agruparon como sigue: R1b(1-2), R2b(3-5) y R3b(6-9). De la fracción **R2b** se logró aislar **1**.

III.III.IV. Obtención del compuesto 2

Se disolvieron 100 mg de **1** en 100 mL de acetato de etilo y se adicionaron 100 mg de óxido de platino (PtO₂). La reacción se colocó bajo una atmosfera de hidrógeno durante 24 horas en agitación constante. Posteriormente, la mezcla de reacción se filtró sobre celita al vacío y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida.

El compuesto **2** precipitó cuando la mezcla de reacción se trató con una mezcla de diclorometano-hexano.

III.III.V. Obtención del extracto acuoso

Se colocaron 20 g de material vegetal seco, en 180 mL de agua, el agua se calentó hasta punto de ebullición y posteriormente se le agregó el material el cual se dejó por un período de 10 minutos. Posteriormente la infusión fría se filtró, eliminándose el residuo vegetal y el filtrado se liofilizó.

III.III.VI. Análisis de CLAR

Con el propósito de cuantificar el compuesto **1** en el extracto acuoso se realizó una cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Para realizar la cromatografía líquida de alta resolución se empleó un cromatografo de líquidos HP Series 1100 con un detector de arreglo de diodos y una columna Synergi MAX-RP 150 x 2.0 mm 4µm. Con una proporción inicial de acetonitrilo (ACN):agua 1:1, cambiando esta proporción en un tiempo de 30 minutos a 8:2 ACN:agua con un flujo de 0.2 mL/min. A una longitud de onda del cromatograma de 277 nm.

III.IV. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

III.IV.I. Evaluación de la actividad de inhibición de proliferación de células cancerosas.

Para evaluar la inhibición de proliferación de células cancerosas de los compuestos, así como de los extractos obtenidos, se emplearon 6 líneas celulares humanas: HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), K-562 (leucemia linfoblástica crónica), U-251 (sistema nervioso central), PC-3 (próstata) y SKUL-1 (pulmón) provenientes del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos. La inhibición de proliferación de células cancerosas de los compuestos se determinó en microcultivos, midiendo la viabilidad y crecimiento celular indirectamente por el método de la sulforrodamina B, de acuerdo a los procedimientos validados por el NCI (Monks *et al.*, 1991). La metodología se describe a continuación.

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB) y glutamina 2.0 μ M. Las células se mantuvieron en incubación en un ambiente saturado de humedad en una atmósfera de 5% de CO₂ y a 37 °C. Posteriormente, las células que se adhirieron a los frascos de cultivo, se removieron suavemente con una solución de tripsina-EDTA al 0.05% utilizando una pipeta. La determinación de la densidad y de la viabilidad de las líneas celulares se llevó a cabo en un hematocitómetro, utilizando la técnica por exclusión con azul de tripano.

Después de que se contaron las células, se hizo una dilución para obtener la densidad adecuada. La suspensión celular se sembró en placas de 96 pozos. Todas las líneas celulares se incubaron por un periodo de 24 h a 37°C y fueron estabilizadas antes de adicionar los compuestos a probar.

Las muestras se evaluaron a una concentración de 50 μ M para el caso de compuestos puros y 50 μ g/mL para el caso de extractos, se solubilizaron en dimetil sulfóxido (DMSO), las disoluciones preparadas se depositaron en cada uno de los pozos y estos se incubaron durante 48 h a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad.

Posteriormente a la incubación, los cultivos celulares se fijaron *in situ* con 50 μ L de ácido tricloroacético (50% m/v) y se incubaron 1 hora a 4°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a desechar el sobrenadante y los cultivos se lavaron cinco veces con agua desionizada. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 100 μ L de solución de sulforrodamina B (0.4% p/v en ácido acético al 1%), después de 10 minutos el exceso se removió lavando cinco veces con ácido acético al 1%. Finalmente se obtuvo el botón de células y se solubilizó con amortiguador tris, para determinar su densidad óptica, la cual es inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto de prueba y proporcional al crecimiento celular. Esta última se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm (Lector de ELISA BIO-TEK, ELx 808).

El compuesto de referencia de actividad utilizado fue cisplatino (Monks *et al.*, 1991).

III.IV.II. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

La evaluación de la actividad antiinflamatoria, tanto del extracto acuoso como del compuesto **2**, como se aprecia en la figura 13, se realizó utilizando el método de inducción de edema por el acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Rao *et al.*, 1993; Paya *et al.*, 1996).

Se emplearon ratones macho de la cepa CD1 (25-30 g). Los animales (n=5) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12 h luz/oscuridad y con agua y alimento *ad libitum*. Previo a la administración del irritante y los compuestos de prueba, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (3.5 mg/kg, ip), posteriormente por ambos lados de la oreja derecha se aplicaron 10 μ L de una disolución etanólica de TPA (0.25 mg/mL).

Diez minutos después en la misma oreja se aplican 0.031, 0.1, 0.31 y 1 μ moles del compuesto **2** disueltos en 20 μ L del vehículo (metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etilo o mezcla de disolventes), para el caso del extracto acuoso se administraron 100 mg/kg de éste por vía ip debido a problemas de solubilidad. La oreja izquierda (testigo) recibió solamente 10 μ L de etanol y 20 μ L del vehículo del compuesto. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical para tomar una biopsia de 5 mm de diámetro de

ambas orejas. El incremento de peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representa el edema. La inhibición del edema (*IE*) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [(C-E)/C] 100$$

en donde **C** corresponde al edema del grupo testigo (tratado con TPA) y **E** corresponde al edema del grupo experimental (TPA + compuesto).

Los resultados obtenidos se analizaron mediante una prueba de t de Student y los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq (**)$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al testigo.

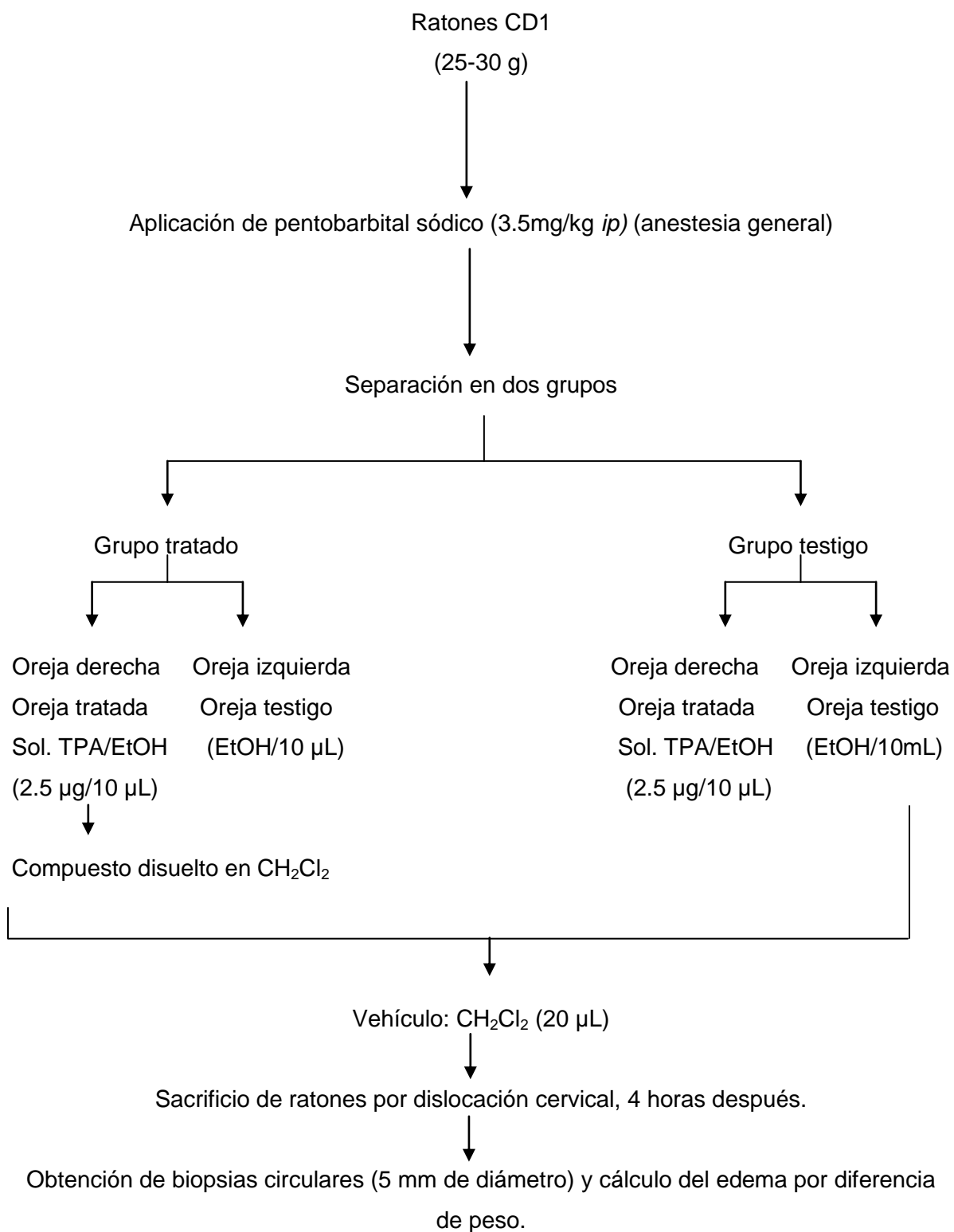


Fig. 13. Diagrama del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón.

