

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

CONSTITUYENTES DE LOS PROPÓLEOS SONORENSES
Y SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA CONTRA LÍNEAS
CELULARES TRANSFORMADAS

POR:

RAMÓN EFRAÍN LUGO SEPÚLVEDA

TESIS APROBADA POR LA
DIRECCIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA.

C.I.A.D, A.C.
RECIBIDO
09 ENE. 2004
9630
BIBLIOTECA
DICIEMBRE DE 2003

Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.

CONSTITUYENTES DE LOS PROPÓLEOS SONORENSES
Y SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA CONTRA LÍNEAS
CELULARES TRANSFORMADAS


POR


RAMÓN EFRAÍN LUGO SEPÚLVEDA

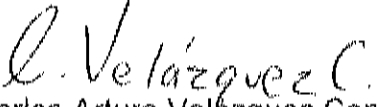
TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designados para evaluar la Tesis de Ramón Efraín Lugo Sepúlveda, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.


Dr. Javier Hernández Martínez
Presidente


Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia
Secretario



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Primer Vocal


Dr. Waldo M. Argüelles Monal
Segundo Vocal

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar crédito a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.


Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General.

El presente trabajo se realizó en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., bajo la dirección de los Doctores: Javier Hernández Martínez y Carlos Arturo Velázquez Contreras; con apoyo parcial de Fundación Produce Sonora A.C. (Ref. 906433289), UAGLAES. Se recibió apoyo económico del programa PROMEP y una beca crédito de CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A ÉL que me dio entendimiento y me rodeó de tanta gente buena.

Al CIAD y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico y material brindado.

A la Universidad de Sonora, institución que me honro en servir.

Al Programa Promep por su valioso apoyo.

A la fundación Sonora Produce, A.C. y a la UAGLAES.

A mi Director de tesis Dr. Javier Hernández Martínez por su inapreciable ayuda.

A mis asesores, Dr. Francisco M. Goycoolea V., Waldo M. Argüelles M. por su valiosa contribución al trabajo, en especial al Dr. Carlos A. Velásquez C. por su invaluable trabajo y apoyo.

A p.Q.B. Marco Antonio Castañeda, por su titánico labor al evaluar cada una de las fracciones.

Al M en C. Jaime Lizardi M. por su ayuda con los espectros IR.

Al Sr. Gilberto Valenzuela. Apicultor.

A M en C. Hisila Santacruz O., por los espectros de RMN ^1H a 400 MHz.

Al Dr. Neil Jacobsen por los espectros de ^1H y ^{13}C a 600 y 150 MHz , 2D, COSY, HMBC y HSQC.

Al Dr. Humberto Aztiazarán.

Dra. Bárbara Gordillo por los espectros de masas.

A M en C. María Burboa por su ayuda con la HPLC.

A todo el personal del CIAD.

A mis compañeros de Generación.

A mis amigos del Lab. De Biopolímeros: DIRO, Raúl, Josué, Yolanda, y Karla.

DEDICATORIA

A la memoria de Ramón y Sofía mis progenitores. (QPD)

Dedicada también a la memoria de Manuel. (QPD)

A Eusebio Margarita y Alessio.

Mis cuñadas, sobrinos y sobrinas.

En especial para mis hijas e hijos:

Paul E., Cinthya E., Omar E., y Marcela E.

Y muy en especial para quien estuvo animándome siempre, para mi MOIETY

FABIOLA. (¡Con todo mi amor!).

Did you ever know that you're my hero
And everything I would like to be
I can fly higher than an eagle
'Cause you are the wind beneath my wings.

Bette Midler

In My Life

There are places I'll remember
All my life though some have changed
Some forever not for better
Some have gone and some remain
All these places have their moments
With lovers and friends I still can recall
Some are dead and some are living
In my life I've loved them all

Lennon/McCarney

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tipos de Propóleos	1
1.2 Cáncer	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Actividad Antiproliferativa de Propóleos	10
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo General	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4. PARTE EXPERIMENTAL	15
4.1 Material Biológico	15
4.2 Extracto Metanólico (EM)	16
4.3 Partición del Extracto Metanólico (EM)	16
4.4 Actividad Antiproliferativa (AAP)	17
4.5 Purificación	18
4.5.1 Cromatografía en Columna.	18
4.6 Identificación de Compuestos Aislados	18

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1 Purificación y Actividad antiproliferativa	21
5.2 Caracterización Espectroscópica	33
5.2.1 Pinocebrina (1)	33
5.2.2 3-O-Ac-pinobanksina (2)	45
5.2.3 Crisina (3)	59
6. CONCLUSIONES	62
7. BIBLIOGRAFÍA	63
8. APÉNDICE	67
8.1 Efecto sobre la morfología de microcultivos de Células M12.A ^K . Fotografías en contraste de fases: A células control (20X) B células incubadas 24 h con extracto metanólico de propóleos (40X). N Células normales adheridas a la caja de cultivo, n Células normales en suspensión. D Células con morfología alterada sin núcleos definidos.	67
8.2 Actividad Antiproliferativa de Crisina comercial y Crisina aislada	68
8.3 Espectro de correlación COSY del compuesto <u>1</u>	69
8.4 Espectro de RMN ¹³ C del Compuesto <u>1</u> en Acetona-d ₆ , 150 MHz	70
8.5 Espectro de Correlación HSQC del Compuesto <u>1</u>	71
8.6 Espectro de Correlación HMBC del Compuesto <u>2</u>	72
8.7 Cromatograma HPLC del Compuesto <u>3</u>	73

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Compuestos aislados de propóleos de álamos y abedules.	2
2. Compuestos aislados de propóleos de regiones templadas.	3
3. Compuestos aislados de propóleos de zonas tropicales.	6
4. Compuestos aislados de propóleos de zonas áridas y semiáridas.	7
5. Actividad antiproliferativa del extracto metanólico EM en células M12.A ^k , a concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la adición del extracto. En 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se adicionó el máximo volumen de metanol utilizado en el ensayo.	22
6. Actividad antiproliferativa de las fracciones extracto hexánico (EH), extracto etéreo (EE), extracto clorofórmico (EC), extracto acetato de etilo (EAE), extracto acetona (EA) y extracto metanólico ² (EM2), en células M12.A ^k , a una concentración de 0, 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se adicionó el máximo volumen de disolvente utilizado en el ensayo.	25
7. Actividad antiproliferativa de las fracciones EE1-EE6, en células M12.A ^k , a concentración de 0, 0.1, 1.0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se adicionó el volumen máximo de disolvente utilizado en el ensayo.	28
8. Actividad antiproliferativa de las fracciones EE4.1-EE4.5, en células M12.A ^k , a concentración de 0, 0.1, 1.0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72. h posterior a la Incubación con las fracciones. A 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se adicionó el volumen máximo de disolvente utilizado en el ensayo.	29
9. Diagrama de la purificación de Uresin, mediante cromatografía en columna (CCA), cromatografía en placa preparativa (CPP) y cromatografía en capa fina (CCF), monitoreado por RMN de ¹ H y actividad antiproliferativa.	31

10. Actividad antiproliferativa de los compuestos uresin <u>1</u> , <u>2</u> y <u>3</u> , en células M12, A ^k , a concentraciones de 0, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ para uresin y 0, 1.0, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ para pinocembrina, 3-O-Ac-pinobanksina y crisina. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 $\mu\text{g/mL}$ se adicionó el volumen máximo de disolvente utilizado en el ensayo.	32
11. Espectro RMN ¹ H del Compuesto <u>1</u> , en DMSO-d ₆ a 25°C, 400 MHz.	34
12. Estructura del compuesto <u>1</u> a) con puente de hidrógeno, b) fragmento C2-C3 en proyección de Newman.	36
13. Ampliaciones del espectro de HMBC, del compuesto <u>1</u> en Acetona-d ₆ a 25°C.	39
14. Espectro de HSQC, del compuesto <u>1</u> en Acetona-d ₆ a 25°C.	40
15. Espectro de masas del compuesto <u>1</u> .	41
16. Patrón de fragmentación del compuesto <u>1</u> .	43
17. Espectro de IR del compuesto <u>1</u> en pastilla de KBr.	44
18. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>2</u> en CDCl ₃ a 25°C, 400 MHz	46
19. Estructura del compuesto <u>2</u> , a) con puente de hidrógeno, b) fragmento C2-C3 en proyección de Newman.	48
20. Protección diamagnética del anillo B, en el compuesto <u>2</u> .	49
21. Espectros HMBC del compuesto <u>2</u> , en Acetona-d ₆ a 25°C.	52
22. Espectros HSQC del compuesto <u>2</u> , en Acetona-d ₆ a 25°C	54
23. Espectro de masas del compuesto <u>2</u> .	56
24. Patrón de fragmentación del compuesto <u>2</u> .	57
25. Espectro de IR del compuesto <u>2</u> en pastilla de KBr.	58

26. Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>3</u> , en acetona- d_6 a 25°C .	60
27. Estructura del Compuesto <u>3</u> .	61

ABREVIATURAS

AAP	Actividad antiproliferativa
(CD ₃) ₂ CO	Acetona hexadeuterada
(Et) ₂ O	Éter etílico
(Me) ₂ CO	Acetona
[α] _D	Rotación óptica
AcEt	Acetato de etilo
CAPE	Éster fenílico del ácido caféico
CCA	Cromatografía en columna de adsorción
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Espectroscopia de Correlación Homonuclear H-H
CPP	Cromatografía en placa preparativa
EA	Extracto de acetona
EAE	Extracto de acetato de etilo
EC	Extracto clorofórmico
EE	Extracto etéreo
EE1,2,3,4 y 5	Extracto etéreo 1,2,3,4,y 5
EH	Extracto hexánico
EM	Extracto metanólico
EM2	Extracto metanólico 2
Hex	hexano
Hex/AcEt	Hexano/acetato de etilo
HMBC	Correlación Heteronuclear a múltiples enlaces C-H
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSQC	Correlación Heteronuclear cuántica
IR	Espectroscopía infrarroja
J	Constante de acoplamiento
LN	Latitud norte
LW	Longitud oeste
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
NF-κB	Factor de transcripción nuclear
pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo (-C ₆ H ₅)
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

Los propóleos son un material resinoso que las abejas recolectan de brotes y exudados de ciertos árboles y plantas. La composición química de los propóleos es muy compleja, debido a que depende de la vegetación y del área de recolección, así como de las condiciones climáticas del lugar y de la época del año.

Los estudios realizados sobre la composición química de propóleos, se han enfocado principalmente a los colectados en regiones templadas (Inglaterra, parte norte del continente europeo, E.U., Canadá, entre otros), así como en la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa. Otra región, relativamente poco estudiada es la tropical, donde los propóleos se caracterizan por poseer compuestos diferentes a los encontrados en los propóleos de zonas templadas. De estos propóleos, también se han aislado compuestos con actividad antiproliferativa. Mientras que, los propóleos de regiones áridas y semiáridas, se han estudiado escasamente. La importancia de los propóleos, se debe a que contienen una gran cantidad de compuestos con actividades biológicas importantes. En este trabajo, se reporta un estudio sobre la composición química de propóleos colectados en la región de Ures, Sonora. Dicha región se caracteriza por encontrarse en una zona semiárida, con un clima seco y con temperaturas altas en el verano e inviernos fríos lluviosos. La

vegetación en estas áreas generalmente son matorrales, arbustos, árboles de hoja perenne, y hierbas estacionales. Los extractos de los propóleos colectados, se fraccionaron mediante extracciones con solventes de índices de polaridad diferentes, las fracciones se purificaron a través de cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo. La purificación de los compuestos se guió mediante el ensayo de la inhibición del crecimiento de células tumorales (actividad antiproliferativa). Se logró aislar tres compuestos ya conocidos (Pinocembrina 1, 3-O-Ac-pinobanksina 2 y Crisina 3) así como un compuesto con importante actividad antiproliferativa, al cual le nombramos Uresin. Las estructuras de los compuestos 1, 2, y 3, fueron elucidadas mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, espectrometría de masas, etc. Sin embargo, no fue posible determinar la estructura del compuesto Uresin, debido a que la cantidad de muestra que se logró aislar no fue suficiente para su caracterización. Asimismo, se reporta la actividad antiproliferativa de los propóleos colectados y de los compuestos aislados.

Los presentes resultados, son el primer informe donde se muestra que los propóleos sonorenses provenientes de la región de Ures, Son., poseen actividad antiproliferativa importante. Así como la identificación de Pinocembrina, 3-O-Ac-pinobanksina, y Crisina en estos propóleos, confirman que su principal fuente botánica es el álamo. Adicionalmente, este trabajo mostró que el ensayo de actividad antiproliferativa utilizando la línea celular

transformada M12. A^k, es una herramienta útil para evaluar esta bioactividad en propóleos. Finalmente, la metodología y la estrategia de purificación descrita en esta investigación, podrán ser utilizados para el análisis de más muestras de propóleos provenientes de diferentes regiones del Estado de Sonora, en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiproliferativa.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tipos de Propóleos

Los propóleos son un material resinoso que las abejas recolectan de brotes y exudados de ciertos árboles y plantas. Las abejas los utilizan mezclado con cera y miel para cubrir orificios en las paredes internas de la colmena, mantener un medio ambiente estéril y disminuir el diámetro de la piqueta.¹ La composición química de los propóleos es muy compleja, debido a que depende de la vegetación y del área de recolección así como de las condiciones climáticas del lugar y de la temporada (primavera, verano, otoño, e invierno).¹

Los propóleos colectados en Europa, Norte de América, y Norte de Asia, se han denominado como propóleos de zonas templadas. Estos propóleos, generalmente tienen su origen en los álamos y sus híbridos, así como en los abedules.¹ Investigaciones sobre la composición química de muestras provenientes de álamos han mostrado un alto contenido de algunos flavonoides, p. ej: pinocembrina, pinobanksina crisina, galangina, así como cafeatos (bencílicos, fenilílicos, prenilílicos, etc.). Mientras que en el caso de propóleos provenientes del abedul, se han encontrado a los siguientes flavonoides: acaecetin, apigenin, ermanin, ramnocitrin¹, etc. (Figura 1).

Estudios realizados en propóleos colectados en Inglaterra e Irlanda, mostraron una composición muy similar a la observada en el continente

europeo. Adicionalmente, se ha reportado que el éster fenillico del ácido caféico (CAPE), se encuentra en cantidades significativas en dichos propóleos.²

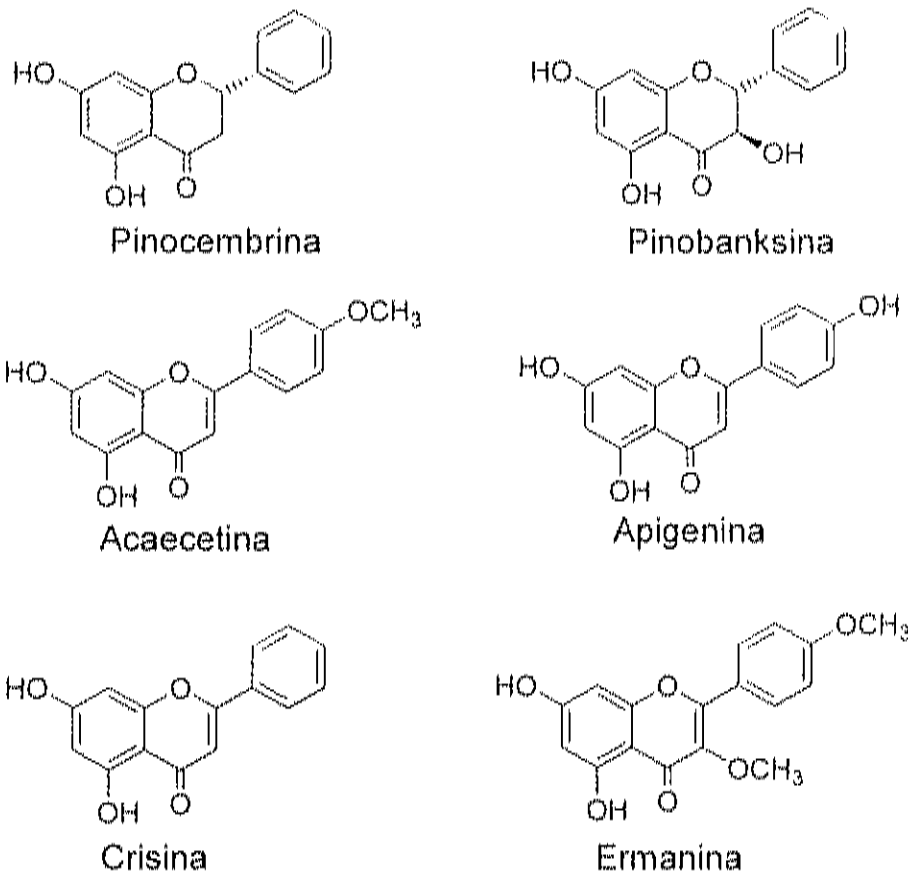


Figura 1. Compuestos aislados de propóleos de álamos y abedules.

Grunberger y Col.³ en 1988, reportaron a CAPE como un compuesto con propiedades inmunomodulatorias, antiinflamatorias, antivirales, así como de un inhibidor de crecimiento de células transformadas. Banskota y col.⁴ también reportaron la presencia de CAPE y de dos nuevos derivados del glicerol (2-acetil-1,3-dicoumaroilglicerol y 2-acetil-1-coumaroil-3-feruloilglicerol), en propóleos colectados en el noroeste de Holanda, (Figura 2). Velikova y col.⁵ han

reportado también la presencia de CAPE y de algunos flavonoides característicos de zonas templadas en propóleos colectados en las regiones de Izmir y Bursa en Turquía, como también en la región de Burgas en Bulgaria. Resultados similares fueron encontrados por Bankova y col.⁶ cuando estudiaron la composición química de propóleos colectados en Italia y Suiza, donde también la principal fuente vegetal son los álamos.

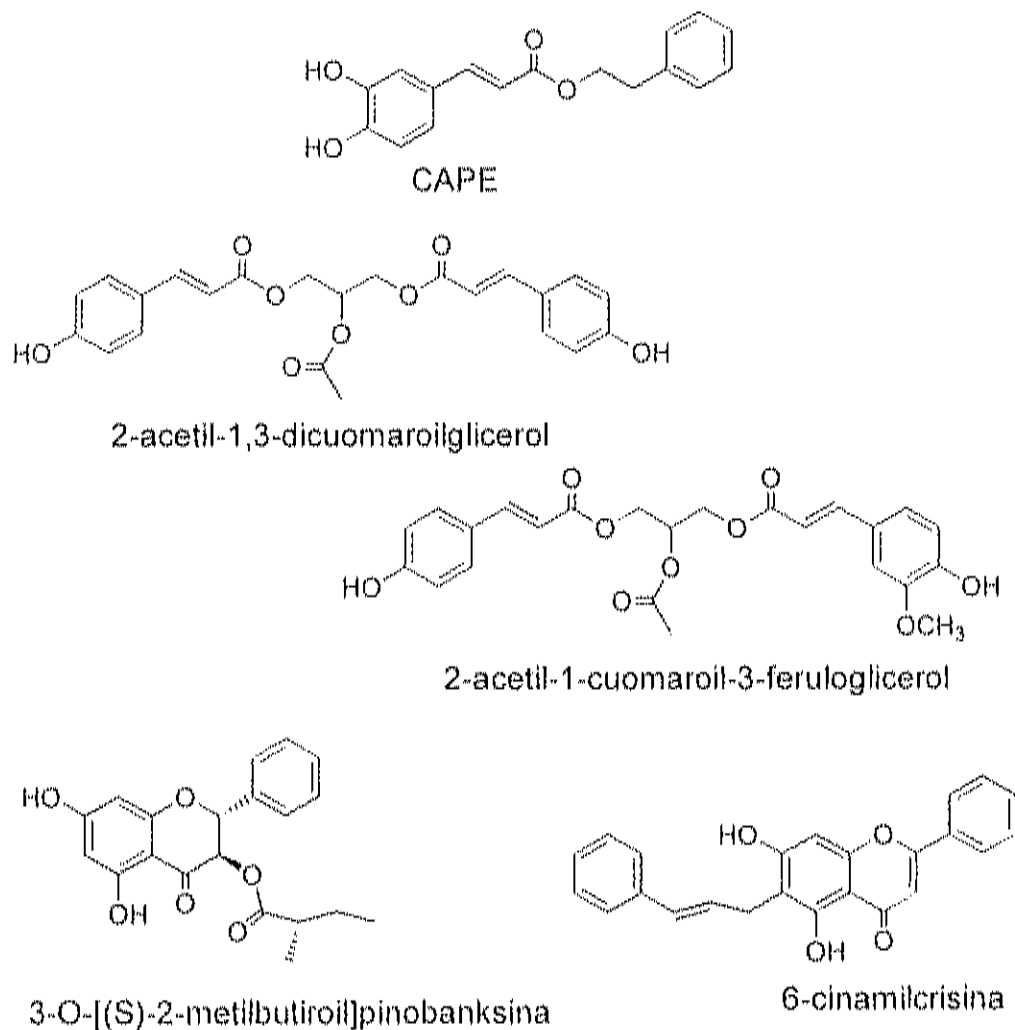


Figura 2. Compuestos aislados de propóleos de regiones templadas.

En el caso de los propóleos de origen Chino, se ha reportado que estos propóleos, también presentan el patrón característico de los europeos. Adicionalmente, se han aislado dos nuevos flavanoides (3-O-[(S)-2-metilbutirol]pinobanksina y 6-cinamilcrisina)⁷, Figura 2.

Las zonas tropicales se caracterizan por poseer una alta biodiversidad botánica. Particularmente en la parte central de África, América del Sur (Brasil, Venezuela, Uruguay, entre otros), México, Cuba, etc. Estas regiones se caracterizan por la ausencia de álamos y abedules, ya que estos árboles no son especies nativas, por lo que las abejas tienen que buscar otras fuentes de exudados y resinas para la elaboración de propóleos. La abundancia de especies vegetales en las zonas tropicales sugiere, que estas regiones son una fuente importante para la obtención de propóleos con compuestos químicos nuevos. Tomás-Barberán y col.⁸ reportaron que los propóleos colectados en distintos lugares de Venezuela, provienen de las especies de *Clusia minor* y *C. major*.

Así mismo, Popova y col.⁹ informaron el aislamiento de dos diterpenos glicosidos (*ent*-8(17)-labdan-15-O- α -L-ramnosido y *ent*-8(17)-labdan-15-O-(3'-O-acetil)- α -L-ramnosido) de propóleos colectados de regiones de El Salvador. Mientras que Bankova y col.¹⁰ encontraron al flavonoide kaemferid y un nuevo lignanobenzofurano en propóleos colectados en la región de Paraná en Brasil, sin lograr establecer su fuente botánica.

Banskota y col.¹¹ ha reportado que las especies de *Baccharis spp.* y *Araucaria heterophylla*, también son fuente de propóleos, en las regiones tropicales adicionalmente ha dado cuenta de la presencia de un nuevo cromano prenilado.

En investigaciones sobre la composición química de propóleos colectados en Chile en la región de Pichilemu, se encontró la presencia de tres nuevos lignanos derivados del alcohol coniferilo. La flora dominante de esta región son plantas de las familias *Asteraceae*, *Anacardiaceae*, *Rosaceae*, *Rhamnaceae*, *Monimiaceae* y *Lauraceae*.¹² Mientras que Cuesta-Rubio y col.¹³ encontraron una benzofenona poliisoprenilada en propóleos colectados al norte de Camagüey, Cuba, región donde dominan las especies de *Clusia minor* y *Clusia rosea*. Algunas de las estructuras de los compuestos encontrados en propóleos de zonas tropicales, se muestran en la Figura 3.

Las regiones áridas y semiáridas se caracterizan por tener un clima con temperaturas altas, veranos secos, inviernos fríos y con lluvia. La vegetación predominante en estas áreas generalmente son matorrales, arbustos, árboles o plantas de hoja perenne y hierbas estacionales. Los propóleos de estas regiones se han estudiado escasamente. Wollenweber y Buchmann¹⁴ realizaron un estudio de propóleos colectados en los alrededores de Tucson, Az., e informan que las principales fuentes de propóleo son las especies de *Ambrosia deltoidea* y *Encelia farinosa*. Adicionalmente, comunicaron la presencia de algunos flavonoides característicos (5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona y

xantomicrol (5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona), así como algunos benzofuranos aislados de los exudados de estas especies y de los propóleos, Figura 4.

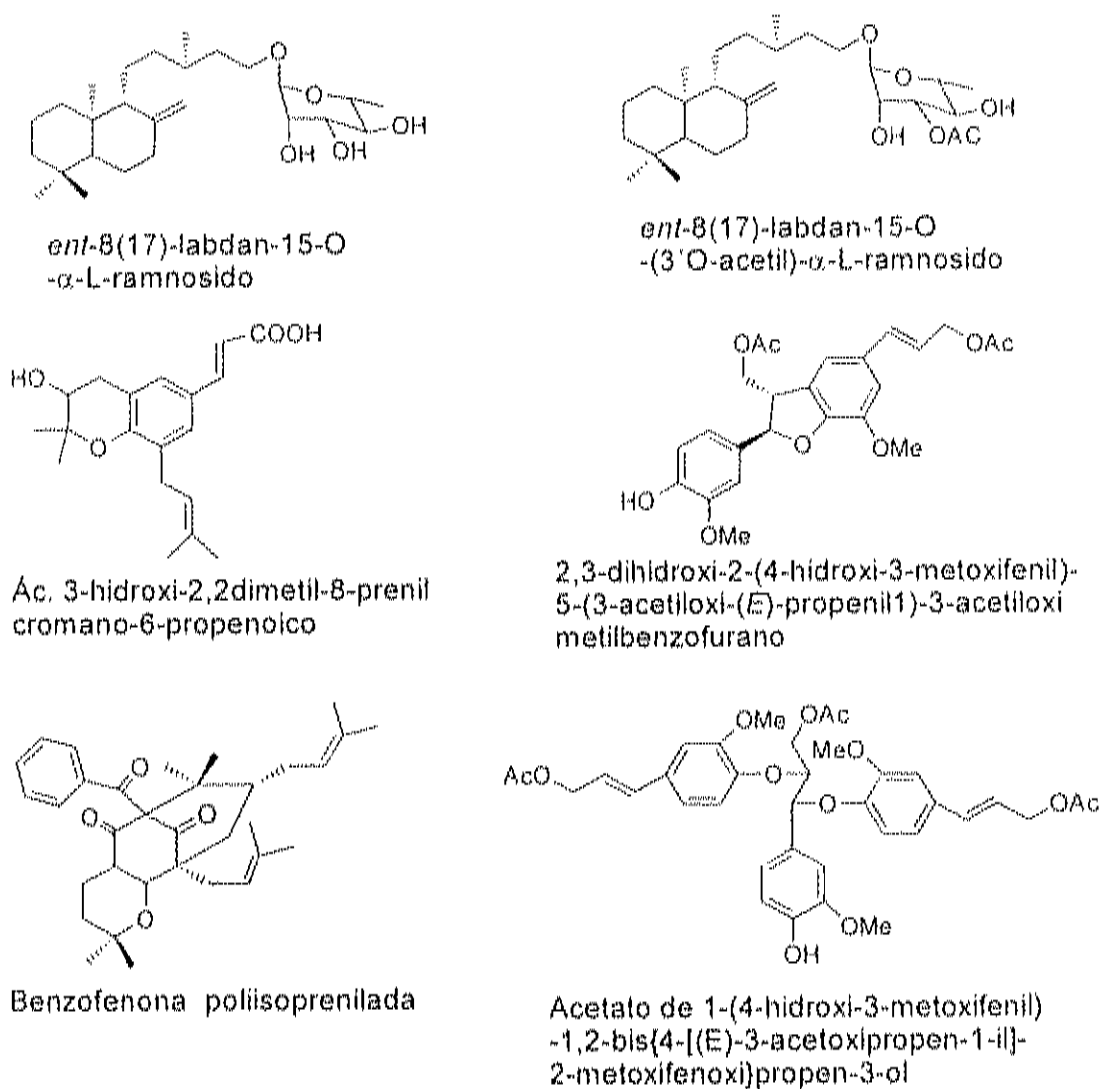
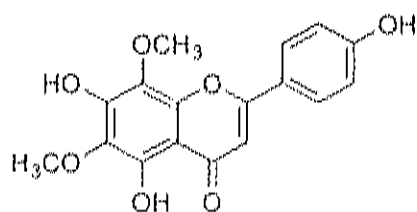
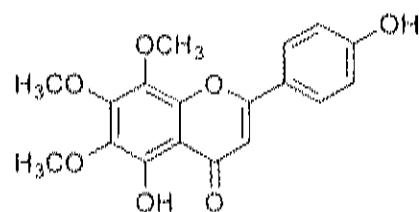


Figura 3. Compuestos aislados de propóleos de zonas tropicales.

Los resultados obtenidos por Wollenweber y Buchmann¹⁴, mostraron que los propóleos de estas regiones, tienen su origen en especies vegetales diferentes a las fuentes vegetales de los propóleos colectados en regiones templadas y tropicales.



5,7,4'- Trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona



5,4'- Dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona

Figura 4. Compuestos aislados de propóleos de zonas áridas y semiáridas.

1.2 Cáncer

El cáncer es un término amplio que cubre una plétora de condiciones caracterizadas por un descontrolado y desprogramado mecanismo de proliferación celular. Actualmente es una de las causas más comunes de muerte en el mundo.¹⁵

La proliferación celular es un proceso altamente controlado, permitiendo que las células proliferen, aumentando su contenido de moléculas y orgánulos, duplicando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células genéticamente iguales.

Generalmente las células se dividen con una periodicidad óptima para el correcto mantenimiento y funcionamiento del organismo. El ciclo celular normal posee una gran diversidad de puntos de control, que permiten que el ciclo celular ocurra de manera adecuada. Estos puntos de control, sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicie antes de que la anterior haya finalizado, y permiten el control del ciclo a través de señales externas.

Existen muchas células diferenciadas en el organismo que solo sintetizan las proteínas que requieren para mantener su actividad, sin crecer ni dividirse a pesar de que las condiciones externas sean favorables. Por otra parte, si las células crecieran en tamaño o masa, más rápido o más despacio de lo que se dividen se harían cada vez más grandes o más pequeñas respectivamente, cuando en realidad las células mantienen su forma y tamaño durante generaciones. Todo ello indica que existe un control fino y preciso del metabolismo celular para adecuar crecimiento a división. Las células poseen una determinada capacidad intrínseca de proliferación, por lo que individualmente se divide (aproximadamente 50 divisiones) hasta que llegan a un grado de diferenciación en la que han adquirido las características óptimas para desarrollar una función. Durante la fase final, las células entran en un proceso de degeneración, llamado crisis, que conduce a la senescencia o envejecimiento y posteriormente a la muerte. La muerte celular, también puede originarse a partir de la activación de mecanismos específicos, este proceso es denominado como apoptosis o muerte celular programada, y forma parte de los

procesos normales en los seres vivos. De acuerdo a este marco de referencia, en casi todos los tipos de cáncer se presenta una desprogramación y descontrol del mecanismo de proliferación celular, así como una supresión del o los mecanismos normales que conducen a la muerte celular, lo que lleva a un refuerzo para la progresión neoplásica. El desafío entonces para la comunidad de investigadores es identificar y entender la anatomía molecular de los ejes centrales que conducen a la progresión del tumor y al desarrollo de terapias que ataquen directamente a esos punto de convergencia.¹⁶

Actualmente se realizan inmensos esfuerzos para mejorar los tratamientos, así como para encontrar curas para enfermedades de cáncer. Adicionalmente, la industria farmacéutica se encuentra bajo una incrementada presión para la búsqueda y/o descubrimiento de nuevos fármacos que permitan un eficiente y más rápido tratamiento para este tipo de enfermedades.¹⁷ Recientemente, se ha observado en la literatura un gran auge por la búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas en los propóleos.⁶ De acuerdo con una encuesta realizada por el Instituto Nacional del Cáncer en E.U.A., 61% de las 877 nuevas especies químicas de bajo peso molecular lanzadas como drogas en el mundo durante el periodo 1981-2002 fueron de origen natural o estuvieron inspiradas en productos naturales.¹⁸ En el caso de los compuestos terapéuticos, 74% de éstos fueron anticarcinogénicos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Actividad Antiproliferativa de Propóleos

Algunas de las propiedades biológicas como bactericida¹⁹ y antifúngica²⁰ observadas en el propóleo, han quedado bien establecidas. También se han observado otras actividades como antioxidante²¹ y antiviral.²² Tiendo en cuenta el hecho de que algunos productos para el consumo humano que contienen propóleos como bebidas y alimentos han ido ganando popularidad en el mundo, debido a que se les ha atribuido que dichos productos mejoran la salud y a que previenen enfermedades como por ejemplo: enfermedades del corazón, diabetes, e incluso algunos tipos de cáncer, actualmente se les ha denominado como alimentos y bebidas saludables. Adicionalmente, la industria farmacéutica se encuentra bajo una incrementada presión para la búsqueda de nuevos fármacos que permitan un rápido y eficiente tratamiento contra el cáncer,¹⁷ lo que ha conducido a la indagación de los principios activos y a la pesquisa de compuestos con propiedades antiproliferativas en los propóleos.¹⁷

De los compuestos aislados de los propóleos con actividad antiproliferativa más estudiado es CAPE, el cual ha mostrado ser un potente y específico inhibidor del factor de activación de transcripción nuclear NF- κ B, (este factor tiene un papel central sobre el control de la expresión de varias citocinas inflamatorias, así como del complejo principal de histocompatibilidad y

sobre moléculas de adhesión involucradas en metástasis tumoral), potente antimitogénico anticarcinógeno, antiinflamatorio, y tiene propiedades inmunomodulatorias.²³ Estos hechos han mostrado a CAPE como un componente activo de los propóleos.

La continua búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa en propóleos producidos en Holanda,²⁴ llevó al aislamiento de algunos compuestos ya conocidos (crisina, galangina-7-metil-éter, pinobanksina, pinobanksina-5-metil-éter, ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido isoferúlico, CAPE, cinamilcafeato, etc.), así como a dos nuevos derivados del glicerol (2-acetil-1,3-dicoumaroilglicerol y 2-acetil-1-coumaroil-feruloilglicerol). La evaluación sistemática de la actividad antiproliferativa de estos compuestos mostró que los responsables más potentes de dicha actividad son CAPE y el cinamilcafeato contra líneas celulares HT-1080 (fibrosarcoma humano), B16-BL6 (melanoma) y 26-L5 (carcinoma de colon de ratón), mientras que el flavanona pinobanksina mostró una débil actividad antiproliferativa contra las líneas celulares anteriormente mencionadas.

Otros compuestos con actividad antiproliferativa aislados de propóleos de origen brasileño²⁵ son el cromano prenilado (ácido-3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propanoico) y el flavanol (3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanol), los cuales mostraron actividad contra las líneas celulares HT-1080 y 26-L5. También, se logró aislar dos derivados benzofuranicos.²⁶ Por otra parte, Hirota y col.²⁷ aislaron un nuevo derivado benzopirano (ácido (Z)-2,2-dimetil-8-(3-metil-

2-butenil)-benzopiran-6-propenoico), de propóleos brasileños, el cual mostró actividad antiproliferativa contra la línea celular HLC-2. Mientras que, Usia y col.²⁸ observaron que los propóleos de origen chino poseen potentes actividades antiproliferativas. La purificación y caracterización de los principios activos, permitió el aislamiento de dos nuevos flavonoides (3-O-[(S)-2-metilbutilroilpinobanksina y 6-cinamilcrisina), los cuales mostraron débil actividad antiproliferativa, mientras que CAPE y algunos cafeatos presentaron la mayor actividad antiproliferativa.

Recientemente, un estudio de la composición química de propóleos originarios de Taiwán, documentó el aislamiento de dos nuevos prenilflavanonas (propolin A y propolin B), las cuales mostraron importante actividad antiproliferativa contra líneas celulares de melanoma, glioma C6, y HL60.²⁹

La búsqueda de nuevos fármacos en los propóleos, que puedan ser usados como terapia contra la proliferación de células transformadas es de suma importancia ya que permitiría un eficiente y más rápido tratamiento para este tipo de enfermedades. Adicionalmente daría paso al desarrollo de la producción de propóleos en la región, conduciendo a la diversificación de la actividad apícola en el estado de Sonora.

En la actualidad es importante la caracterización de los propóleos mexicanos ya que esta información es incipiente o nula.

El propósito de este trabajo es presentar el aislamiento, purificación, caracterización y evaluación antiproliferativa de los principales componentes de los propóleos nativos de la zona denominada "El Coyote" adyacente a Ures, en el Estado de Sonora.

3. OBJETIVOS

Para llevar a cabo la presente investigación, se plantearon los siguientes objetivos.

3.1 Objetivo General

Estudiar la composición química de los propóleos sonorenses así como aislar y caracterizar al o los compuestos que poseen actividad antiproliferativa en líneas celulares transformadas.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Obtención de propóleos de la región de Ures, Sonora.
- 2) Aislar y purificar a los compuestos que presenten actividad antiproliferativa
- 3) Caracterizar a los compuestos que presenten actividad antiproliferativa mediante RMN de ^1H , ^{13}C , IR y espectrometría de masas.
- 4) Evaluar la actividad antiproliferativa de los propóleos contra la línea celular transformada. M12. A^k (Linfoma de ratón)

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material Biológico

Los propóleos se colectaron durante los meses de noviembre de 2001 a junio de 2002 de 10 colmenas proporcionadas por el Sr. Gilberto Valerizuela de San Pedro de Ures, Sonora. Las colmenas se colocaron en la región conocida como "El Coyote" (29° 27' LN; 110° 22' LW; y una altitud de 413 m sobre el nivel medio del mar).

Durante los meses de noviembre a enero se colocó en la parte superior de la colmena un bastidor de madera de 59 X 37 cm, el cual contenía una cubierta de malla de polietileno con orificios de 1 mm². El bastidor con propóleos se enfrió con nitrógeno líquido, tratamiento que facilitó el manejo de los propóleos.