III.IV.III. Evaluación de la actividad genotóxica

Para la parte de evaluación genotóxica se utilizaron 5 ratones machos de la cepa CD1 de dos meses de edad, con un peso de 20 – 25 g, por cada dosis utilizada, los cuales se trataron de acuerdo a las guías de uso de animales de laboratorio. Los ratones se mantuvieron en cajas de acrílico bajo condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa (40-60%) y fotoperiodo (12 h luz: 12 h oscuridad), agua y alimento *ad libitum*.

Previo a la administración de los compuestos a evaluar, se realizó un frotis sanguíneo, por corte de la porción terminal de la cola del ratón. Los compuestos se administraron vía intraperitoneal en dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg, utilizando como vehículo solución salina para el caso del extracto acuoso y tween 20 al 2% en solución salina para el caso de **1** y **2**, como testigo positivo se empleó ciclofosfamida (GENOXAL®) a una dosis de 40 mg/kg. Posterior a la administración se realizaron frotis por triplicado a las 24, 48 y 72 h.

Las laminillas se fijaron con metanol absoluto durante cinco minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se tiñieron con naranja de acridina a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante cinco minutos (Hayashi *et al.*, 1983). Posteriormente, se lavaron con amortiguador de fosfatos de Sørensen, a pH de 6.8, dos veces durante cinco minutos cada una con agitación constante.

Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia y se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC), lo que permitió evaluar la genotoxicidad.

Preparación del colorante

La solución estándar de naranja de acridina se preparó como una solución acuosa al 0.1% y se almacenó a 4 °C. La solución final de trabajo se preparó en una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador de fosfatos de Sørensen (1:8, naranja de acridina: amortiguador de fosfatos).

Preparación del amortiguador de fosfatos de Sörensen

Solución A: 9.08 g de KH_2PO_4 en 1000 mL de agua desionizada

Solucion B: 11.88 g de Na_2HPO_4 en 1000 mL de agua desionizada

IV. RESULTADOS

IV.I. Identificación del 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (1).

La identificación de **1** como 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (Fig. 14) se logró por la comparación de sus datos físicos y espectrales con aquellos informados en la literatura para este metabolito secundario (Mejía, 2007).

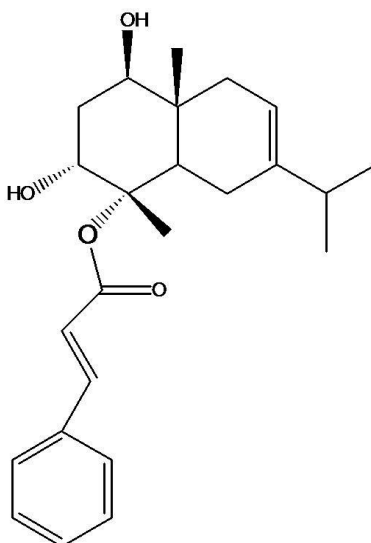


Fig. 14. 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno

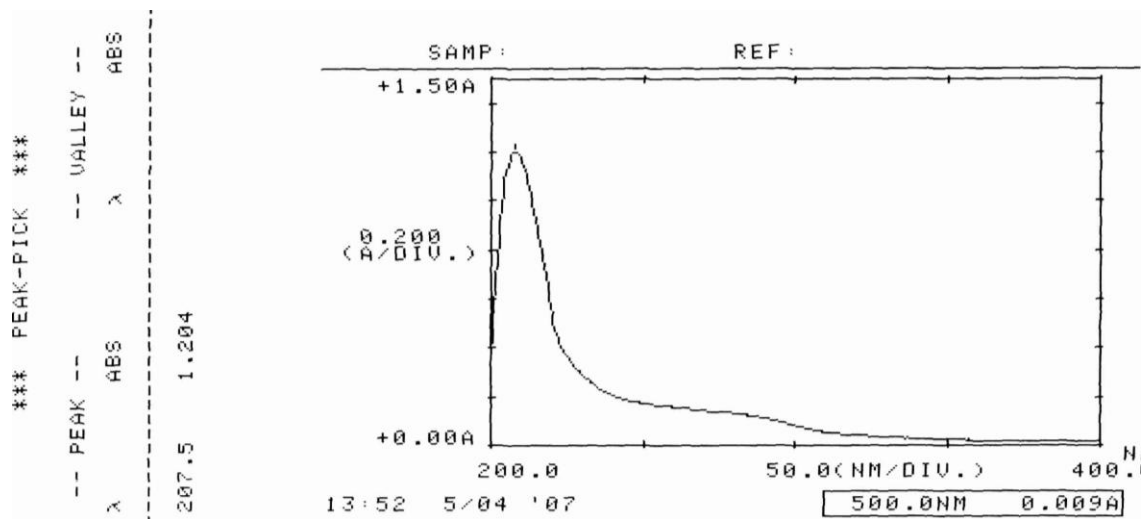
IV.II. Identificación del compuesto **2**

El producto de reacción de hidrogenación se obtuvo como un sólido blanco, con p.f.: 119-120°C, $[\alpha]_D$ -0.014 (CHCl_3 , c 2) y un factor de retención de 0.5 (4:6, hex:AcOEt). El rendimiento de la reacción fue del 85%.

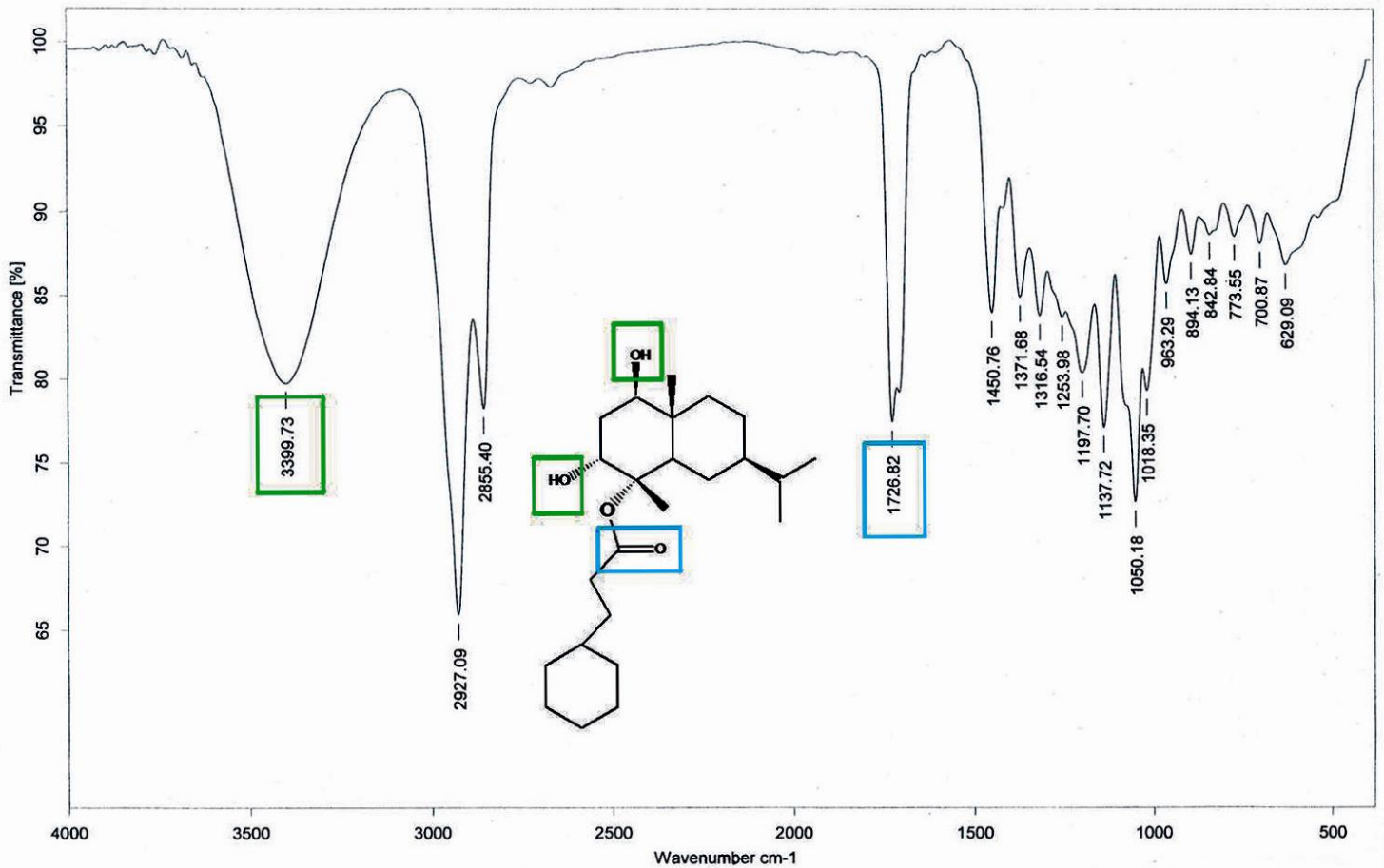
El producto de hidrogenación mostró los siguientes datos espectroscópicos.