Una vez obtenida la muestra, se colocó en un envase de polietileno y se almacenó a -20°C hasta su uso. El peso de la muestra fue de 108.52 g, la cual se dividió en dos partes: 8.52 g se guardaron en reserva y los 100 g restantes se usaron en la obtención de los extractos. Las especies de la flora predominante en esta región son: brea, (*Carcidium sonora*), estafiate, (*Artemisa mexicana willd*), mezquite, (*Prosopis spp*), ocotillo, (*Fouquieria macdugalli*), sangregado, (*Jatropha cardiophylla*), palofierro, (*Olneya tesota*), palo dulce (*Eysenhardtia polystachya*), saliciso, (*Lycium andersonii*), uña de gato, (*Mimosa laxiflora*), y vinorania, (*Acacia constricta*)^{30,31}

4.2 Extracto Metanólico (EM)

100 g de propóleo previamente enfriados a -20°C (por 20 min), se molieron en un mortero hasta obtener un polvo. Los propóleos en polvo se colocaron en un matraz bola y se le adicionó 300 mL de MeOH grado reactivo, la mezcla se agitó por 24 h. Después de este tiempo se filtró sobre tela de algodón, con la finalidad de eliminar sólidos tales como restos de madera, tallos etcétera y sobre papel para eliminar partículas como tierra y polen. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio bajo presión reducida a una temperatura aproximada de 40°C . Posteriormente, se secó al alto vacío (1×10^{-4} mmHg), obteniendo 47.6 g de los propóleos como un sólido de color café verdoso. El extracto se almacenó a -40°C al abrigo de la luz.

4.3 Partición del Extracto Metanólico (EM)

46.6 g del extracto metanólico (EM) se trató con 150 mL de hexano (Hex) por tres veces y se agitó por 24 h. La parte soluble se filtró sobre papel, y se concentró en un evaporador rotatorio, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniendo un sólido amarillo de 6.12 g, el cual se etiquetó como extracto hexánico (EH). La parte insoluble en hexano, posteriormente se trató con éter etílico, bajo la misma metodología descrita anteriormente lo que permitió obtener 24.71 g de extracto etéreo (EE). Este procedimiento fue repetido con diferentes solventes (cloroformo, acetato de etilo, acetona y

metanol) permitiendo obtener los siguientes extractos: extracto clorofórmico: (EC) 4.74 g, extracto acetato de etilo (EAE) 0.93 g, extracto acetona: (EA) 0.78 g, y 5.56 g de extracto MeOH (EM2). Cada extracto se almacenó en viales y se mantuvieron al abrigo de la luz.

4.4 Actividad Antiproliferativa (AAP)

La evaluación de la Actividad Antiproliferativa se realizó en colaboración con el Laboratorio de Inmunología del Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad de Sonora, Unidad Centro.

Se utilizó la línea celular M12.A^k, (linfoblasto de ratón) la cual fue mantenida en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5%, a una temperatura de 37°C, bajo atmósfera de CO₂ al 5%.

La proliferación celular de la línea M12.A^k, se realizó incubando 250 µL de una suspensión celular (50,000 cel/mL) en una placa de cultivo de 48 pozos, en presencia de 250 µL de una solución conteniendo los extractos a estudiar, éstos fueron disueltos en Metanol y dimetilsulfoxido. Al cultivo control se le adicionó el máximo de volumen de disolvente utilizado sin muestra. El cultivo se incubó durante 72 horas a 37°C bajo atmósfera de CO₂ al 5%. La inhibición del crecimiento celular (actividad antiproliferativa) se evaluó cada 24 h. La viabilidad de las células se determinó mediante el uso del colorante vital Azul de Tripano

(0.4 %). Las células muertas que presentaban la membrana plasmática dañada, incorporaron el colorante. Mientras que las células viables no lo hicieron.

4.5 Purificación

4.5.1 Cromatografía en Columna

La purificación de los diferentes extractos se realizó mediante cromatografía utilizando una columna de vidrio de 65 x 3 cm, y como fase estacionaria sílica gel 60 con tamaño de partícula de 0.040-0.063 mm (25 cm), y como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo (Hex/AcEt) 90:10 así como diferentes proporciones de la misma mezcla (98:2, 95:5, 90:10; 85:15, 80:20, 70:30).

Las fracciones fueron colectadas en viales de 60 mL, la purificación se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando cromatofolios de sílica gel 60 (0.20 mm) F-254 de 1 x 5 cm, los cuales se revelaron mediante su exposición a vapores de I₂, solución de ácido sulfúrico al 10% y se observaron con una lámpara de UV a 254 y 365 nm.

4.6 Identificación de Compuestos Aislados

La caracterización de los compuestos se realizó mediante técnicas espectroscópicas y la determinación de algunas de sus propiedades físicas. El

punto de fusión se determinó mediante la técnica de capilar abierto en un equipo Mel-Temp, Electrothermal. La rotación óptica $[\alpha]_D$ fue determinada con un polarímetro Perkin Elmer modelo 341, utilizando como solvente MeOH marca Aldrich grado HPLC, lote BA07779BA, una celda de 10 cm y una temperatura de 25 °C. Los experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C en una dimensión se corrieron en un espectrómetro Avance de 400 MHz (facilitado por el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, de la Universidad de Sonora) a una frecuencia de 400 y 150 MHz respectivamente, mientras que los experimentos de dos dimensiones, COSY, HSQC, y HMBC se corrieron en un espectrómetro Bruker de 600 MHz (facilitado por el Laboratorio de RMN de la Universidad de Arizona). Las muestras se disolvieron en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, CDCl_3 y DMSO-d_6 , usando tetrametilsilano (TMS), como referencia interna. El análisis de infrarrojo (IR) fue hecho en un equipo Nicolet FTIR modelo 460 con pastillas de KBr.

El análisis de espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro cuadrupolar HP- 5989A acoplado en serie a un cromatógrafo de gases HP-5890 serie II y con una computadora Apollo serie 400. Equipo facilitado por el Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución se efectuó en un equipo Hewlett Packard Series 1100, con una columna Lichrospher (Varian) fase reversa, (150 x 4-6 mm, 5 μm tamaño de partícula), y usando como fase móvil A) agua / B) ácido fórmico (19:1, v,v) a 1mL/min, iniciando isocráticamente con

30% de B por 15 min, se inició gradiente hasta alcanzar 40% de B a los 20 min, 45 a los 30 min, 60 % a los 50 min, 80% a los 52 min y finalmente flujo isocrático otra vez con 80% de MeOH hasta los 60 min.³²

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Purificación y Actividad Antiproliferativa

Los propóleos fueron colectados durante noviembre de 2001 a junio del 2002, en los alrededores de Ures, Sonora (29° 27' LN; 110° 22' LW; con una altitud de 413 m sobre el nivel medio del mar). Los propóleos (100 g) se pulverizaron en frío y se trataron con 300 mL de metanol grado reactivo, con la finalidad de disolver todos los compuestos orgánicos y eliminar el material insoluble. El filtrado obtenido se concentró en un evaporador rotatorio a una temperatura de 40°C y bajo presión reducida, obteniendo 47.6 g de propóleos como un sólido viscoso de color café claro. Este extracto metanólico madre se etiquetó como EM. De acuerdo a la cantidad de propóleos obtenida, es evidente que las muestras de propóleos colectadas presentaron una gran cantidad de material insoluble (hojas secas, madera, abejas muertas, así como materia inorgánica (polvo)), por lo que el rendimiento de estos propóleos fue del 47 %.

Una vez obtenido el EM, se procedió a evaluar la actividad antiproliferativa (AAP). El análisis de la AAP, mostró que el extracto EM presenta importante actividad a concentraciones iguales o mayores a 10 µg/mL, (Figura 5). Un análisis detallado de la morfología de la línea celular bajo estudio, mostró que a las 6 horas un número importante de células bajo tratamiento,

presentaban una morfología diferente en comparación con las células sin tratar. Las células tratadas sufrieron un alargamiento visible además de encontrarse suspendidas en el medio de cultivo, mientras que las células normales no mostraron alargamiento y presentaban adherencia con la superficie de la caja de cultivo.

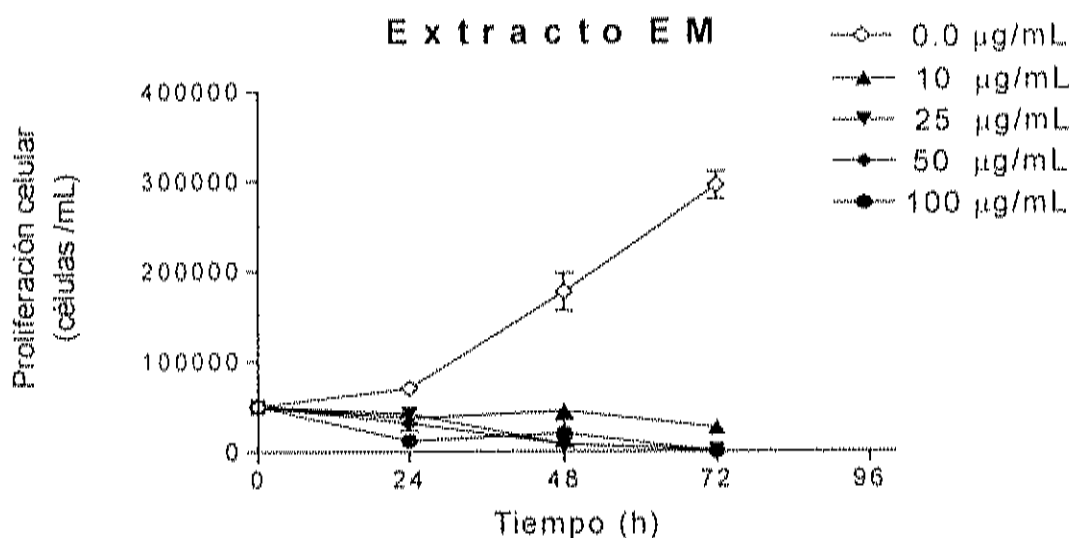


Figura 5. Actividad antiproliferativa del extracto metanólico EM en células M12. A^k. a concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100 µg/mL. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la adición de el extracto. En 0 µg/mL se adicionó el máximo volumen de metanol utilizado en el ensayo.

A las 24 horas un gran número de ellas ya no estaban viables y presentaban características morfológicas diferentes a las células sin tratamiento (unas redondas y otras alargadas), ver apéndice 8.1. Mientras que en el caso de las células del control, no se presenta alargamiento y continúan su proliferación normal. De acuerdo a estos resultados, se estableció que estos propóleos poseen AAP. Por lo que esta bioactividad y morfología celular, se utilizarán en

en el proceso de purificación del (los) compuesto(s) responsable(s) de la AAP.

Una vez determinada la AAP del extracto metanólico, se procedió al fraccionamiento del mismo, utilizando solventes con índices de polaridad creciente (p.ej. hexano (Hex), éter etílico (Et_2O), cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo (AcEt), acetona y metanol (MeOH)). Por lo que 46.6 g de EM se trataron con 150 mL de hexano y se agitaron por 24 h (tres veces). El sobrenadante se filtró a través de papel. Las 3 fracciones se juntaron y se concentraron bajo presión reducida, obteniendo 6.1 g del extracto hexánico como un sólido color amarillo claro, esta fracción se etiquetó como EH (extracto hexánico). A la parte insoluble (40.5 g), se le adicionaron 150 mL de éter etílico y se agitó por 24 h a temperatura ambiente (tres veces), el sobrenadante se filtró, y las 3 fracciones se mezclaron y se concentraron bajo presión reducida, obteniendo 24.7 g del extracto etéreo como un sólido color café, esta fracción se etiquetó como EE (extracto etéreo).

La parte insoluble en éter, se trató con cloroformo y se siguió el mismo procedimiento que para los extractos anteriores, obteniéndose 4.7 g del extracto clorofórmico, como un sólido color café oscuro, este extracto se etiquetó como EC (extracto clorofórmico).

La parte insoluble en cloroformo, se trató con acetato de etilo, posteriormente con acetona y finalmente metanol, siguiendo el mismo procedimiento que para los extractos anteriores, lo que permitió obtener 0.93 g

del extracto de acetato de etilo (EAE), 0.78 g del extracto de acetona (EA) y 5.6 g de un segundo extracto metanólico (EM2). Es importante mencionar que se obtuvo un residuo 9.8 g, el cual resultó insoluble en solventes orgánicos, por lo que se desechó.

El análisis de la AAP de los extractos EH, EE, EC, EAE, EA, EM2, mostró que el extracto EH, solo presentó AAP a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado, sugiere que el extracto hexánico no presentó AAP importante (Figura 6) y que la actividad observada puede deberse a posibles contaminaciones. Esta observación, se confirmó mediante el análisis del espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H), ya que en dicho espectro, se observaron señales que corresponden a compuestos presentes en el extracto etéreo EE, representando éstos sólo un porcentaje pequeño. En cambio, los extractos EE, EC, presentaron AAP a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, se observó que estos extractos ocasionaron un alargamiento de las células. Por otra parte, los extractos EAE y EA, solo mostraron AAP en concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que en el caso del extracto EM2, no mostró AAP, Figura 6.

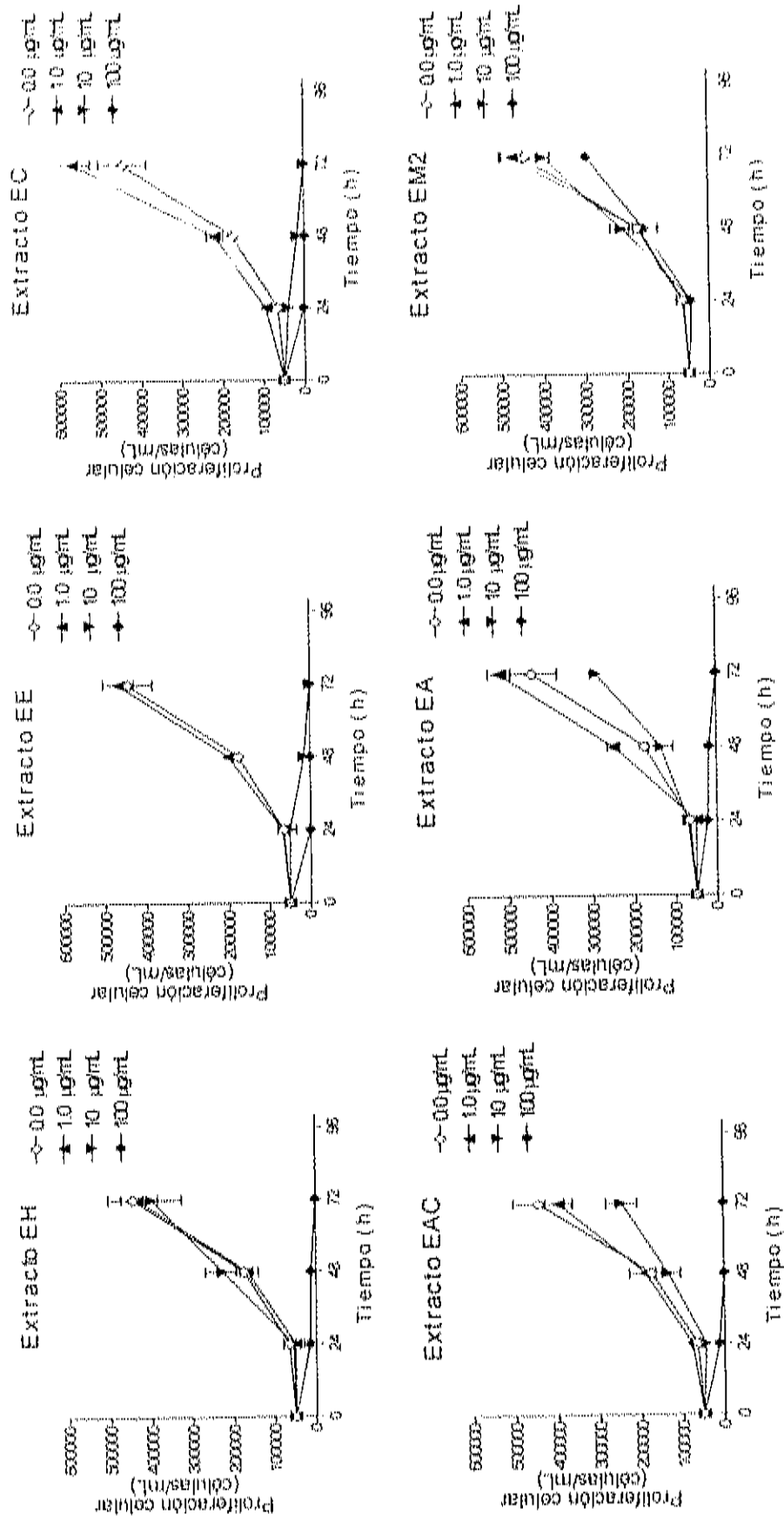


Figura 6. Actividad antiproliferativa de las fracciones extracto hexánico (EH), extracto etéreo (EE), extracto clorofórmico (EC), extracto acetato de etilo (EAE), extracto acetona (EA) y extracto metanólico2 (EM2), en células M12.A¹ a una concentración de 0, 1, 10 y 100 µg/mL. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 µg/mL se adicionó el máximo volumen de disolvente utilizado en el ensayo.

permitieron obtener aproximadamente 0.1mg del compuesto responsable de la actividad AAP. Desafortunadamente, la cantidad obtenida de este compuesto, no fue suficiente para llevar a cabo la caracterización espectroscópica. En nuestro laboratorio se ha etiquetado a este compuesto como uresin. El esquema de purificación de uresin a partir de EE4 se muestra en la Figura 9.

Por otra parte, el análisis de los espectros de RMN ^1H de las fracciones etiquetadas como EE1 y EE2 mostraron señales características de flavonoides. Esta observación, motivó a que dichas fracciones, también se sometieran a procesos de purificaciones sucesivas mediante cromatografía en columna. La cromatografía de la fracción EE1, permitió el aislamiento del compuesto llamado pinocembrina (1). Por otra parte, la cromatografía de la fracción EE2, llevó al aislamiento del derivado acetilado de pinobanksina (3-O-Ac-pinobanksina 2.)

La elucidación estructural mediante RMN ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC, COSY, infrarrojo y espectrometría de masas de los compuestos 1 y 2, se muestra más adelante. Es pertinente mencionar que el trabajo de cromatografía de la fracción EC, permitió el aislamiento de la flavona conocida como crisina 3. De esta fracción, también se aislaron cantidades importantes del compuesto 1. Este resultado, puede ser explicado, en base a la parcial solubilidad de la pinocembrina en éter etílico. Por lo que, parte de ella fue extraída en la fracción EE y otra parte fue disuelta en CHCl_3 y por lo que también estaría presente en la fracción EC. La caracterización del compuesto 3 se describe más adelante.

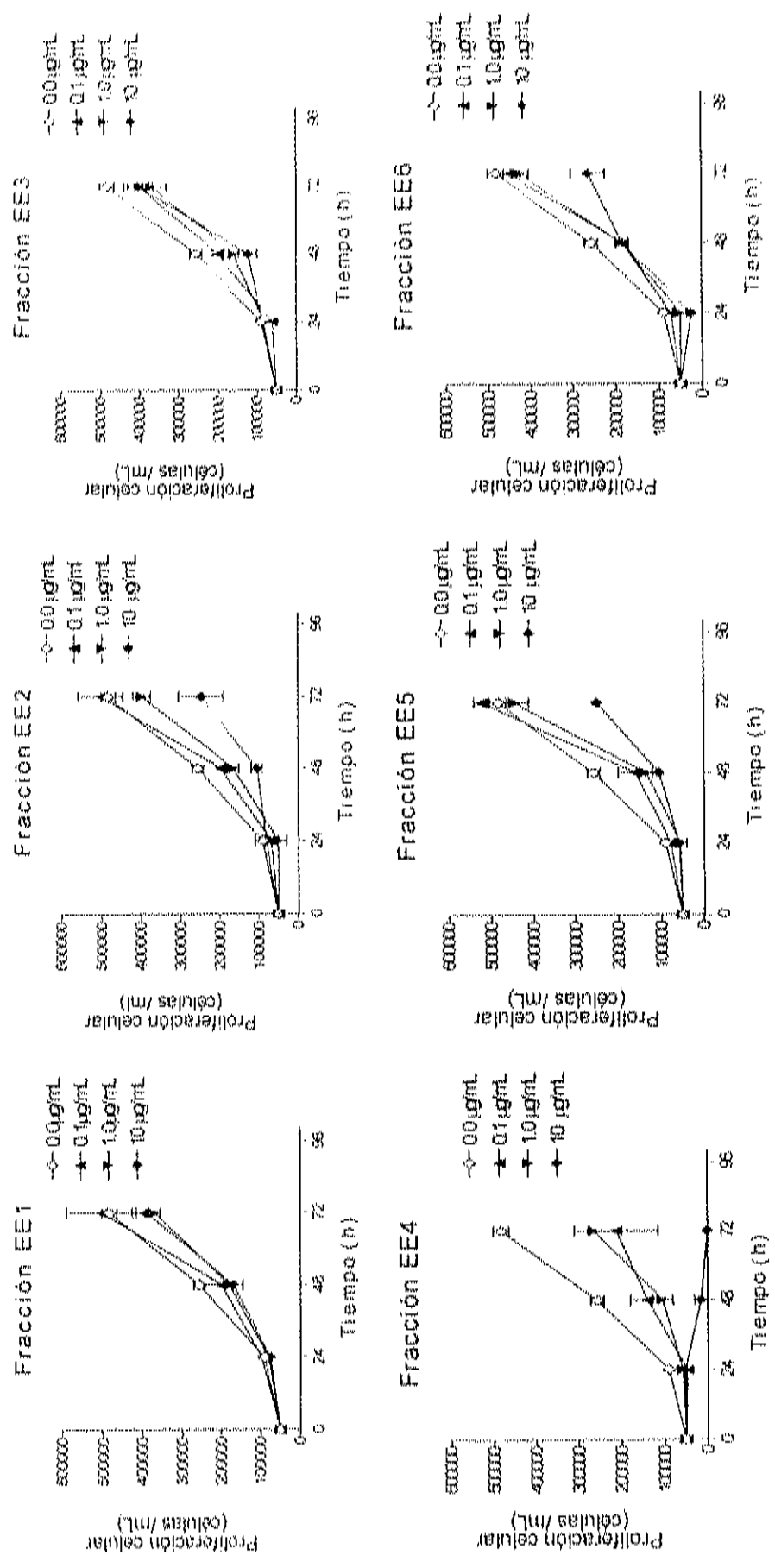


Figura 7. Actividad antiproliferativa de las fracciones EE1-EE6, en células M12. A⁺, a concentración de 0, 0.1 1.0 y 10 µg/mL. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 µg/mL se adicionó el volumen máximo de disolvente utilizado en el ensayo.

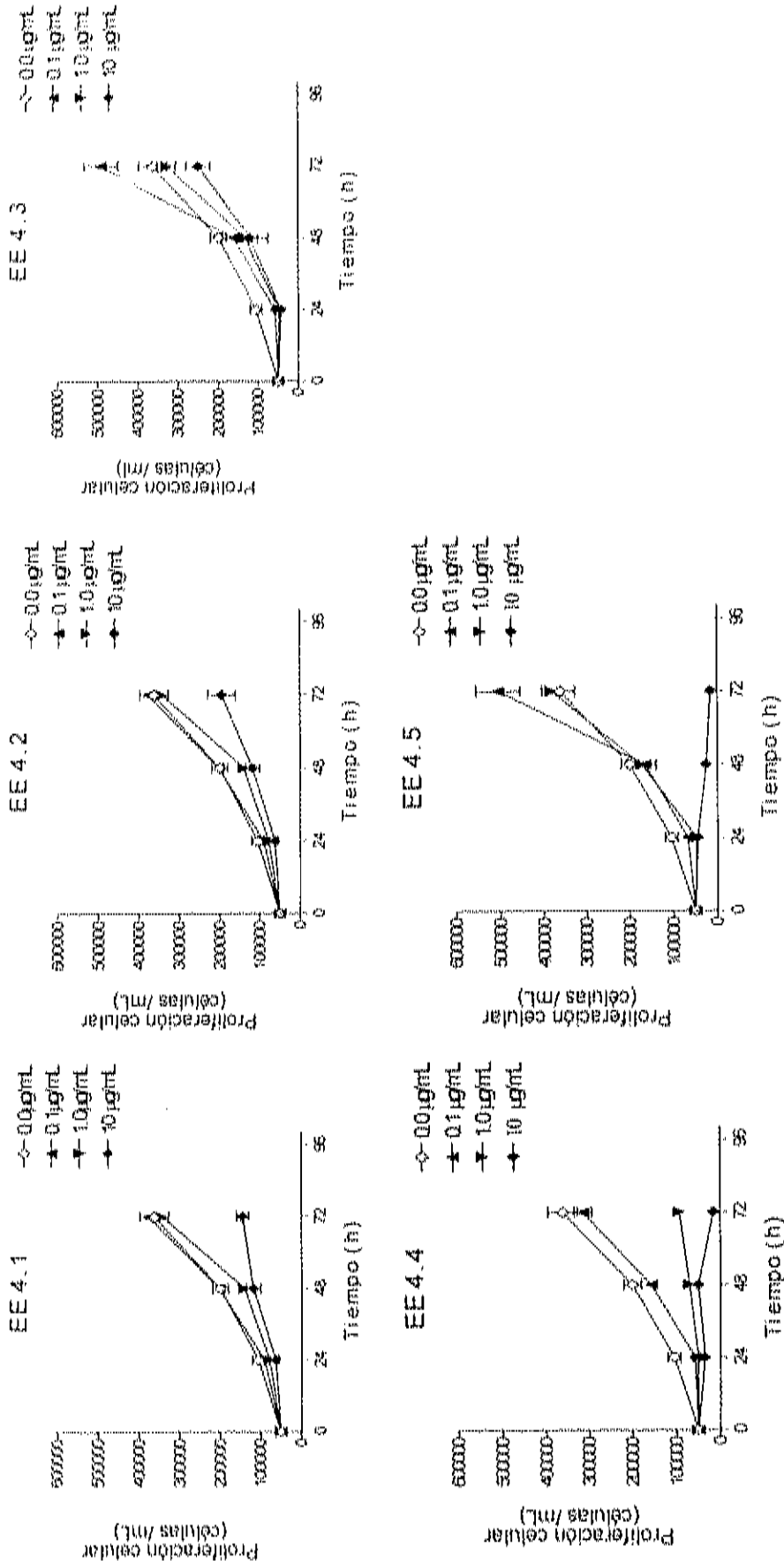


Figura 8. Actividad antiproliferativa de las fracciones EE4.1-EE4.5, en células M12. A^k, a concentración de 0, 0.1 1.0 y 10 µg/mL. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 µg/mL se adicionó el máximo volumen de disolvente utilizado en el ensayo.

La presencia de pinocebrina, 3-O-Ac-pinobanksina y crisina en propóleos ha sido reportada previamente.^{2,5,6,7,24} Adicionalmente, en la literatura se ha sugerido que los propóleos con presencia de pinocebrina y 3-O-Ac-pinobanksina, pueden provenir de especies de álamos. Esta observación, está de acuerdo con el resultado obtenido, ya que los propóleos analizados fueron colectados de colmenas localizadas en áreas colindantes al río Sonora (región que posee una importante población de álamos).

Toda vez que se logró el aislamiento, purificación y caracterización de los compuestos, se evaluó la actividad antiproliferativa del compuesto uresin, así como de los compuestos 1, 2 y 3, los resultados se muestran en la Figura 10, donde se puede observar que el compuesto uresin presenta AAP a concentraciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h, mientras que el compuesto 1 solo presenta AAP en concentraciones del orden de los 50 $\mu\text{g/mL}$. En el caso del compuesto 2, este no muestra una AAP importante. La actividad observada en el compuesto 3 se asume que puede deberse a la presencia de compuestos contaminantes (ver Apéndice 8.7), ya que la actividad AAP de este compuesto se comparó con una muestra comercial, observando que esta última no presenta AAP (ver Apéndice 8.2).

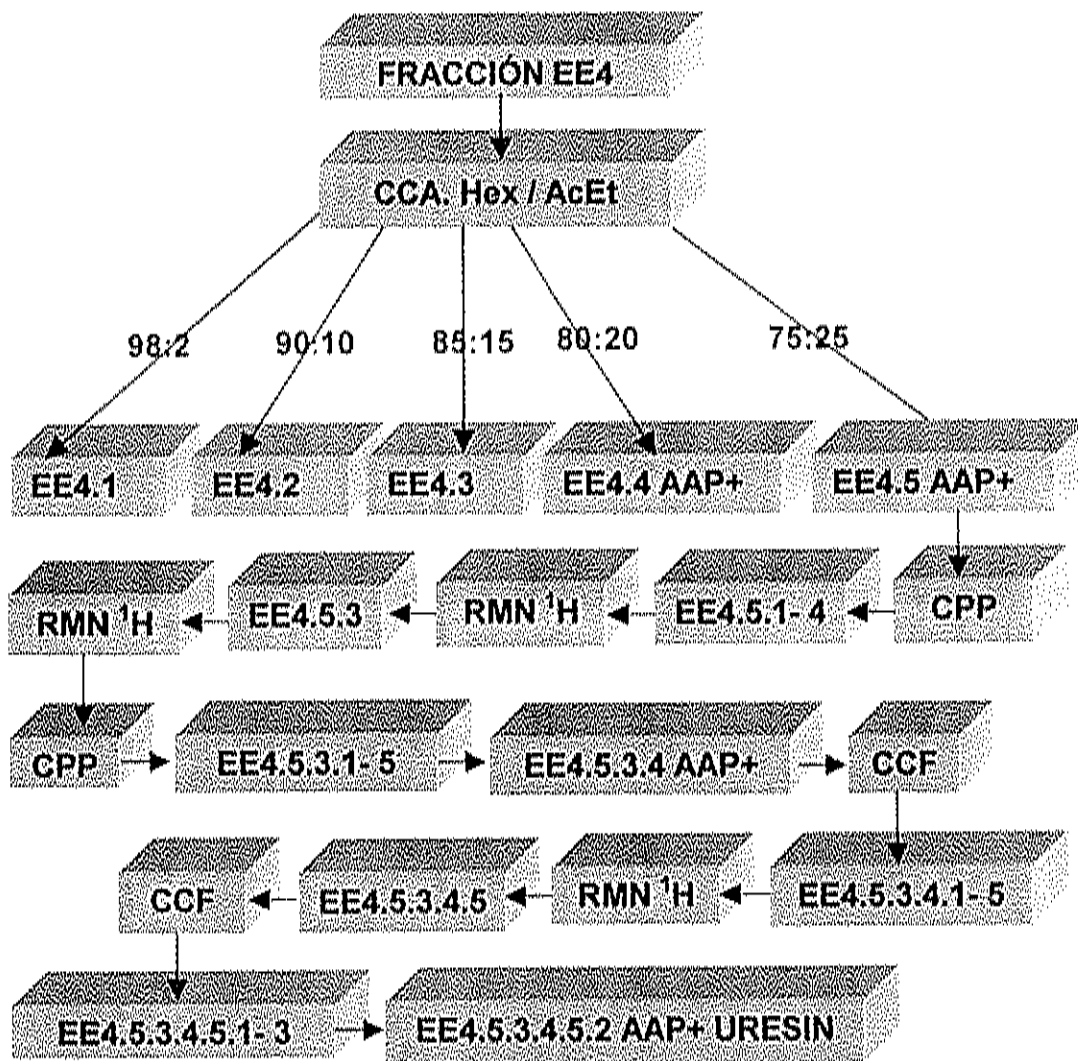


Figura 9. Diagrama de la purificación de Uresin, mediante cromatografía en columna (CCA), cromatografía en placa preparativa (CPP) y cromatografía en capa fina (CCF), monitoreado por RMN ¹H y actividad antiproliferativa.

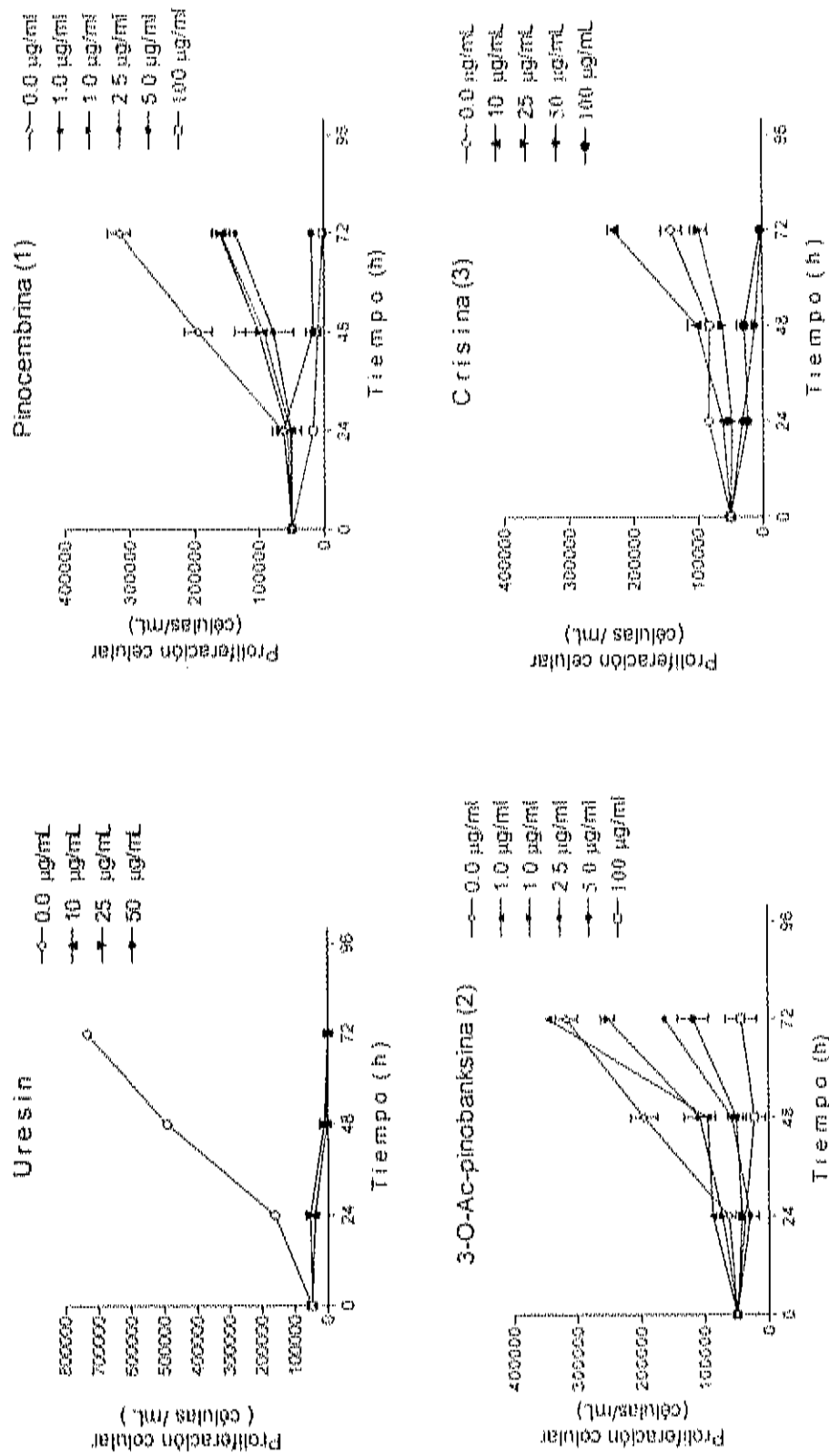


Figura 10. Actividad antiproliferativa de los compuestos Uresin 1, 2 y 3, en células M12. A^k a concentraciones de 0, 10, 25 y 50 µg/mL para uresin y 0, 1.0, 10, 25, 50 y 100 µg/mL para pinoembirina, 3-O-Ac-pinoabanksina y crisina. La concentración celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h posterior a la incubación con las fracciones. A 0 µg/mL se adicionó el volumen máximo de disolvente utilizado en el ensayo.

5.2 Caracterización Espectroscópica

5.2.1 Pinocembrina (1)

El espectro de RMN ^1H (400 MHz) del compuesto 1 en DMSO- d_6 , se muestra en la Figura 11. El análisis de la integral del espectro de ^1H permitió establecer que el compuesto 1, posee 12 protones, de los cuales tres son de tipo alifático, dos son protones aromáticos altamente protegidos, cinco son protones aromáticos típicos de un grupo fenilo monosustituido, y finalmente dos protones intercambiables con D_2O .

La asignación de cada protón, se realizó a partir del análisis de primer orden de las constantes de acoplamiento (análisis del espectro ^1H de alta resolución, obtenido a 600 MHz), por lo que las dos señales simples y finas a campo bajo, centradas 12.07 ppm y 10.79 ppm, se asignaron a los protones de los hidroxilos de C5 y C7 respectivamente. Estas señales presentan intercambio con deuterio cuando a la muestra se le adiciona D_2O . El experimento de RMN de ^1H , del compuesto 1, disuelto en acetona- d_6 , mostró que el protón del hidroxilo en C5 forma un puente de hidrógeno intramolecular con el oxígeno del carbonilo en C4, generando un anillo de seis miembros, este hecho conduce a que el protón se observe como una señal fina y no presente intercambio en ausencia de D_2O , (Figura 12a). En cambio, el protón del hidroxilo en C7, se

presenta como una señal ancha, indicando que dicho protón se encuentra en un equilibrio rápido de intercambio en acetona- d_6 .

La señal centrada en 7.56 ppm, que integra para dos protones es típica de un fenilo monosustituido, ya que presenta un doble con una constante de acoplamiento *orto* $^3J_{HH}=7.7$ Hz, esta señal se asignó a los protones etiquetados como H10 y H14.