U.V. (MeOH) λ máx: 207 nm ($\epsilon=765$) (Espectro 1).

I.R. (CHCl_3) ν máx cm^{-1} : 3399, 2927, 1726 (Espectro 2)

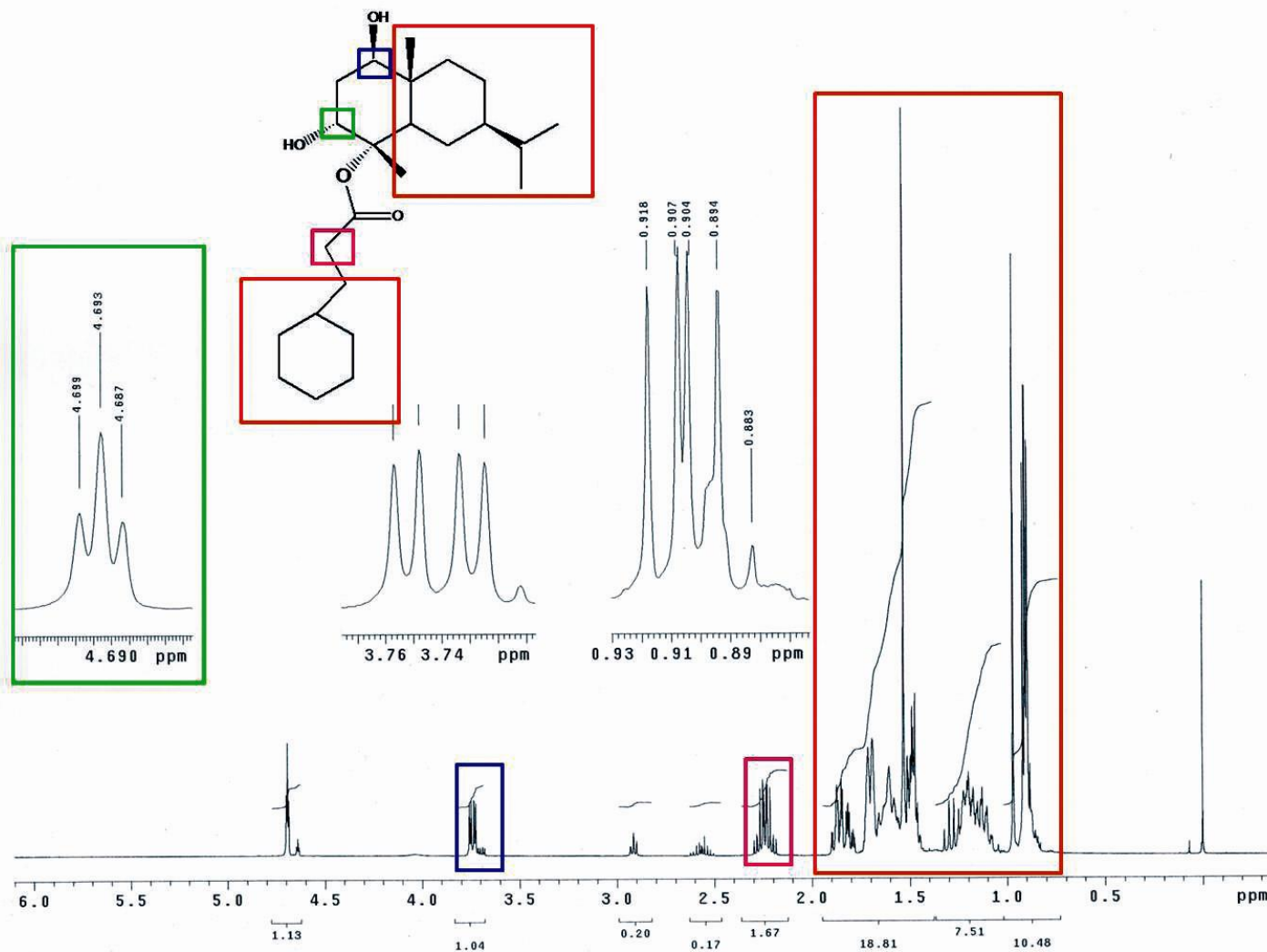


Espectro 1. Ultravioleta del compuesto 2



Espectro 2. Infrarrojo del compuesto 2

RMN ^1H (CDCl_3) 500 MHz, δ ppm: 4.69 (1H, t, $J=3.0$ Hz, H-3), 3.74 (1H, dd, $J=4.5$, 11.5 Hz, H-1), 2.24 (m, H-2'), 1.70 (m, H-11), 1.53 (3H, s, H-15), 0.97 (3H, s, H-14), 0.91 (3H, d, $J=4.5$ Hz, H-13), 0.90 (3H, d, $J=4.5$ Hz, H-12), 1.48 (m, H-3') (Espectro 3).