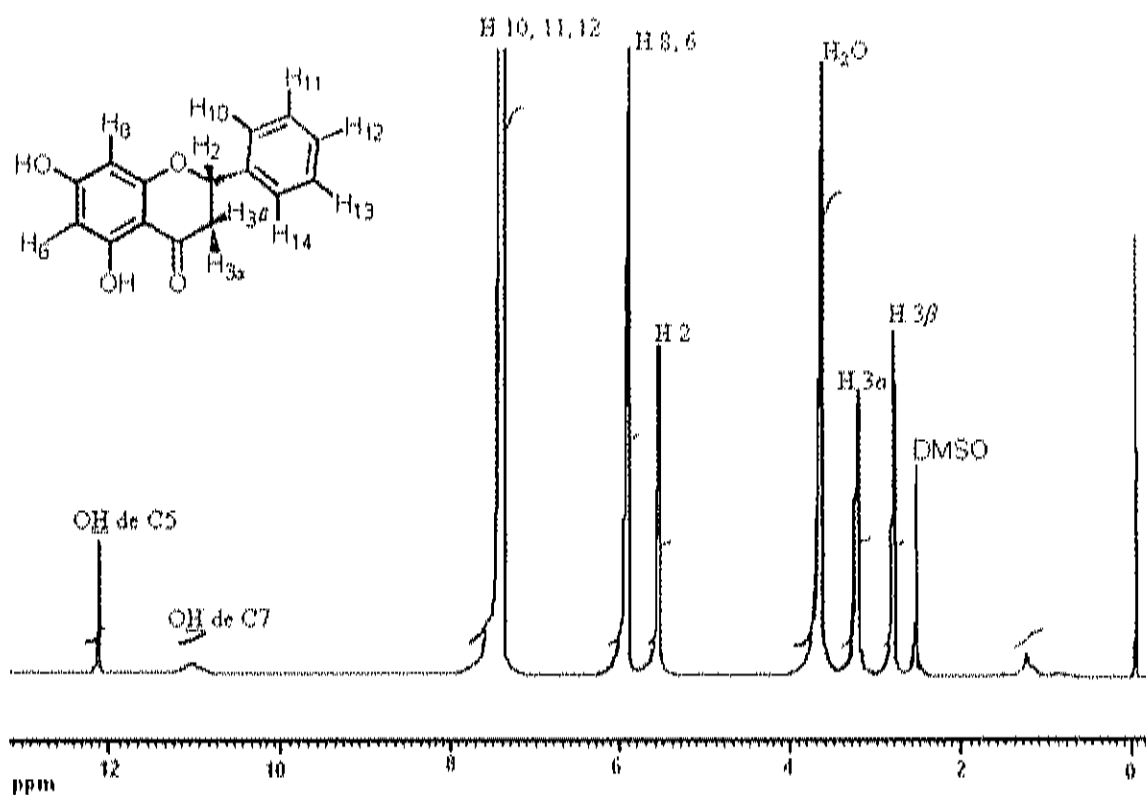


Figura 11. Espectro RMN ^1H del Compuesto 1, en $\text{DMSO-}d_5$ a 25°C , 400 MHz.

El aparente triplete centrado en 7.45 ppm, se debe a dos constantes de acoplamiento ${}^3J_{H_{10,14}H_{11,13}}=7.7$ Hz y ${}^3J_{H_{11,13}H_{12}}=7.7$ Hz, se asignó a los protones H11 y H13. El protón H12, se muestra como un aparente triplete de triples centrado en 7.39 ppm, con constantes de acoplamiento ${}^3J_{H_{12}H_{11,13}}=7.7$ Hz y ${}^4J_{H_{12}H_{10,14}}=1.7$ Hz, experimentos de correlación COSY confirman la asignación, (ver Apéndice 8.3).

Las señales dobles centradas en 6.01 y 5.98 ppm, se asignaron a los protones H8 y H6 respectivamente, ambos protones muestran una constante de acoplamiento de ${}^4J_{HH}=2.1$ Hz, debido al acoplamiento *meta* entre ambos protones.

La señal doble de dobles centrada en 5.56 ppm, con constantes de acoplamiento ${}^3J_{HH}=12.8$ y ${}^3J_{HH}=3.1$ Hz, se asignó al protón alifático H2. La magnitud de estos acoplamientos, indican que H2 interacciona con los protones H3 α en una disposición *anti* y con H3 β en una disposición *gauche* respectivamente, Figura 12b. Este análisis fue confirmado mediante el cálculo de los ángulos diedros (torsionales), utilizando el programa Alltona.³³

Los dos dobletes de dobles centrados en 3.16 y 2.81 ppm, con constantes de acoplamiento de ${}^3J_{HH}=12.8$, ${}^2J_{HH}=17.1$ Hz y ${}^3J_{HH}=3.1$, ${}^2J_{HH}=17.1$ Hz, se asignaron a los protones H3 α y H3 β respectivamente, la constante de acoplamiento del orden de los 17 Hz, es característica de un acoplamiento *geminal*.

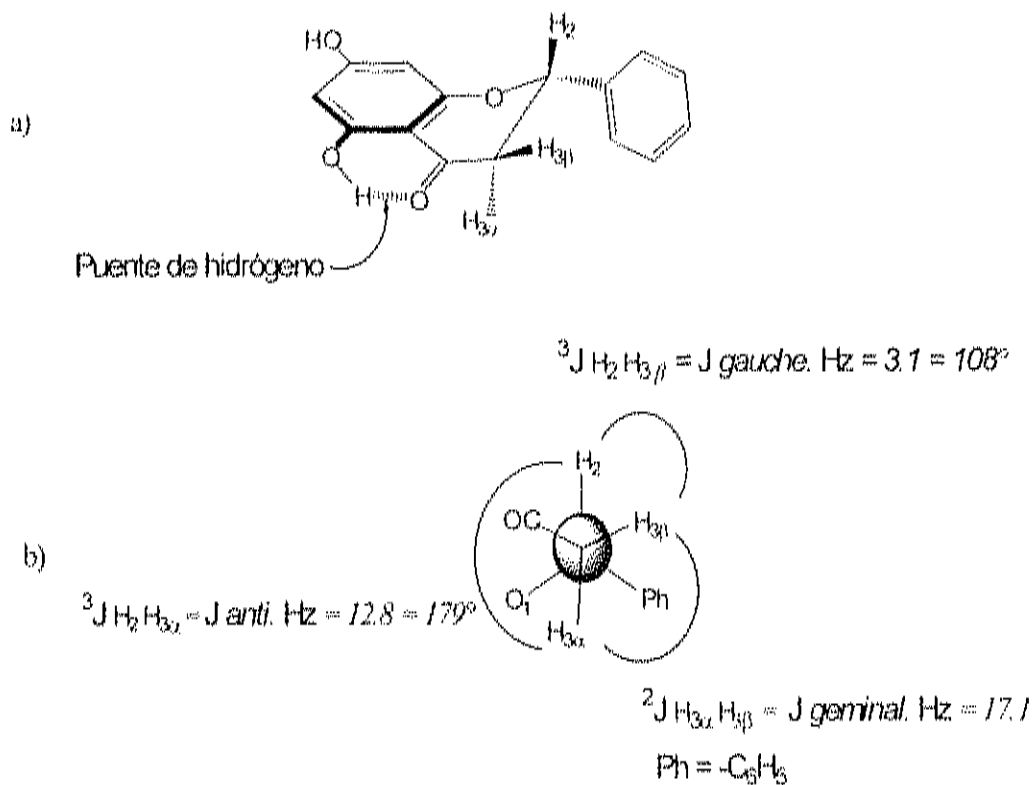


Figura 12. Estructura del compuesto 1 a) con puente de hidrógeno, b) fragmento C2-C3 en proyección de Newman.

El espectro de ^{13}C del compuesto 1 (ver Apéndice 8.4), mostró 13 señales, lo que sugiere la presencia de alguna simetría dentro de la molécula, este hecho está de acuerdo con lo observado en el espectro de protón, por lo que es permisible establecer que dicha simetría se está presentando en el grupo fenilo monosustituido. También, el espectro de ^{13}C , muestra dos señales características de carbonos alifáticos, observándose una señal con desplazamiento químico de 43.65 ppm, la cual se asignó al metileno (C3). Esta asignación, se confirmó a través del experimento de HSQC (ver Apéndice 8.4),

el cual mostró que la señal centrada en 43.65 ppm correlaciona fuertemente con los protones de 3.16 y 2.81 ppm. Mientras que la señal centrada en 80.00 ppm, se asignó al metino (C2), este carbono correlaciona fuertemente con el protón centrado en 5.56 ppm.

La señal más desplazada a campo bajo centrada en 196.78 ppm, se asignó al carbonilo de C4. El espectro de HMBC, mostró que el protón del hidroxilo localizado en C5, presenta una fuerte correlación con C4, esta interacción es una evidencia clara del puente de hidrógeno descrito anteriormente y explica el pobre o nulo intercambio del protón en ausencia de D₂O y adicionalmente confirma la asignación, Figura 12a. Mientras que la señal centrada en 167.44 ppm, se asignó al C7, la asignación inequívoca de C7, se realizó a partir del experimento de HMBC, el cual muestra una correlación fuerte a dos enlaces con los protones H6 y H8, Figura 13a.

Las señales centradas en 165.35 y 164.21 ppm, se asignaron a los carbonos aromáticos C5, C8a. El espectro de HMBC, permitió la asignación inequívoca de C5, ya que el protón H6 correlaciona con C5, así como también con el protón del hidroxilo de C5, Figura 13b. La señal centrada en 140.08 ppm, se asignó al carbono etiquetado como C9. Mientras que la señal centrada en 129.54 ppm, al carbono etiquetado como C11, experimentos de HMBC, confirman esta asignación.

Las señales centradas en 129.47, 127.35, 103.30, 97.03 y 95.98 ppm se asignaron a los carbonos C12, C10, C4a, C6 y C8 respectivamente. El experimento de HSQC confirmó la asignación, (Figura 14).

La simetría observada en el anillo aromático se debe a la alta velocidad de rotación del enlace C2-C9 en relación con la frecuencia de observación del experimento de RMN, lo que conduce a que los carbonos C10 y C14, así como el C11 y C13 den origen a una sola señal respectivamente. De acuerdo a lo anterior es posible establecer que el compuesto 1 posee 15 carbonos.

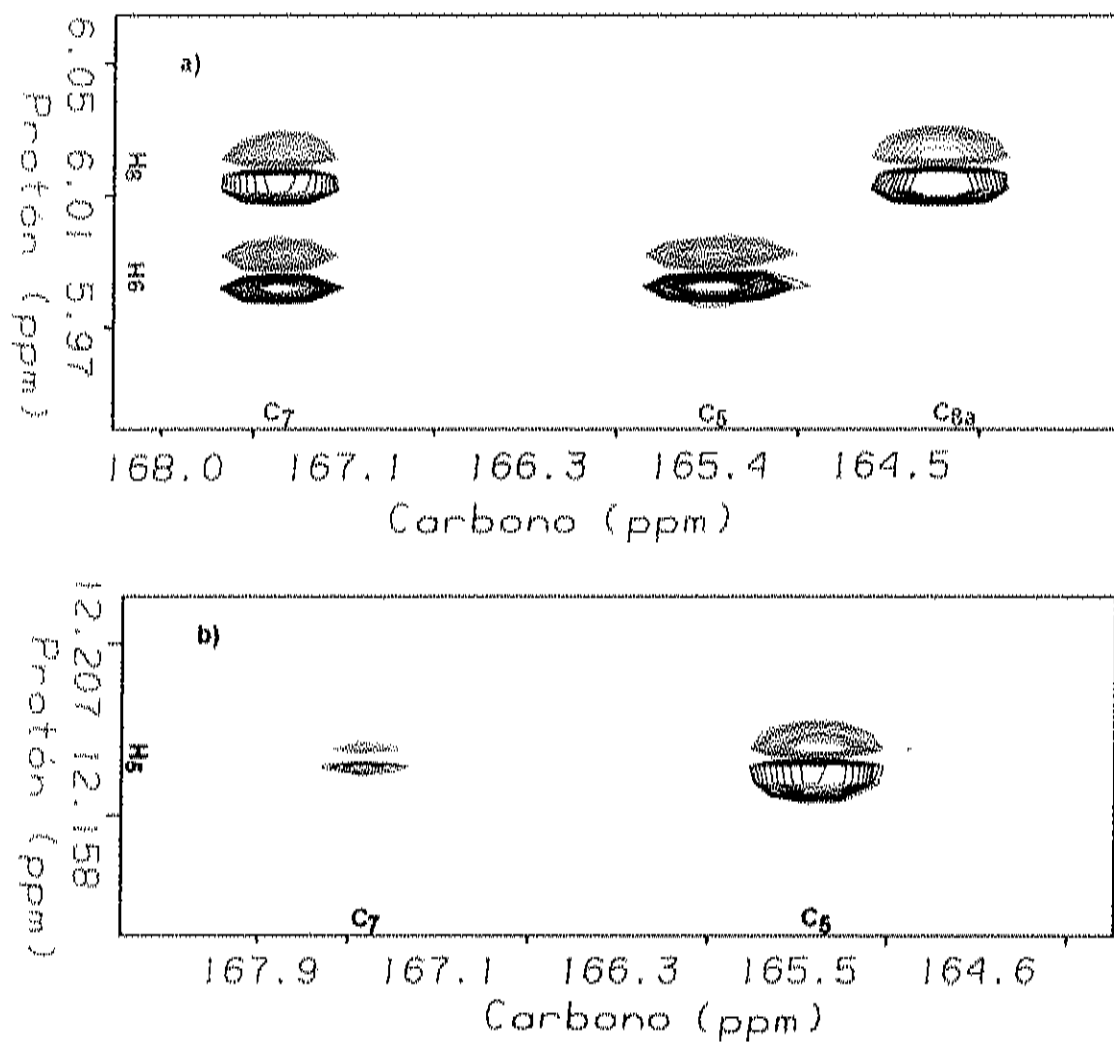


Figura 13. Ampliaciones del espectro de HMBC, del compuesto 1 en Acetona-d₆ a 25 °C.

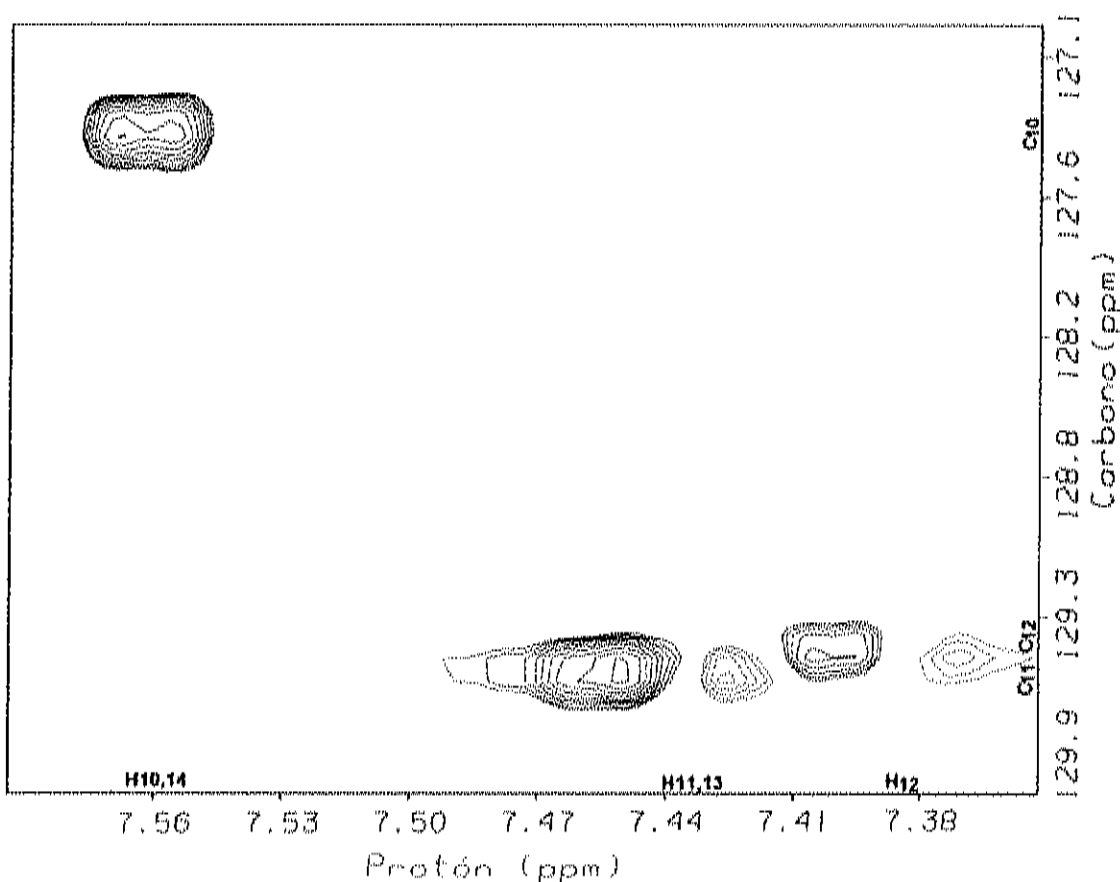


Figura 14. Espectro de HSQC, del compuesto 1 en Acetona-d₆ a 25 °C.

El análisis de espectrometría de masas del compuesto 1 (Figura 15), muestra al ión molecular $M^+=256$ como el más abundante, también se observa la pérdida de una molécula de H₂O dando origen al fragmento $M^+-18=238$. El pico con $m/z=179$ pone en evidencia la pérdida del grupo fenilo ($m/z=77$). Mientras que el ión con $m/z=152$, indica la ruptura de los enlaces O1-C2 y C3-C4, generando el fragmento con $m/z=104$. El patrón de fragmentación está de acuerdo con la estructura propuesta, Figura 16. El espectro de masas confirma la fórmula molecular de C₁₅H₁₂O₄ y un peso molecular de 256.

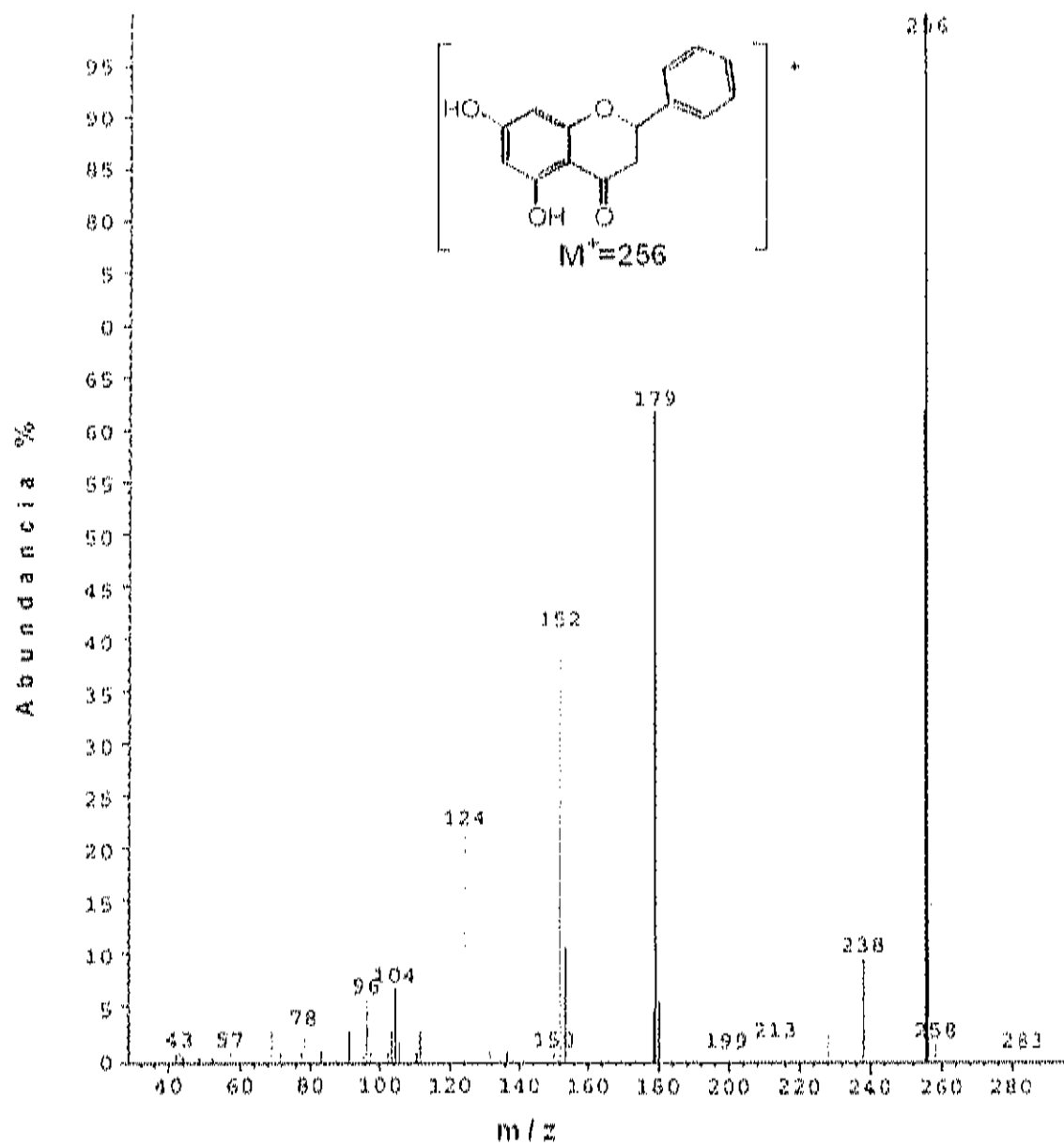


Figura 15. Espectro de masas del compuesto 1.