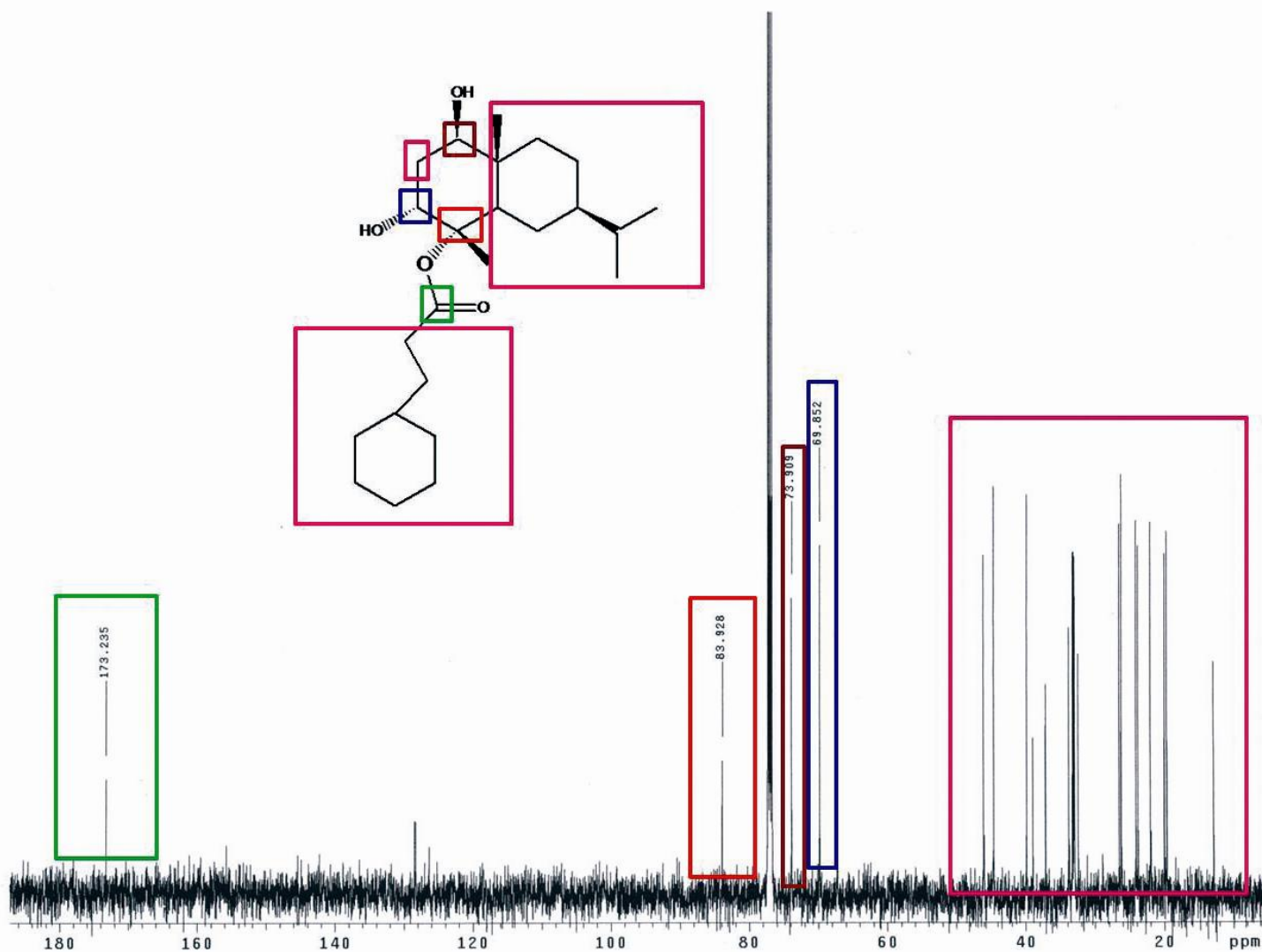


Espectro 3. Resonancia Magnética Nuclear Protónica a 500 MHz del compuesto 2.

RMN ^{13}C (CDCl_3) 125.7 MHz, δ ppm: 173.24 (s, C-1'), 83.93 (s, C-4), 73.89 (d, C-1), 69.83 (d, C-3), 46.06 (d, C-5), 44.60 (d, C-7), 39.99 (s, C-10), 39.85 (t, C-9), 37.16 (d, C-4'), 33.77 (t, C-2), 33.26 (t, C-2'), 33.10 (d, C-11), 33.03 (t, C3'), 34.44 (t, C5', C9'), 26.50 (t, C-7'), 26.23 (t, C-6', C8'), 24.09 (t, C-8), 22.01 (q, C-15), 20.00 (q, C-13), 19.65 (q, C-12), 12.87 (q, C-14) (Cuadro XV) (Espectro 4).

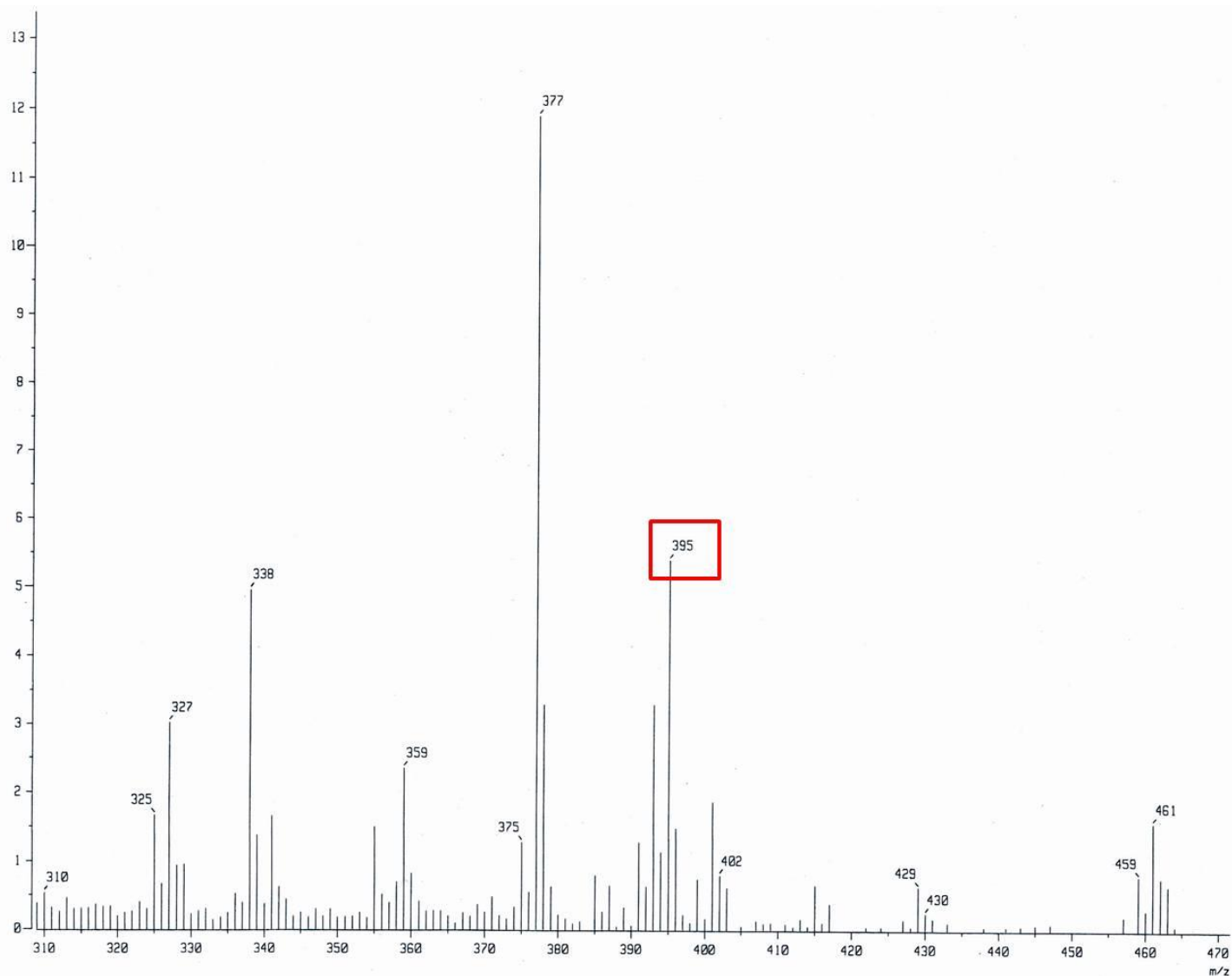
Cuadro XV. Desplazamientos químicos de RMN H y RMN C13 para el compuesto **2**.

No.	^1H (δ)	^{13}C (δ)	Tipo de C
1	3.74 dd (J=4.5, 11.5) 1 H	73.89	CH
2	1.84	33.77	CH ₂
3	4.69 t (J=3.0) 1H	69.83	CH
4		83.93	-C-
5		46.06	CH
6	1.60	23.78	CH ₂
7		44.60	CH
8		24.09	CH ₂
9		39.87	CH ₂
10		38.99	-C-
11	1.70 (m)	33.10	CH
12	0.90 (d, J=4.5) 3H	19.65	CH ₃
13	0.91 (d, J=4.5) 3H	20.00	CH ₃
14	0.97 (s) 3H	12.87	CH ₃
15	1.53 (s) 3H	22.01	CH ₃
1'		173.24	C=O
2'	2.24 (m)	33.26	CH ₂
3'	1.48 (m)	33.03	CH ₂
4'		37.16	CH
5' y 9'		32.44	CH ₂ (2)
6' y 8'		26.23	CH ₂ (2)
7'		26.50	CH ₂



Espectro 4. Resonancia Magnética Nuclear de C^{13} del compuesto 2.

HRMS: Observado 395.3168 para una fórmula $C_{24}H_{43}O_4$ (calculado 395.3161) (Espectro 5).



Espectro 5. Masas por bombardeo rápido del compuesto 2

HMBC

0.90/44.60, 0.91/44.60, 1.53/46.06, 1.84/38.99, 1.84/83.93, 3.7/33.77, 3.7/38.99, 3.7/39.87, 1.48/173.24, 1.48/32.44 (fig.15).