El espectro de infrarrojo en pastilla de KBr (Figura 17), mostró claramente la presencia de una banda que corresponde al grupo carbonilo de cetona en 1634 cm^{-1} , mientras que la banda de absorción ancha alrededor de 3090 cm^{-1} , es característica de la presencia de grupos hidroxilos.

El punto de fusión del compuesto 1 resultó de $200\text{-}201^\circ\text{C}$ mientras que la literatura lo reporta de $198\text{-}199^\circ\text{C}$ ³⁴. Por otra parte, la rotación óptica específica del compuesto en metanol resultó de -49° , mientras que en la literatura se reporta de -52° .³⁴

La evidencia espectroscópica reunida permitió establecer al compuesto 1, como pinocembrina. Esta flavonona, se ha encontrado en la mayoría de los propóleos provenientes de zonas templadas y se ha asociado con la presencia de árboles de las especies de *Populus* (álamos).¹ Sin embargo, este es el primer reporte, donde se ha encontrado pinocembrina en propóleos producidos en el Estado de Sonora.

Por otra parte, el origen botánico de la pinocembrina puede ser explicado, en base a que las colmenas de donde se colectaron los propóleos analizados, se encuentran cercanas a la cuenca del río Sonora, la cual posee importantes poblaciones de álamos.

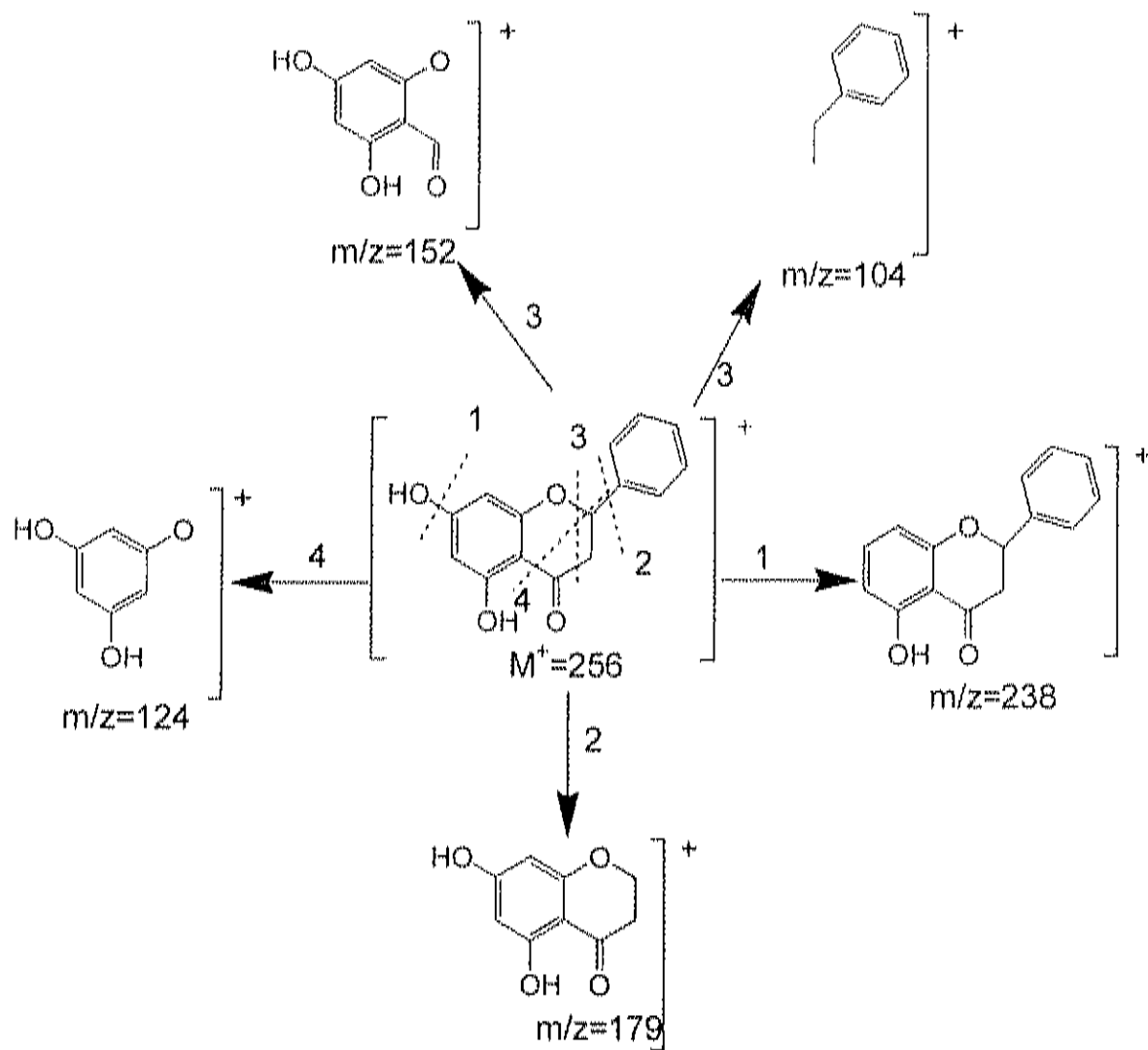


Figura 16. Patrón de fragmentación del compuesto **1**.

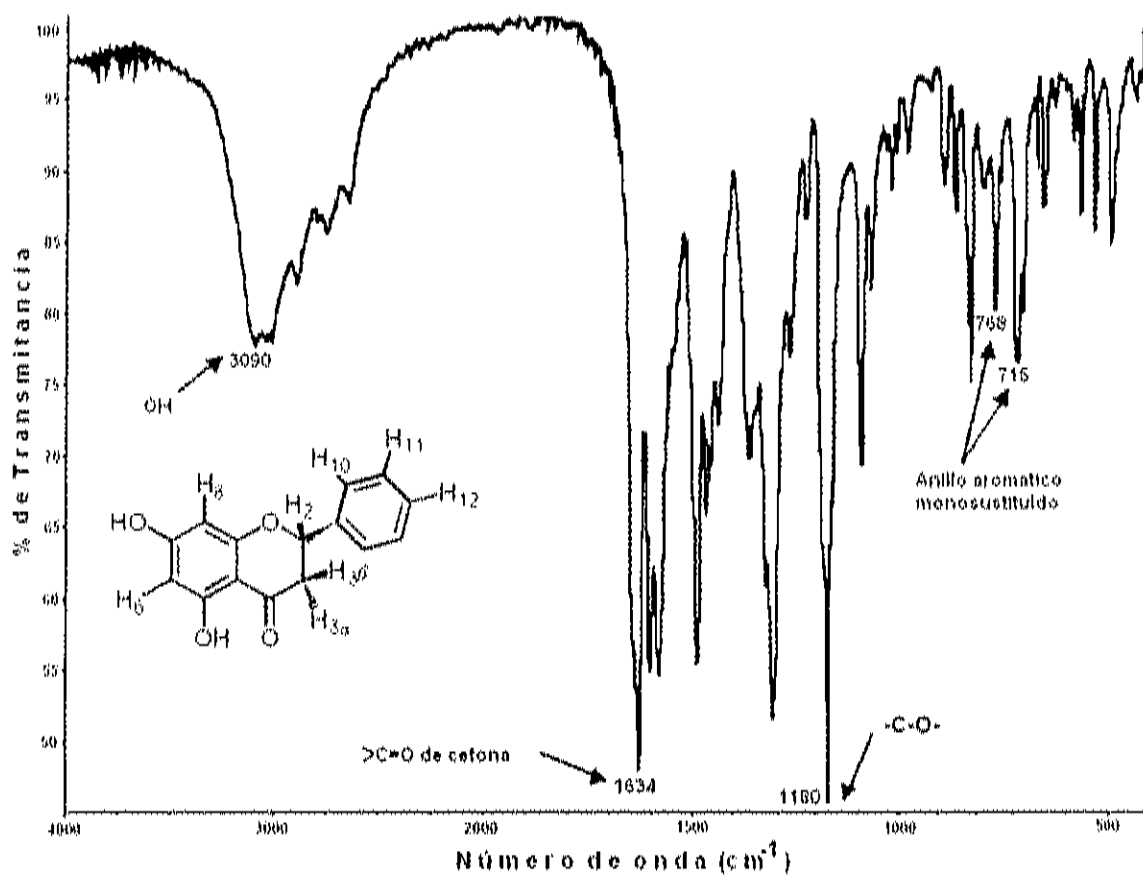


Figura 17. Espectro de IR del compuesto 1 en pastilla de KBr.

5.2.2 3-O-Ac-pinobanksina (2)

El espectro de RMN ^1H del compuesto 2, se muestra en la Figura 18. El análisis de la integral del espectro de ^1H permitió establecer que el compuesto 2, posee 14 protones, de los cuales 5 son de tipo alifático, dos son protones aromáticos altamente protegidos, cinco son protones aromáticos típicos de un grupo fenilo monosustituido y finalmente dos protones son intercambiables con D_2O .

La asignación de cada protón, se realizó a partir del análisis de primer orden de las constantes de acoplamiento. La señal simple y fina a campo bajo, centrada en 11.57 ppm, se asignó al protón del hidroxilo en C5, dicho protón presenta intercambio con deuterio, cuando a la muestra se le adiciona D_2O . Adicionalmente, el protón del hidroxilo en C5, muestra un puente de hidrógeno con el oxígeno de C4 (Figura 19a), este hecho conduce a que este protón se observe como una señal fina.

Así mismo, el espectro muestra una señal ancha en 9.98 ppm, la cual también presenta intercambio con deuterio. Dicha señal se asignó al protón del hidroxilo de C7. Por otra parte, el espectro presenta un grupo de protones aromáticos característicos de un grupo fenilo monosustituido, donde la señal centrada en 7.58 ppm, integra para dos protones y se presenta como dd con una constante de acoplamiento *orto* $^3\text{J}_{\text{HH}}=7.4$ Hz y una *meta* $^4\text{J}_{\text{HH}}=2.0$ Hz, esta señal se asignó a los protones etiquetados como H10 y H14. La señal del

multiplete centrado en 7.46 ppm, se asignó a los protones H11 y H13. El protón H12 se asignó a la señal múltiple centrada en 7.43 ppm.

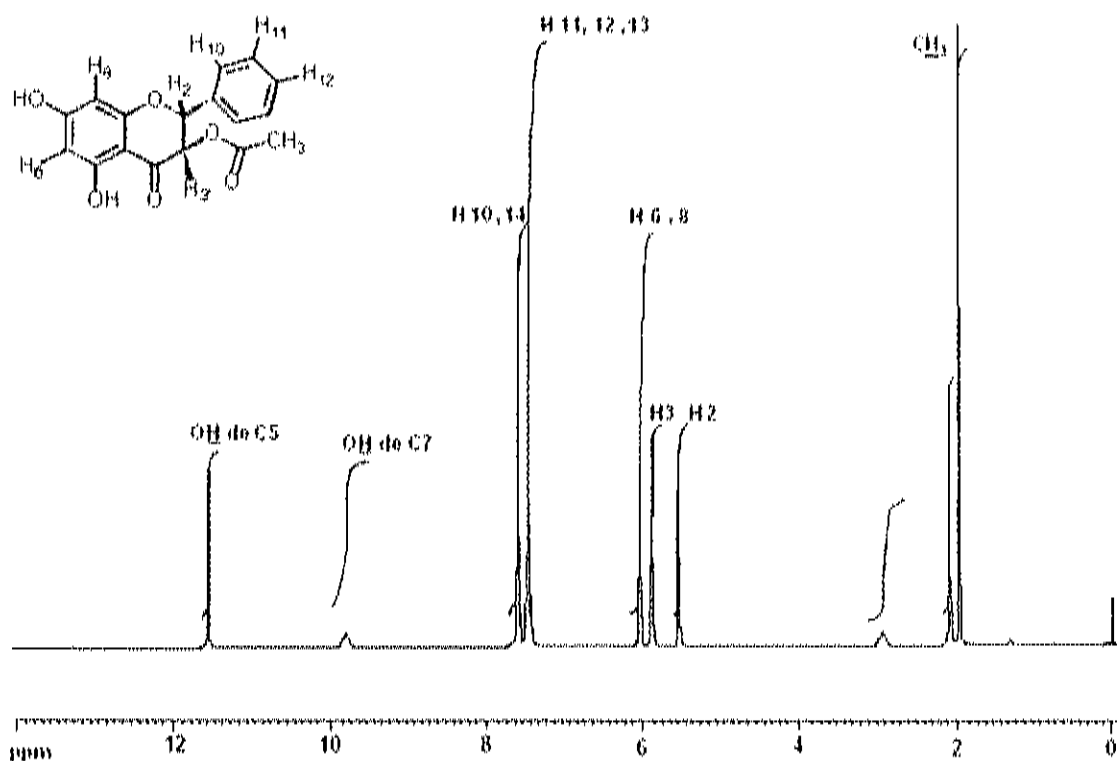


Figura 18. Espectro RMN ¹H del compuesto **2** en CDCl₃ a 25°C, 400 MHz.

Las señales dobles centradas en 6.03 y 6.05 ppm, se asignaron a los protones H8 y H6 respectivamente, ambos protones muestran una constante de acoplamiento de ⁴J_{HH}=2.1 Hz, debido a una interacción *meta* entre ambos.

Las señales dobles centradas en 5.88 y 5.52 ppm, con constante de acoplamiento ³J_{HH}=11.7 Hz, se asignaron a los protones alifáticos H3 y H2

respectivamente. El protón H3, se muestra más desplazado a campo bajo debido al efecto de desprotección del oxígeno del grupo carbonilo adyacente. La magnitud del acoplamiento entre los protones H2 y H3, sugiere que dichos protones se encuentran en una disposición antiperiplanar, permitiendo de esta manera un acoplamiento máximo entre dichos protones, Figura 19b. Este argumento, se confirmó mediante el cálculo del ángulo diedro (torsional) utilizando el programa Altona.³³

Finalmente, la señal desplazada a campo más alto (1.95 ppm), la cual integra para tres protones, se asignó a los protones del metilo del grupo acetilo, localizado en C3. Es importante señalar que el desplazamiento químico de los protones del metilo, se encuentran ligeramente desplazados a campo alto respecto de lo que normalmente se espera (generalmente se observan a campo más bajo >2.1 ppm). Este inusual desplazamiento a campo alto del grupo metilo, puede deberse a que los protones del metilo caen dentro de la corriente diamagnética de protección del anillo aromático localizado en C2 (Figura 20). El análisis preliminar de los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento, sugieren una estructura tipo flavanonol sustituido en C3.

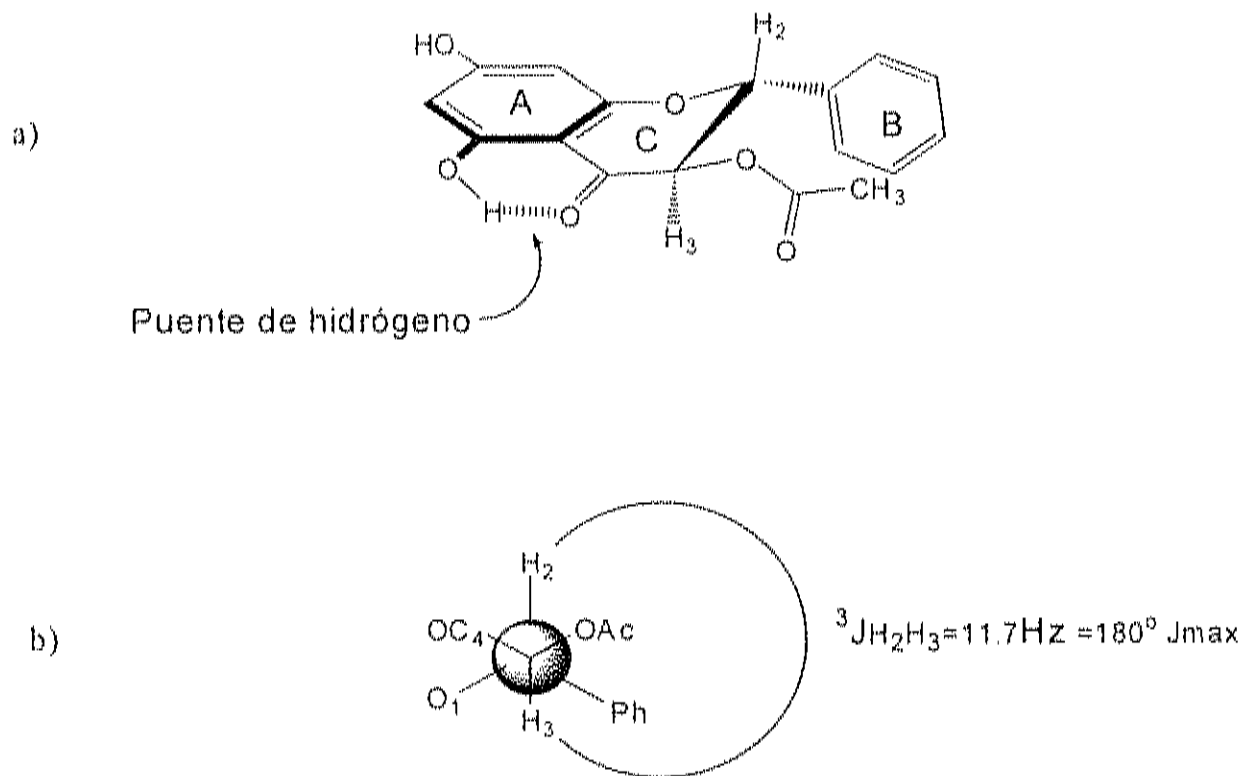


Figura 19. Estructura del compuesto 2 a) con puente de hidrógeno, b) fragmento C2-C3 en proyección de Newman.