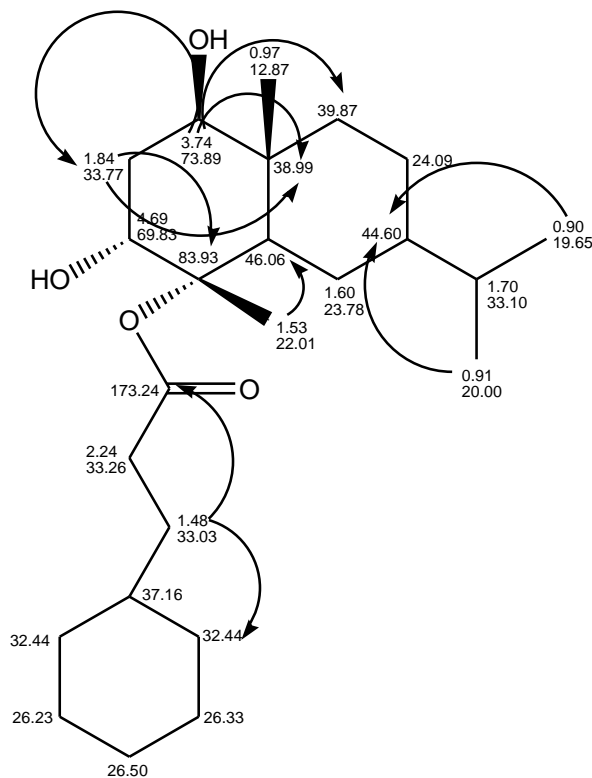


Fig. 15. Interacciones en HMBC más importantes del compuesto **2**.

El análisis de estos resultados permitió elucidar la estructura del compuesto **2** como el 4α -(2-fenil) etil- $1\beta,3\alpha$ -dihidroxiudesmano (fig. 16).

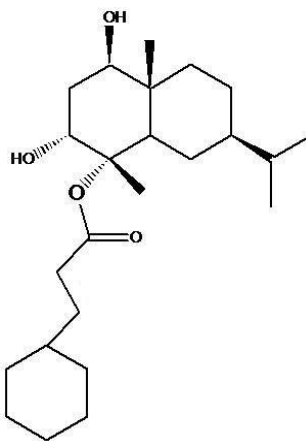


Fig.16. 4α -(2-fenil) etil- $1\beta,3\alpha$ -dihidroxiudesmano

IV.III. Análisis del extracto acuoso por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La presencia de compuesto 1 en el extracto acuoso de *V. persicifolia* se determinó mediante un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). En la figura 17 se observa el tiempo de retención para 1 (9.60 minutos), por otro lado, en la figura 18 se muestra el cromatograma del extracto acuoso en el cual se puede notar la presencia de 1 (tiempo de retención de 9.460 minutos), la cual fue comprobada por inyección simultánea de 1 y el extracto acuoso.

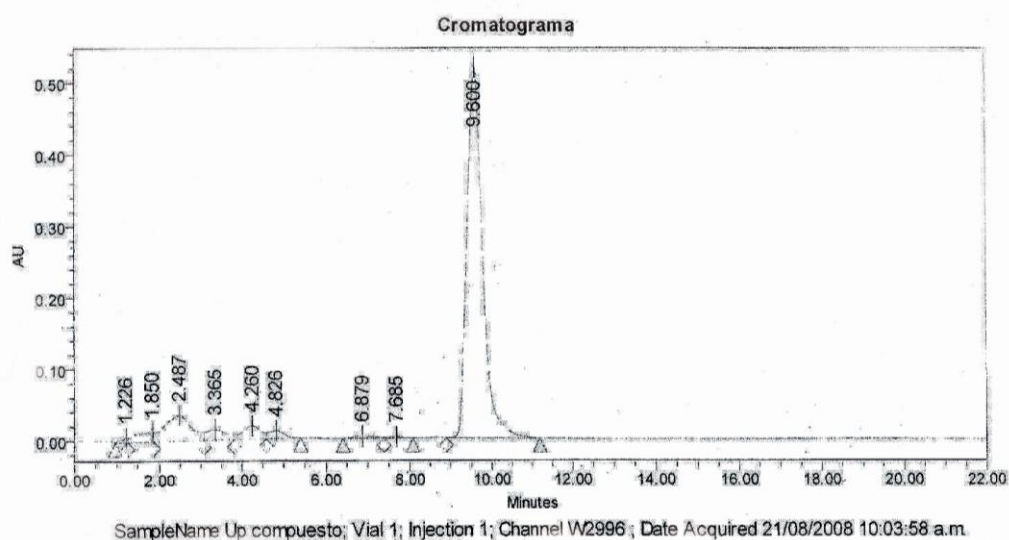


Fig. 17. Cromatograma del compuesto 1

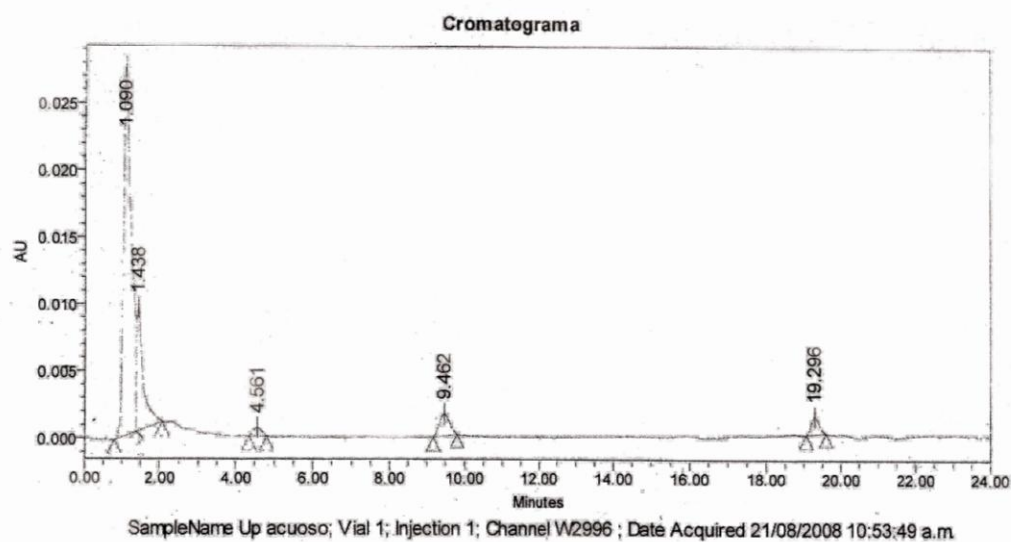


Fig. 18. Cromatograma del extracto acuoso

Con el fin de determinar la cantidad de **1** en el extracto acuoso, se obtuvo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de **1**.

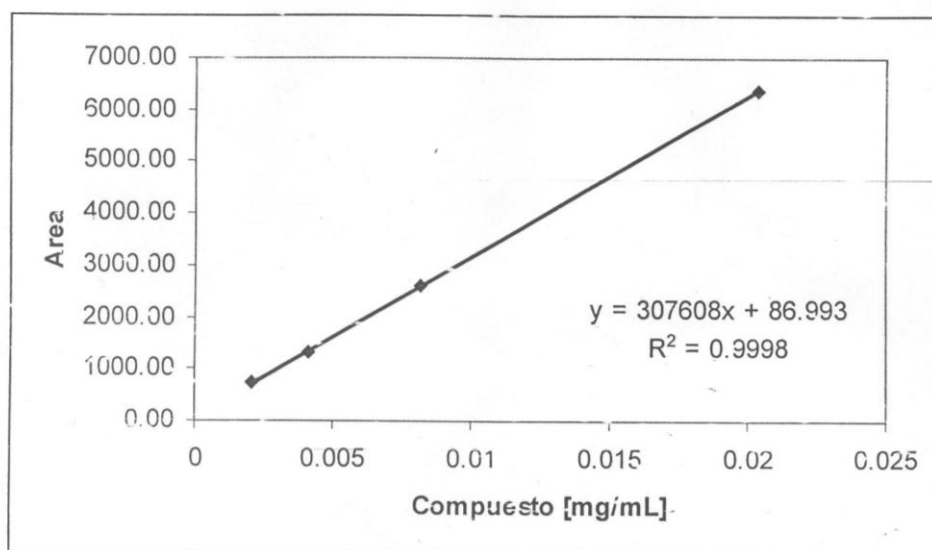


Fig. 19. Curva de calibración

Cuadro XVI. Cálculos obtenidos de **1** para la curva de calibración

Compuesto 1 mg/mL	Área	Área	Área	Promedio
0.0204	6328.75	6417.8	6361.5	6369.35
0.00816	2585.01	2583.59	2596.45	2588.35
0.00408	1304.9	1301.46	1305.14	1303.83
0.00204	741.59	754	767.27	754.29

El análisis, utilizando la curva de calibración de una alícuota del extracto acuoso indicó que **1** está en una relación de 1.35 mg por gramo de extracto acuoso.