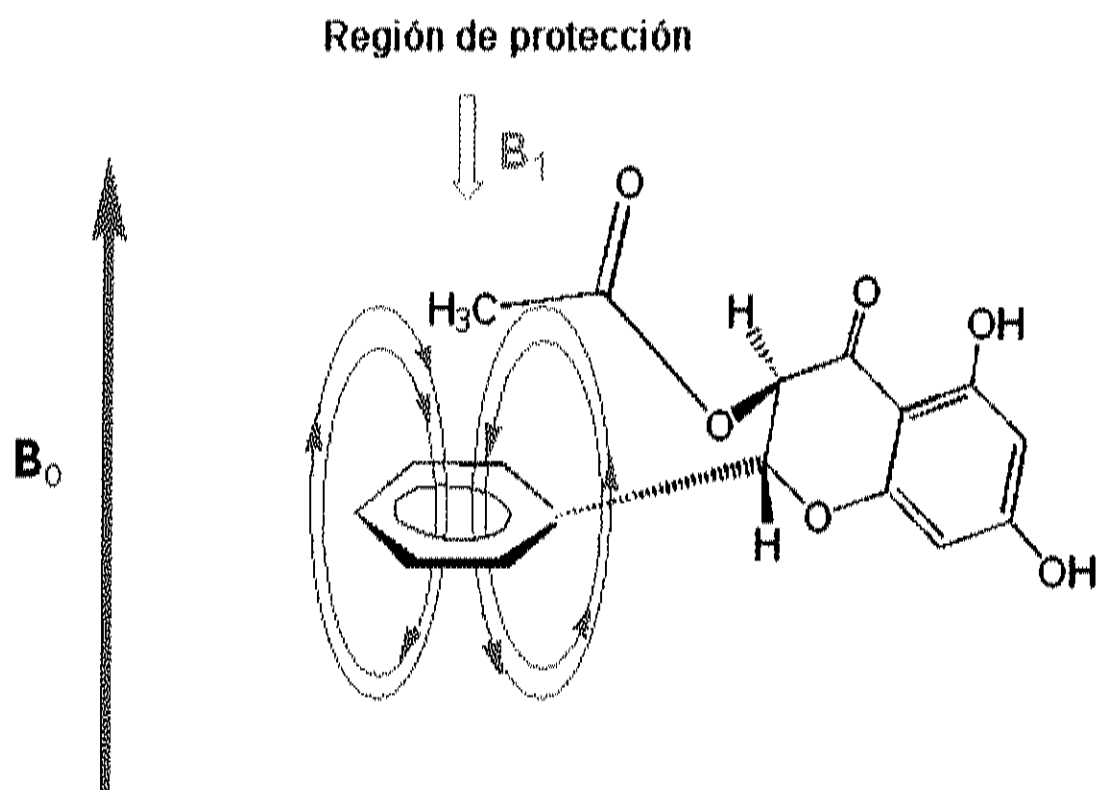


Figura 20. Protección diamagnética del anillo B, en el compuesto 2.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C desacoplado, mostró 15 señales de carbono para el compuesto 2, sugiriendo la presencia de alguna simetría dentro de la molécula. Este hecho, está de acuerdo con lo observado en el espectro de protón, por lo que es permisible establecer que dicha simetría, se este presentando en el grupo fenilo monosustituido.

El espectro de ^{13}C , presenta tres señales características de carbonos alifáticos, observándose una señal a campo alto con desplazamiento químico en 20.25 ppm, la cual se asignó al CH_3 del grupo acetilo. Mientras que las señales centradas en 73.15 y 81.93 ppm, se asignaron a los carbonos C3 y C2 respectivamente. A su vez, la señal más desplazada a campo bajo, centrada en 192.78 ppm, se asignó al carbonilo del anillo C del flavanono. El espectro de HMBC, mostró que el protón del hidroxilo localizado en C5, presenta una fuerte correlación con C4. Esta interacción es una evidencia clara del puente de hidrógeno descrito anteriormente, explicando esto el pobre o nulo intercambio del protón en ausencia de D_2O lo que adicionalmente confirma esta asignación. Mientras que la señal centrada en 169.48 ppm, se asignó al carbonilo del grupo acetilo (C15), la asignación inequívoca de C15, se realizó a partir del experimento de HMBC, el cual muestra una correlación fuerte a dos enlaces con los protones del metilo (Figura 21a). La señal centrada en 168.14 ppm presenta correlación a dos enlaces con los protones H6 y H8, y se asignó al carbono en C7, mientras que la señal centrada en 165.25 ppm, se asignó al

carbono aromático C5, el cual presenta correlación con H6. La señal centrada en 163.69 ppm, presenta una correlación a dos enlaces con el protón H8 y se asignó al carbono etiquetado como C8a, Figura 21b. Estos carbonos muestran un claro efecto de desprotección ocasionado por el fuerte carácter electronegativo de los átomos de oxígeno unidos directamente a ellos. Adicionalmente, el espectro de HMBC, confirmó la asignación inequívoca de C5, ya que el protón del hidroxilo de C5, muestra una fuerte correlación con este carbono, Figura 21c. Mientras que la señal centrada en 102.08 ppm, se asignó al carbono etiquetado como C4a, y la señal centrada en 97.62 ppm, se asignó al carbono C6, ambos carbonos C4a y C6 muestran correlación con el protón del hidroxilo en C5, (ver Apéndice 8.6).

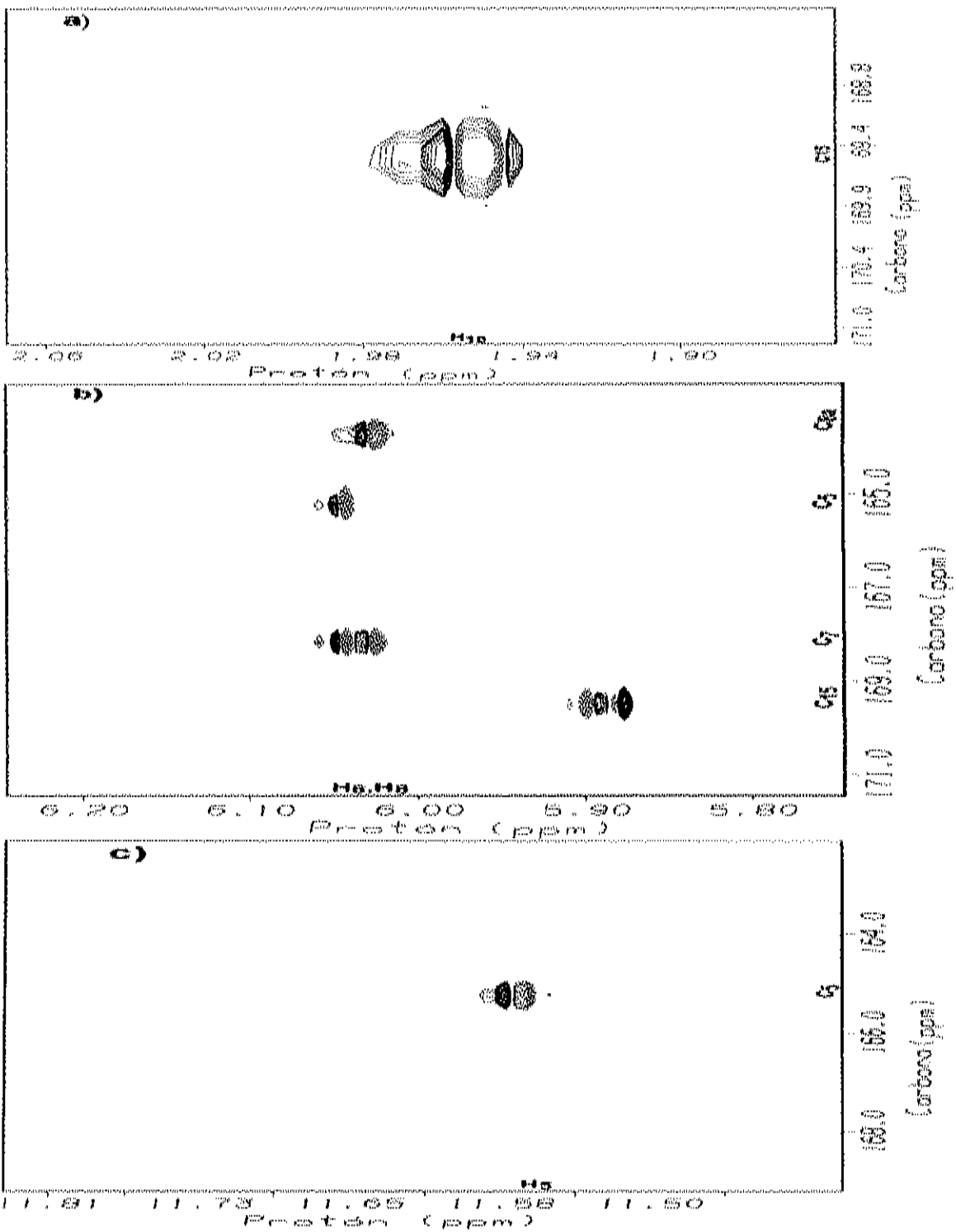


Figura 21. Espectros HMBC del compuesto 2, en Acetona-d₆ a 25 °C.

Las señales centradas en 130.22, 129.49, 128.58 y 96.44 ppm se asignaron a los carbonos C10, C11, C12 y C8 respectivamente. Experimentos de HSQC, mostraron que dicha asignación es correcta, (Figura 22). Debido a la alta velocidad de rotación del enlace C2-C9 en relación con la frecuencia de observación del experimento de RMN, conduce a que los carbonos C10 y C14, así como el C11 y C13 den origen a una sola señal respectivamente. De acuerdo a lo anterior es posible establecer que 2 posee 17 carbonos.

El análisis de espectrometría de masas del compuesto 2 (Figura 23), mostró que el ión molecular M^+ del compuesto 2 tiene una relación masa/carga= $m/z=314$. El patrón de fragmentación está de acuerdo con la estructura propuesta, Figura 24. El espectro de masas confirma la fórmula molecular de $C_{17}H_{14}O_6$ y un peso molecular de 314.

El espectro de infrarrojo en pastilla de KBr Figura 25, mostró claramente la presencia de dos carbonilos, una banda que corresponde al carbonilo del éster en 1757 cm^{-1} y una banda que corresponde al carbonilo de la cetona en 1636 cm^{-1} , la banda ancha alrededor de 3193 cm^{-1} , son características de los grupos hidroxilos. El punto de fusión para el compuesto 2 resultó de $177\text{-}180\text{ }^\circ\text{C}$, mientras que en la literatura se reportan $173\text{-}175\text{ }^\circ\text{C}$.³⁵ Por otra parte, la rotación óptica específica del compuesto en metanol fue de $+44.75^\circ$, mientras que en la literatura se reporta de $+42^\circ$.³⁵

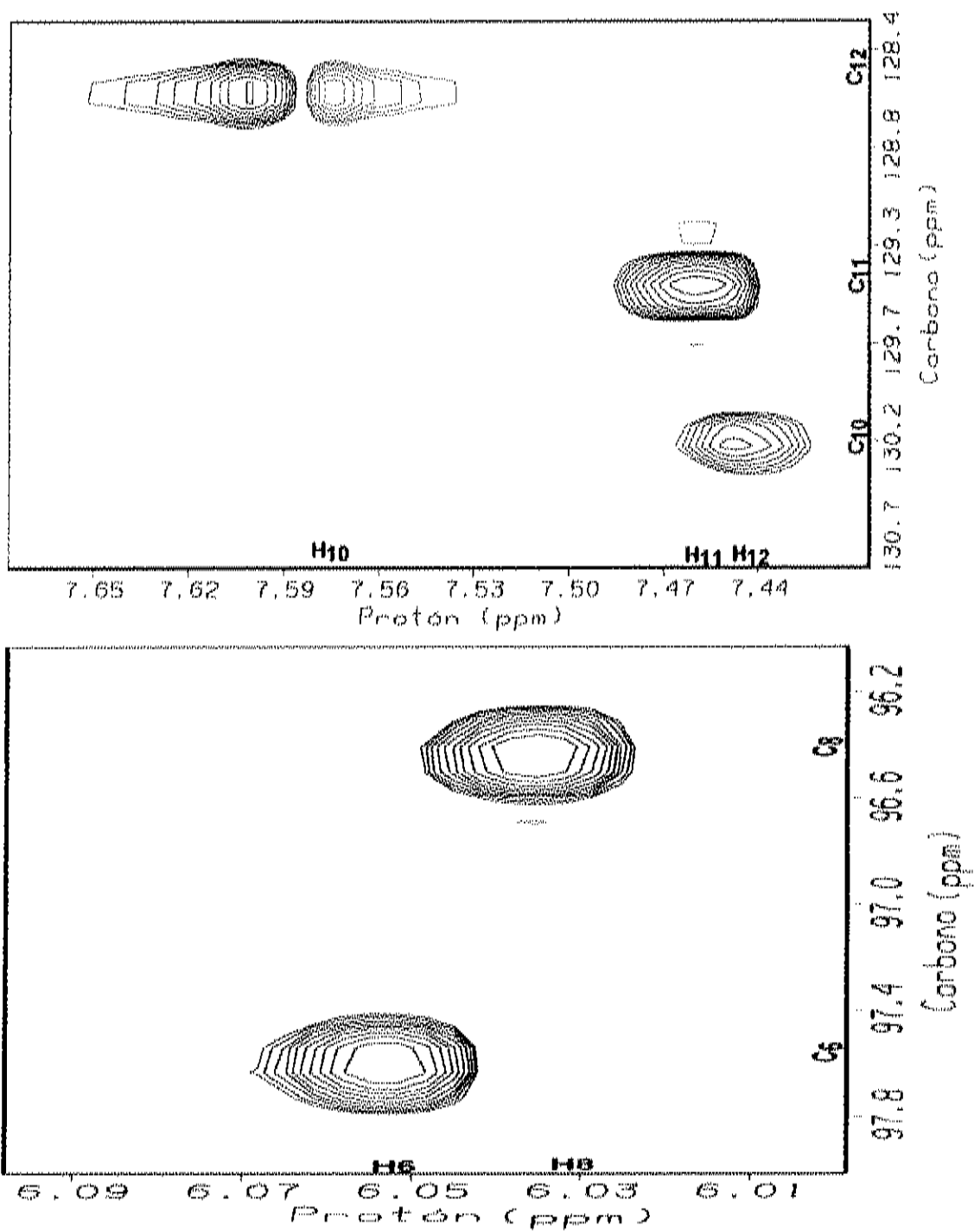


Figura 22. Espectros HSQC del compuesto **2** en Acetona-d₆ a 25 °C.

La evidencia espectroscópica reunida permitió establecer que el compuesto 2, es un derivado acetilado de la pinobanksina (3-O-Ac-pinobanksina).

Este compuesto, al igual que el compuesto 1, se ha encontrado en la mayoría de los propóleos provenientes de zonas templadas, y también se ha asociado con la presencia de árboles de las especies de *Populus* (álamos).¹ Este es el primer reporte donde se ha encontrado 3-O-Ac-pinobanksina en propóleos producidos en el Estado de Sonora. Por otra parte, el origen botánico de la 3-O-Ac-pinobanksina, puede ser explicado en base a los mismos argumentos dados para el caso de la pinocembrina.

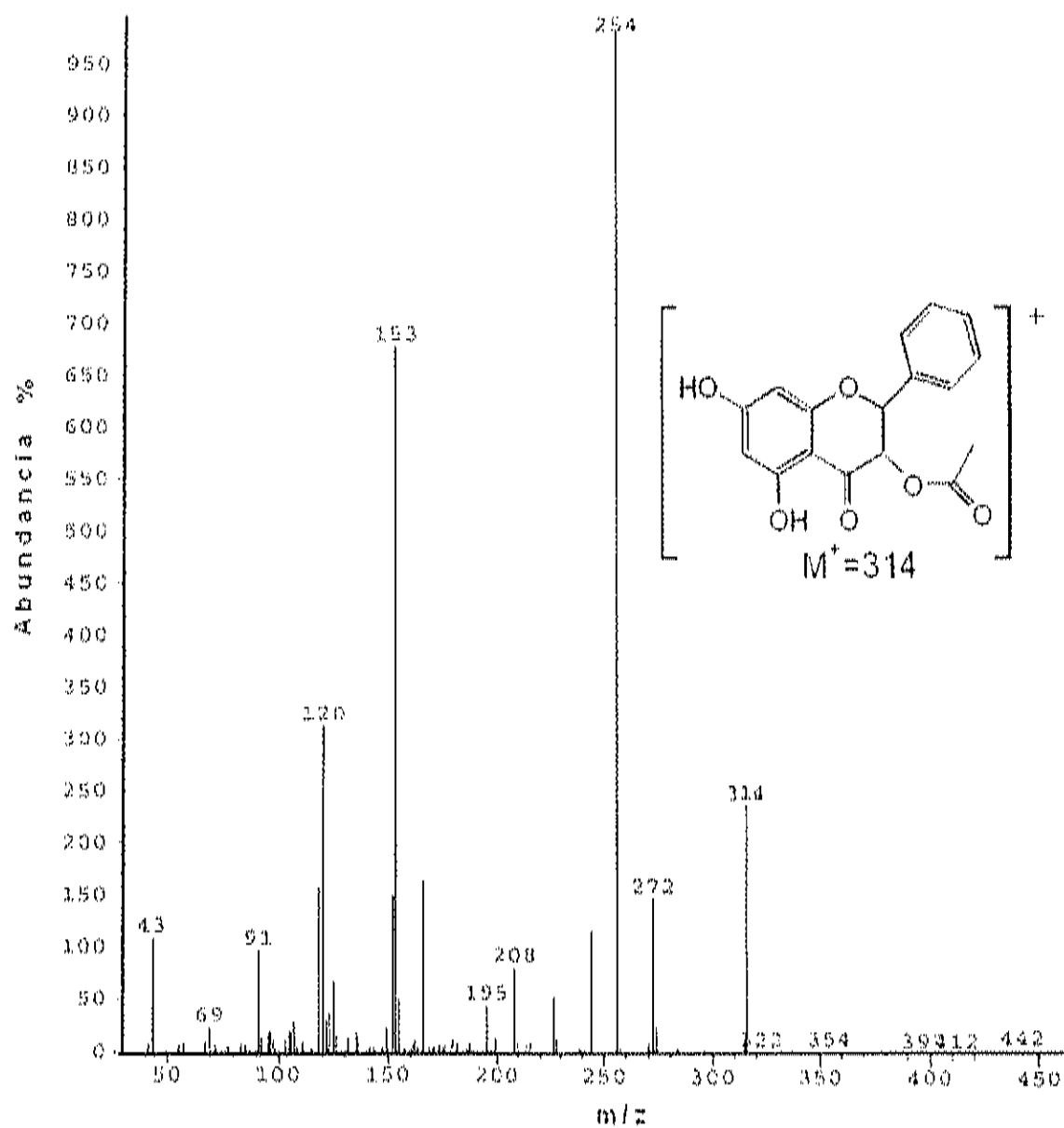


Figura 23. Espectro de masas del compuesto 2

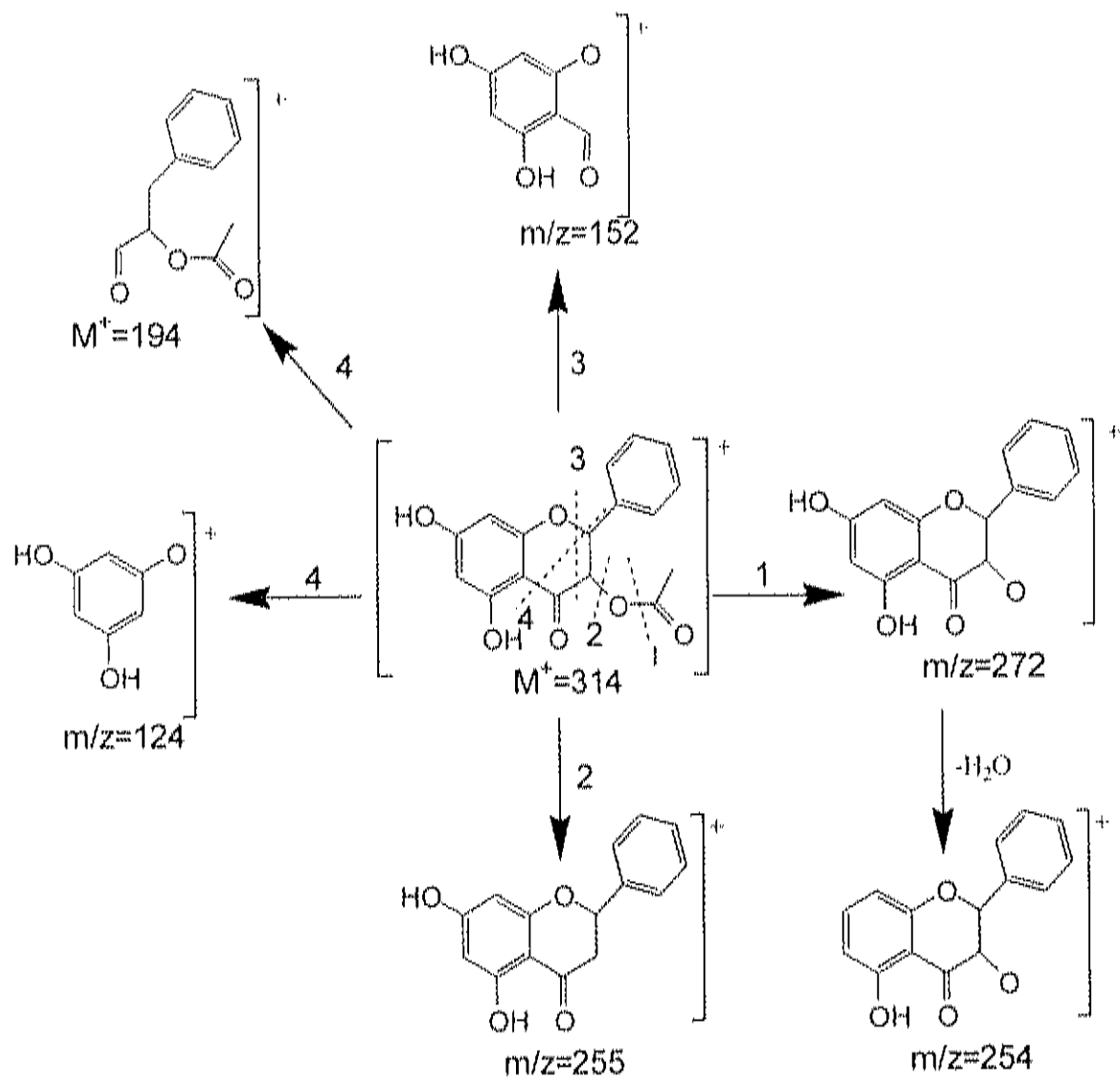


Figura 24. Patrón de fragmentación del compuesto 2.