Cuadro XVII. Cálculos obtenidos del extracto acuoso para la curva de calibración

Extracto acuoso mg/mL	Área	Área	Área	Promedio	1 [mg/mL]	*10 mL	Peso muestra g	mg de 1/g de extracto acuoso
2.02	909.5	1025.4	835.9	923.6	0.00271972	0.027197	0.0202	1.3464

IV.IV. RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

IV.IV.I. Actividad inhibidora de proliferación celular usando el ensayo de sulforrodamina B

Se evaluó la actividad inhibidora de proliferación celular del extracto acuoso y del 4 α -(2-fenil) etil- 1 β ,3 α -dihidroxiendesmano(**2**), sobre 6 líneas celulares de cáncer humano a una concentración de 50 μ g/mL. Los resultados se muestran en el cuadro XVIII.

Cuadro XVIII. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular a una concentración de 50 μ g/mL en DMSO.

Muestra	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Compuesto 2	100	100	100	100	100	100
Ext. acuoso	14.77	-	39.51	14.91	3.80	3.86

Como se observa, el compuesto semisintético **2** tuvo una actividad inhibidora del 100% sobre todas las líneas celulares ensayadas, mientras que para el extracto acuoso el porcentaje más alto de inhibición del crecimiento celular fue de 39.51% sobre la línea K562.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se decidió determinar la concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular (IC_{50}), expresada en μ M, del derivado **2**. Las líneas que mostraron una inhibición a una concentración más baja fueron K-562 y SKUL-1.

Cuadro XIX. Concentración inhibidora 50 (IC₅₀) del compuesto **2** y cisplatino en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

Línea celular	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM
	Compuesto 2	cisplatino
U251	15.63±1.3	9.09±0.88
PC-3	13.67±0.01	15.94±1.2
K-562	9.13±1.3	15.20±1.4
HCT-15	12.12±1.1	13.85±0.79
MCF-7	22.13±2.9	13.03±1.5
SKUL-1	5.79±0.32	7.13±0.25

IV.IV.II. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA

La actividad antiinflamatoria del extracto acuoso y del compuesto **2** en el modelo de edema inducido con TPA a una concentración de 1 μmol/oreja y 100 mg/kg *ip*, respectivamente, se presentan en el cuadro XX.

Cuadro XX. Porcentaje de inhibición del edema para el compuesto **2** y el extracto acuoso. Los datos (n=3-5) representan la media ± el error estándar de la media (x±eem). Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student, los valores de p ≤ 0.05 (*) y p ≤ 0.01 (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al testigo.

Muestra	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Testigo	-	17.28±0.35	
Compuesto 2	1 μmol/oreja	12.35±1.02*	28.51
Testigo	-	16.28±0.89	-
Extracto acuoso	100 mg/kg	15.5±0.24	4.42

En estos resultados se puede observar que tanto el compuesto **2** como el extracto acuoso mostraron una baja actividad antiinflamatoria, teniendo porcentajes de inhibición del edema de 28.51 y 4.42%, respectivamente.

IV.IV.III. Actividad genotóxica.

Se evaluó la actividad genotóxica del extracto acuoso, el 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno y el 4 α –(2-fenil) etil-1 β ,3 α –dihidroxieudesmano, en sangre periférica de ratones de la cepa CD-1 con el ensayo de micronúcleos.

El análisis de los promedios de las frecuencias de micronúcleos del extracto acuoso se muestra en cuadro XXI.

Cuadro XXI. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados intraperitonealmente con extracto acuoso (n=5). Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar. Los valores marcados con * indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
Extracto acuoso	250	0.8 \pm 0.37	1.8 \pm 0.20	0.8 \pm 0.37	1.00 \pm 0.44
	500	1.00 \pm 0.31	1.6 \pm 0.50	0.8 \pm 0.2	1.2 \pm 0.48
	1000	0.8 \pm 0.37	1.4 \pm 0.50	1.2 \pm 0.37	0.8 \pm 0.37
Ciclofosfamida	40	0.8 \pm 0.20	1.4 \pm 0.40	2.6 \pm 0.40*	1.2 \pm 0.48

La frecuencia de micronúcleos del 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno se muestran en el cuadro XXII.

Cuadro XXII. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratado con 4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (n=5). Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar. Los valores marcados con * indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo (p<0.05).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
4 α – cinamoiloxi, 1 β ,3 α – dihidroxieudesm – 7,8 – eno	250 (0.65 mM)	1.4 \pm 0.24	1.4 \pm 0.24	0.8 \pm 0.37	1.2 \pm 0.37
	500 (1.3 mM)	1.00 \pm 0.31	0.8 \pm 0.37	1.00 \pm 0.44	1.00 \pm 0.31
	1000 (2.6 mM)	0.8 \pm 0.20	1.2 \pm 0.20	1.00 \pm 0.31	1.2 \pm 0.37
Vehículo	Tween 20 al 2%	0.8 \pm 0.48	0.8 \pm 0.20	1.2 \pm 0.37	1.2 \pm 0.20
Ciclofosfamida	40 (0.14 mM)	0.8 \pm 0.20	1.4 \pm 0.40	2.6 \pm 0.40*	1.2 \pm 0.48

Por último en el cuadro XXIII se muestra la frecuencia de micronúcleos del compuesto semisintético obtenido por una reacción de hidrogenación, 4 α –(2-fenil) etil-1 β ,3 α – dihidroxieudesmano.

Cuadro XXIII. Frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) en 1000 eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón CD1 tratados con 4 α -(2-fenil) etil-1 β ,3 α -dihidroxiudesmano (n=5). Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar. Los valores marcados con * indican diferencias estadísticas significativas con respecto al testigo ($p < 0.05$).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo de muestreo (h)			
		0	24	48	72
4 α -(2-fenil) etil- 1 β ,3 α - dihidroxiudesmano	250 (0.63 mM)	0.8 \pm 0.20	1.2 \pm 0.37	1.6 \pm 0.40	1.4 \pm 0.40
	500 (1.26 mM)	1.00 \pm 0.31	1.00 \pm 0.44	1.4 \pm 0.24	1.2 \pm 0.20
	1000 (2.5 mM)	1.00 \pm 0.31	2.2 \pm 0.37	1.6 \pm 0.24	1.00 \pm 0.31
Vehículo	Tween 20 al 2%	1.2 \pm 0.37	1.2 \pm 0.20	1.00 \pm 0.31	0.8 \pm 0.20
Ciclofosfamida	40 (0.14 mM)	0.6 \pm 0.24	1.4 \pm 0.50	2.6 \pm 0.60*	2.2 \pm 0.37

El extracto acuoso, el 4 α - cinamoiloxi, 1 β ,3 α - dihidroxiudesm - 7,8 - eno (**1**) y el 4 α -(2-fenil) etil-1 β ,3 α -dihidroxiudesmano (**2**) no mostraron genotoxicidad en el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón bajo las condiciones de este ensayo.

DISCUSIÓN

Algunos estudios etnobotánicos indican que, especialmente en los estados de Veracruz, Tlaxcala y Puebla, *Verbesina persicifolia* se utiliza para tratar numerosos problemas de salud entre los que se pueden mencionar: la inflamación, el dolor, la diabetes y el cáncer, entre otros (Gallardo *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2001).

Este conocimiento tradicional ha sido apoyado por estudios previos. En 1996 Pérez-Gutierrez y colaboradores informaron sobre la actividad hipoglucemiante de extractos de cloroformo en ratas sanas y ratas hiperglicémicas inducidas con aloxan (Pérez-Gutierrez *et al.*, 1996). Adicionalmente en 2007 se dio a conocer la actividad antiinflamatoria y de inhibición de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer humano de un sesquiterpeno de tipo eudesmano identificado como el 4 α -cinamoiloxi,1 β ,3 α -dihidroxi eudesm-7,8-eno (**1**) aislado de ésta especie (Mejía, 2007).

No obstante que éstos estudios apoyan los usos etnobotánicos de esta especie, nada se conoce acerca de su potencial genotóxico. Tomando en cuenta lo anterior y con el fin de tener mayor conocimiento sobre la seguridad acerca del uso de esta especie se realizó un estudio de genotoxicidad de un extracto acuoso.

Adicionalmente y con la finalidad de sustentar el uso tradicional de esta especie, se muestran los resultados de la actividad de inhibición de proliferación celular sobre líneas celulares de cánceres humanos y antiinflamatoria del extracto acuoso.

Las evaluaciones de la actividad antiinflamatoria se realizaron en el modelo de edema inducido por el 13 acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en el pabellón auricular del ratón. De acuerdo con Carlson y colaboradores, la máxima eficiencia antiinflamatoria, en este modelo, se logra cuando los compuestos de prueba son administrados vía tópica, debido a que de esta forma las concentraciones más altas de fármaco pueden ser alcanzadas (Carlson *et al.*, 1985). Sin embargo, la pobre solubilidad del extracto en el disolvente utilizado como vehículo no permitió su administración tópica. Con el fin de probar otras vías de administración, en el Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, se han probado fármacos antiinflamatorios a través de una administración intraperitoneal en donde se ha observado que hay una inhibición del edema. Por ejemplo, la administración intraperitoneal de 10 mg/kg de indometacina produjo un 46.77 % de inhibición del edema.

De esta forma, la administración intraperitoneal de 100 mg/kg de un extracto acuoso, en el modelo de edema producido por TPA, solo mostró un porcentaje de inhibición del edema de 4.42%. Este resultado no apoya el uso popular de esta especie para tratar la inflamación, posiblemente debido a la baja concentración de **1** en el extracto.

Para la evaluación de actividad de inhibición de proliferación de células cancerosas se utilizó el método de sulforrodamina B, la cantidad incorporada por las células en el cultivo de dicho colorante indicó el grado de proliferación celular (Skehan *et al.*, 1990). El resultado de la actividad de inhibición de proliferación celular de un extracto acuoso solo mostró un 39 % de inhibición en la línea de leucemia linfoblástica crónica (K 562). Para las demás líneas ensayadas se observó un porcentaje de inhibición que se encontraba entre el 3.8-14.9% de inhibición, lo que estaría indicando que el extracto posee una ligera selectividad sobre la línea K 562.

Tanto los resultados del ensayo de edema inducido por TPA como los de inhibición de la proliferación celular por el método de sulforrodamina B, aunado a las características lipofílicas de **1**, podrían suponer que este compuesto estuviese ausente del extracto acuoso. Sin embargo en un análisis, realizado por cromatografía de alta resolución (CLAR) demostró que 1.35 mg del compuesto **1** está presente por cada gramo de extracto. Como se mencionó anteriormente, posiblemente la concentración de **1** en el extracto acuoso no es la suficiente para que este extracto muestre propiedades antiinflamatorias o de inhibición de la proliferación celular.

Por otro lado, establecer una relación de estructura – actividad es de suma importancia ya que los resultados de estos estudios ayudarían a conocer los sitios de acción de los compuestos de prueba y eventualmente obtener derivados con mayor eficacia pero menor toxicidad. Por ejemplo, en el caso de los derivados semisintéticos de los alcaloides de la vinca estos se administran en menores dosis que los compuestos originales ya que resultaron con mayor actividad. Otro ejemplo lo constituye la camptotecina que a pesar de su prometedora actividad preclínica y clínica antitumoral, resultó ser muy tóxico para su uso en la clínica. Tras varios años de intensa investigación, en 1996 se lograron obtener derivados menos tóxicos, los cuales se encuentran actualmente en la clínica (Nobili *et al.*, 2009).

Esta relación también se ha observado en algunos terpenos, como es el caso de las argentatinas aisladas de *Parthenium argentatum* Gray, el ejemplo más claro es la argentatina B, cuya modificación estructural ha ofrecido un sinúmero de derivados, de los cuales uno de ellos ha destacado por ser de 35-50 veces más potente que el

compuesto inicial en la inhibición del crecimiento de células cancerosas por el método de la sulforrodamina B (Parra *et al.*, 2006).

Siguiendo este orden de ideas se decidió realizar la hidrogenación catalítica de **1** con óxido de platino (PtO₂) con la finalidad de obtener el derivado tetrahidrogenado en las posiciones 7, 8, 2' y 3'.

Contrario a lo que se esperaba el producto de la reacción mostró la reducción no solo de las posiciones 7, 8, 2', y 3' sino que también se hidrogenó el anillo aromático del éster cinamoilo. La identidad del producto de reacción como el 4 α -(2-fenil) etil-1 β ,3 α -dihidroieudesmano (**2**) se comprobó mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

La hidrogenación del anillo aromático en condiciones suaves es sumamente raro, debido a que a diferencia de los alquenos comunes, los compuestos aromáticos, generalmente se reducen bajo condiciones extremas tales como varios cientos de atmósferas de hidrógeno, la presencia de un reactor y un rango de temperatura que va de los 80-200°C (Nagaveni *et al.*, 2003).

No obstante lo anterior las condiciones de hidrogenación de **1** se llevaron a cabo bajo condiciones de una atmosfera de presión y temperatura ambiente, obteniéndose un compuesto perhidrogenado.

La comparación de los resultados de actividad de inhibición de la proliferación de células cancerosas de **1** y **2** mostró que este último fue 3.88 veces más activo que **1** en la línea K-562 y 9.03 veces sobre la línea SKLU-1. Estos resultados indican que la ausencia de instauraciones dentro de la molécula es importante para la actividad biológica. Sin embargo, los resultados de la actividad antiinflamatoria fueron inversos a los observados en las líneas celulares ya que **1** mostró un porcentaje de inhibición del edema inducido por TPA de 83.18% a una dosis de 1 μ mol/oreja, mientras que **2** tuvo un porcentaje de inhibición de 28.51% a la misma dosis.

Este resultado es un poco sorprendente ya que el mayor carácter lipofílico de **2** comparado con **1**, supondría que **2** presentase mayor biodisponibilidad.

La evaluación genotóxica tanto de extractos de plantas medicinales así como de metabolitos secundarios activos y sus derivados es importante para tener un mayor conocimiento de su toxicidad.

Para la evaluación de genotoxicidad, se llevó a cabo el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón, la frecuencia elevada de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) fue tomada en cuenta como un indicador de genotoxicidad.

Los resultados del ensayo de genotoxicidad de un extracto acuoso, de **1** y **2**, indicaron que no hubo incremento estadísticamente significativo en la frecuencia promedio de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) comparada con la frecuencia basal (t=0), en ninguno de los tiempos y dosis evaluados.

Por otro lado, el testigo positivo (ciclofosfamida) indujo incremento estadísticamente significativo en el número de EPCMN con respecto a la frecuencia basal a las 48 h como lo informan Salamone *et al.* (1980).

La frecuencia basal de la cepa utilizada en este ensayo se mantuvo de acuerdo a lo discutido en la literatura (Salamone y Mavournin, 1994).

Estos resultados demuestran que el extracto acuoso, **1** y **2** carecen de actividad genotóxica.

En este caso aunque hubo modificación estructural no se observó ni en el caso del compuesto original ni en el derivado semisintético aumento significativo en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados contrario a lo que pasa en el caso de los alcaloides de la vinca ya que se ha observado que la vinorelbina, un derivado semisintético de la vinblastina, ha mostrado mayor genotoxicidad, por lo que también las modificaciones estructurales pueden modular el potencial genotóxico (Tiburi *et al.*, 2002)

En la presente investigación se aisló el 4 α -cinamoiloxi-1 β ,3 α - dihidroxieudesm-7,8 – eno (**1**) un compuesto con actividad antiinflamatoria e inhibidora del crecimiento en células cancerosas, mediante una reacción de hidrogenación se logró obtener el 4 α -(2-fenil)-etil-1 β ,3 α -dihidroxieudesmano (**2**), compuesto con mayor actividad de inhibición de proliferación de células cancerosas que **1**. Ambos compuestos no fueron genotóxicos en el modelo de micronúcleos en sangre de ratón.

Todos estos resultados indican que **1** es un buen punto de partida para realizar modificaciones estructurales, aunque, se ha visto que los patrones de oxigenación en este tipo de compuestos son determinantes para la actividad biológica (Wu *et al.*, 2006), en este trabajo se demuestra que las insaturaciones pueden ser también relevantes para la determinación de dicha actividad. Por lo que en un futuro podrían

realizarse más modificaciones estructurales con base en los grupos funcionales presentes en la molécula de tal manera que se pueda observar una posible selectividad y mayor actividad o viceversa.

Este compuesto junto con su derivado hidrogenado pueden ser potenciales candidatos para su evaluación en estudios clínicos.

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados se puede concluir que:

El compuesto mayoritario de *Verbesina persicifolia*, el 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno (**1**) se encuentra presente en el extracto acuoso en una relación de 1.35 mg por cada gramo de extracto acuoso, tomando en cuenta lo anterior, la persona estaría consumiendo aproximadamente 3 mg de **1** por cada taza de té.

El derivado semisintético obtenido a partir de **1**, el 4α -(2-fenil) etil- $1\beta,3\alpha$ -dihidroxieudesmano (**2**) resultó ser 3.88 veces más activo que **1** en la línea K- 562 y 9.03 veces sobre la línea SKLU-1 en el ensayo de inhibición de la proliferación celular de células cancerosas mediante el método de la sulforrodamida B, mostrando una relación de estructura actividad, que en un inicio pueden dar la pauta para seguir realizando modificaciones estructurales con la finalidad de obtener derivados más activos y selectivos de **1**.

El extracto acuoso, el 4α – cinamoiloxi, $1\beta,3\alpha$ – dihidroxieudesm – 7,8 – eno y el 4α -(2-fenil) etil- $1\beta,3\alpha$ -dihidroxieudesmano no mostraron actividad genotóxica en el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., Lee, F. 1973. Carcinogens are mutagens: A simple test systems combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **70**, 2281.

Bohlmann, F., Grenz, M., Gupta, K. R., Dhar, K. A., Ahmed, M., King, M. R., Robinson, H., 1980. Eudesmane derivatives from *Verbesina* species. *Phytochemistry*. **19**, 2391-2397.

Bohlmann, F., Zdero, C., Robinson, H., King, M. R., 1982. Two new eudesmane cinnamates from *Verbesina sordescens*. *Phytochemistry*. **21**, 1663-1664

Cherdshewasart W., Sutjit W., Pulcharoen K., Pariansaen R. y Chulasiri M. 2008. Antimutagenic potential of the Thai herb, *Mucuna collettii* Lace. *Journal of Ethnopharmacology*. **115**, 96-103.

Cronquist, A, 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University. New York. pp. 1021-1028.

Ding, A. H., Porteu, F., Sanchez, E., Nathan, C. F. 1990. Shared actions of endoxin and Taxol on TNF receptors and TNF release. *Science*. **248**, 370-372.

Dorr, R. T. 1997. Pharmacology of the taxanes. *Pharmacotherapy*. **17**, 96s-104s.

Ferguson R. L. & Pearson E. A. 1996. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutation Research*. **355**, 1-12.

Gallardo, V. M. *et al.*, 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México. pág. 832.

Garcia-Carbonero and Supko, J. G. 2002. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*. **8**, 641-661.

Grawé J. 2005. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. En *Molecular toxicology protocols*. Keohavong P. y Grant G. S. Humana Press. New Jersey. **291**, 69-83.

Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate Jr. 1983. An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*. **120**, 241-247.

Heddle, J. A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*. **18**, 187.

Heddle, J.A. and Bruce, W.R. 1977. Comparison of test for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei and mutations in *Salmonella*. Cold Spring Harbor conferences on Cell Proliferation, Cold Spring Harbor, NY. 1549-1557.

Hermine, T., Jones, J. J., y Parry, M. J. 1997. Comparative induction of micronuclei in repair-deficient and proficient Chinese hamster cell lines following clstogen or aneugen exposures. *Mutation Research*. **392**, 151-163.

Jakupovic, J., Ellmauerer, E., Jia, Y. Bohlmann, F., Dominguez, X. A., Hirschmann, S. G., 1987. Further eudesmane derivatives from *Verbesina* species. *Planta Medica*. **53**, 39-42.

Jenssen D. 1982. The induction of micronuclei. En *Sister chromatid exchange*. Sandberg A. A., New York. **2**, 47-63

Krishna , G. and Hayashi, M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. **455**, 155-166.

Maier P. & Schmid W. 1976. Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research*. **40**, 325-338.

Martínez, M., De Vivar, R. A., Ortega, A., Quintero, M. L., García, C., Fronczek, R. F., 1983. Eudesmane triols from *Verbesina virgata*. *Phytochemistry*. **22**, 979-982.

Martínez, A. M. et al., 2001. *Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla*. Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM. México.

Martínez V. M. y Parra D. H. Natural products as potential anti-cancer agents. En: *Advances in Cancer Research at UNAM*. Jaime Mas-Oliva, Jesus Ninomiya-Alarcon y Aljandro Carcia-Carranca (Edts) PUIS, UNAM and El Manual Moderno, 93-104, 2007.

Mejía F. M., 2007. Aislamiento de un nuevo eudesmano citotóxico de las partes aéreas de *Verbesina persicifolia* DC. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Mittal R., Patil P.A., Torgal S.S. 2009. Screening of codeine, dextromethorphan & dextropropoxyphene for their genotoxicity in swiss albino mice. *Indian J Med Res.* **129**, 676-680.

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, P., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Capbell, H., Maya, J., Boyd, M., 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a Diverse Panel of Cultured Human Cell Lines. *Journal of the National Cancer Inst.*, **38** (11), 757-766.

Mueller, D., Arni, P., Fritz; H., Langauer, M., Strasser, F. 1978. Comparative studies of 14 mutagenic or carcinogenic substances in seven mutagenicity test systems (point mutation test, cytogenetic test and the dominant lethal test). *Mutation Research.* 53, 235.

Nagaveni, K., Sivalingam, G., Gayen, A., Madras, G. & Hegde, M. S. 2003. Gas-phase hydrogenation of benzene to ciclohexane over combustion-synthesized $Ce_{1-x}Pt_xO_{2-\delta}$ ($x=0.001,0.002$). *Catalysis Letters.* **88**, 1-2, 73-81.

Nash, D.L., 1976. Tribe V, Heliantheae. En Nash, D.L. & Williams, L.O. (Eds), Flora of Guatemala – Part XII. Fieldiana, Botany. **24** (12) 181--361, 503—570

Ngan, V. K., Bellman, K., Hill, B. T., Wilson, L., Jordan, M. A. 2001. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Molecular Pharmacology*. **60**, 225-232.

Nobili S., Lippi D., Witort E., Donnini M., Bausi L., Mini E. y Capaccioli S. 2009. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*. **59**, 365-378.

Paya, M., Ferrándiz, M. L., Erradi, F., Trencio, M.C., Kijoa, A., Pinto, M. & Alcaraz, M. J., 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. *European Journal of Pharmacology*. **312**, 97-105.

Popoca J., Aguilar A., Alonso D. y Villarreal M. L. 1998. Cytotoxicity activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **59**, 173-177.

Rao, T. S., Currie, J.L., Shaffer, A. F. & Isakson, P., 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) – and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) – induced dermal inflammation. *Inflammation*. **10**, 723-741.

Rowinsky, E. K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual Review of Medicine*. **48**, 353-374.

Salamone M., Hedle J., Stuart E. y Katz M. 1980. Towards an improved micronucleus test: Studies on 3 model agents, mitomycin C, ciclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutation Research*. **74**, 347-356.

Salamone, M. F. & Marvournin, K.H. 1994. Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies.

Environmental and Molecular Mutagenesis **23**, 239-273.

Shahrim Z., Baharuddin P. J. N. M., Yahya N. A., Muhammad H., Bakar R. A., Ismail Z.

2006. The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah (*Labisia pumila*) extract.

Tropical Biomedicine. **23**(2), 214-219.

Song, J. I. and Dumais, M. R. 1991. From yew to us: the curious development of taxol.

JAMA. **266**, 1281.

Tiburi M., Reguly M., Schwartzmann G., Cunha S. K., Lehmann M. y Rodrigues de Andrade H. H. 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. **519**, 141-149.

Tinwell H. y Ashby H J. 1994. Genetic toxicity and potential carcinogenicity of taxol.

Carcinogenesis. **15**(8), 1499-1501.

Villarreal, M. L., Alvarez, L., Alonso, D., Navarro, V., García, P., Delgado G., 1994.

Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species.

Journal of Ethnopharmacology. **42**, 25-29.

Volders K. M. & Parry M. E. 1996. Genetic toxicology of mitotic spindle inhibitors used as anticancer drugs. *Mutation Research*. **355**, 103-128.

Wu X. Q., Shi P. Y. y Jia J. Z. 2006. Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural Product Reports*. **23**, 699-734.

Xu W. H., Liang Q., Liang Z. S. y Li X. C. 2010. Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. *Chinese Chemical Letters*. **21**, 693-695.