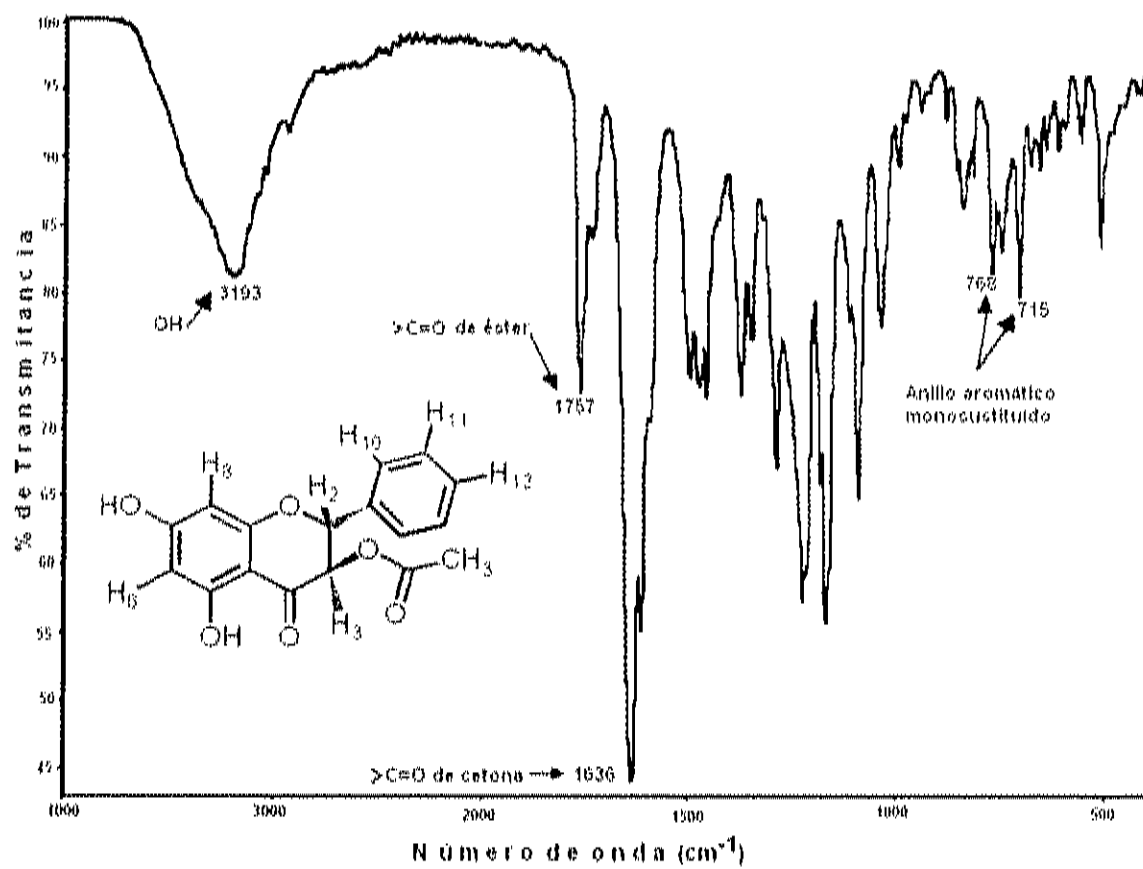


Figura 25. Espectro de IR del compuesto **2** en pastilla de KBr.

5.2.3 Crisina (3)

La caracterización del compuesto 3, se realizó a partir del análisis del espectro de RMN ^1H (Figura 26), así como de la comparación de los tiempos de retención con una muestra auténtica mediante HPLC. (Apéndices 8.7) El análisis de la integral del espectro de ^1H , permitió establecer que el compuesto 3, posee diez protones, de los cuales 7 son de tipo aromático (dos protones se encuentran altamente protegidos, y cinco protones aromáticos típicos de un grupo fenilo monosustituido), uno vinílico, y finalmente dos protones intercambiables con D_2O .

La asignación de cada protón, se realizó a partir del análisis de primer orden de las constantes de acoplamiento. La señal simple y fina a campo bajo, centrada en 12.82 ppm, se asignó al protón del hidroxilo en C5, dicho protón presenta intercambio con deuterio, cuando a la muestra se le adiciona D_2O . Asimismo se observa una señal ancha en 9.64 ppm, la cual también presenta intercambio con deuterio. Dicha señal se asignó al protón del hidroxilo de C7.

El espectro presenta un grupo de protones aromáticos característicos de un grupo fenilo monosustituido, donde la señal múltiple centrada en 8.06 ppm, integra para cinco protones, esta señal se asignó a los protones etiquetados como H10 y H14. Mientras que el multiplete centrado en 7.57 ppm, se asignó a los protones H11-H13. La señal simple centrada en 6.78 ppm, se asignó al protón vinílico H3.

Las señales dobles centradas en 6.53 y 6.23 ppm se asignaron a los protones H8 y H6 respectivamente, ambos protones muestran una constante de acoplamiento de $^4J_{HH}=2.0$ Hz, debido a una interacción *meta* entre ambos

El análisis de los desplazamientos químicos de 1H , así como de las constantes de acoplamiento, están de acuerdo con datos previamente reportados para este compuesto, por lo que la estructura propuesta para el compuesto 3 es correcta, Figura 27.²

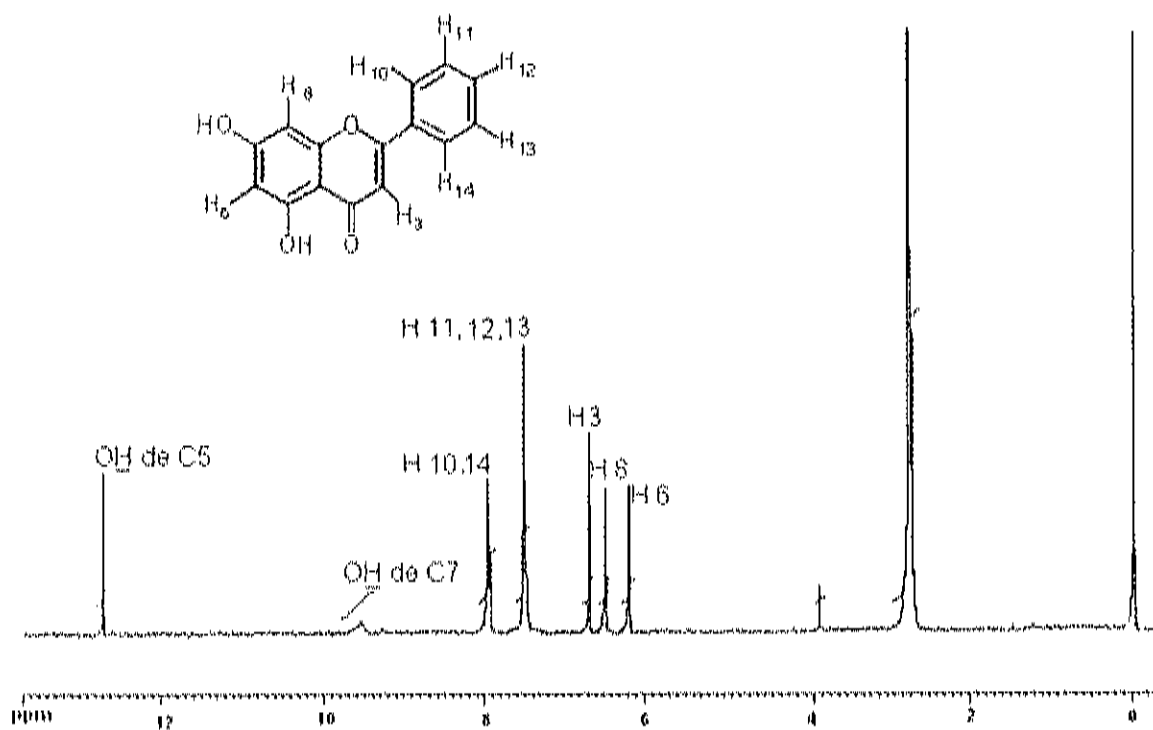


Figura 26. Espectro de RMN 1H del compuesto 3, en acetona- d_6 a 25 °C.

Debido a la baja cantidad aislada del compuesto 3, no se realizaron los experimentos de RMN ^{13}C , HMBC, HSQC. Sin embargo, se comparó con una muestra auténtica mediante HPLC, donde se observó que el compuesto 3, presenta el mismo tiempo de retención (52.88 min) que la crisina comercial (Apéndice 8.6). Debido a esta evidencia, no se realizaron mayores esfuerzos de purificación de los propóleos para obtener una mayor cantidad de crisina.

Este compuesto, al igual que el compuesto 1 y 2, se ha encontrado en la mayoría de los propóleos provenientes de zonas templadas, y también se ha asociado con la presencia de árboles de las especies de *Populus* (álamos).¹ Este es el primer reporte, donde se ha encontrado Crisina en propóleos producidos en el Estado de Sonora. En base a estos resultados, es posible argumentar que el origen botánico de los propóleos colectados en los alrededores de Ures, Sonora, proviene de los árboles de álamos.

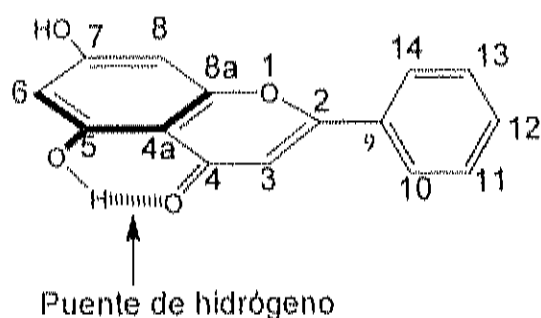


Figura 27. Estructura del compuesto 3.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

1. Se determinó que los flavonoides pinocembrina y 3-O-Ac-pínobanksina son los principales componentes de tipo fenólico presente en los propóleos colectados en la región de Ures, Sonora.
2. Se logró el aislamiento y la caracterización espectroscópica mediante RMN ^1H , ^{13}C , IR y EM de tres compuestos: pinocembrina, 3-O-Ac-pínobanksina y crisina.
3. Se logró el aislamiento del compuesto uresin, responsable en buena medida de la actividad antiproliferativa de los propóleos sonorenses.
4. Se estableció que los propóleos producidos en el Estado de Sonora, poseen importante actividad antiproliferativa.
5. Se estableció que la línea celular M12. A^k, es una línea celular útil para evaluar la actividad antiproliferativa de propóleos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. *Apidologie*, **2000**, *31*, 3-15 y referencias citadas.
2. Greenaway, W.; May, J.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R.; F.R.S. *R. Soc. London*, **1987**, *232 B*, 249-272.
3. Grunberger, D.; Benerjee, R.; Eisinger, K.; Oltz, E. M.; Efros, L.; Caldwell, M.; Estevez, V.; Nakanishi, K. *Experientia*, **1988**, *44*, 230-232.
4. Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Yoshie, S. L.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. *Journal of Ethnopharmacology*, **2002**, *80*, 67-73.
5. Valikova, M.; Bankova, V.; Sorkum, K.; Popov, S.; Kujumgiev, A. *Mellifera*, **2001**, *1-1*, 57 –59.
6. Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A. G. *Z. Naturforsch*, **2002**, *57c*, 530-533.
7. Usia, T.; Banskota, A. H.; Tazuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 673-676.
8. Tomás-Barberán, F. A.; García-Viguera, C.; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F. *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 1, 191-196.
9. Popova, M.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Naydenski, C.; Vides, S. M. *Z. Naturforsch.* **2001**, *56c*, 1108-1111.

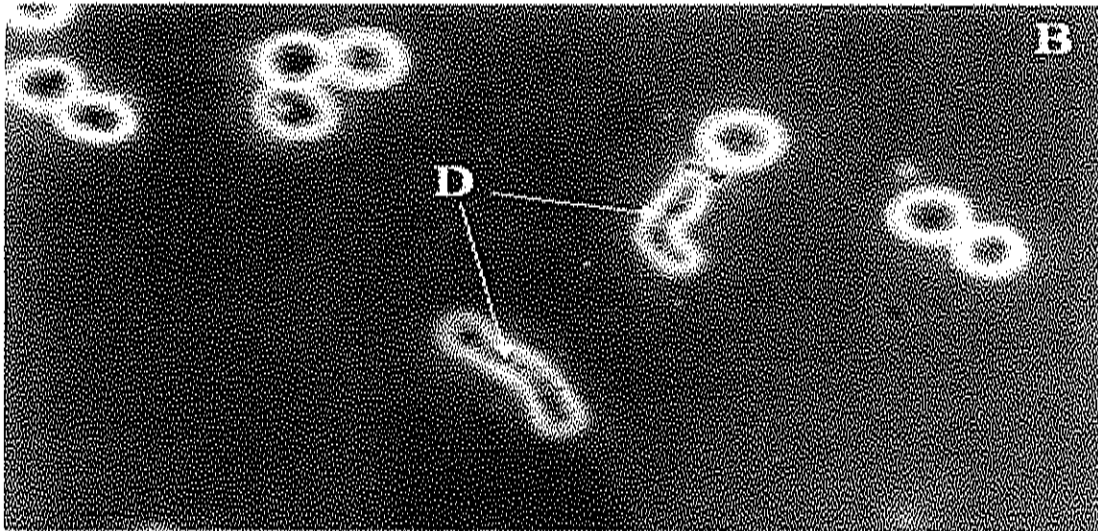
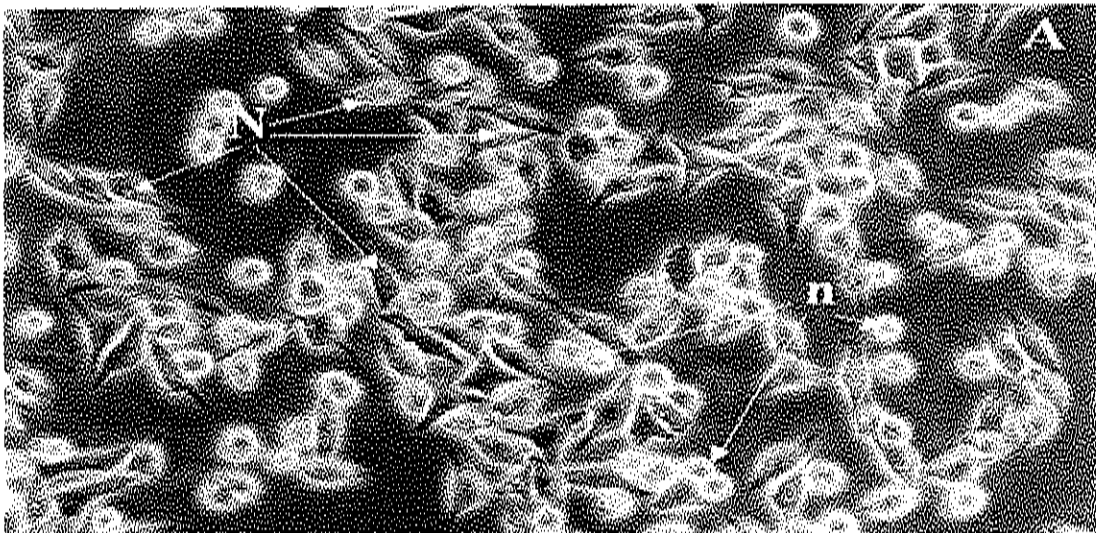
10. Bankova, V.; Nikolova, N.; Marcucci, M. *Z. Naturforsch.* **1996**, *51c*, 735-737.
11. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 896-900.
12. Valcic, S.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 771-775.
13. Cuesta-Rubio, O.; Cuellar-Cuellar, A.; Rojas, N.; Velez-Castro, H.; Rastrelli, L.; Aquino, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1013-1015.
14. Wollenweber, E.; Buchmann, S. L. *Z. Naturforsch.* **1997**, *52c*, 530-535.
15. Evan, G. I.; Vousden, K. H. *Nature*, **2001**, *411*, 342-348.
16. Ponder, B. A. J. *Nature*, **2001**, *411*, 336-341, y ref. 21.
17. Estrada, J. *Med. Chem.* **2000**, *43*, 1975-1985.
18. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037
19. a) Santos, F. A.; Bastos, E. M. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. A.; Braga, F. C. *J. Ethnopharmacology*. **2002**, *80*, 1-7. b) Bankova, V.; Christov, R.; Kujumgiev, A.; Marcucci, M. C.; Popov, S. *Z. Naturforsch.* **1995**, *50c*, 167-172. c) Bankova, V.; Marcucci, M.C.; Simova, S.; Nikolova, N.; Kujumgiev, A.; Popov, S. *Z. Naturforsch.* **1996**, *51c*, 277-280. d) Nieva-Moreno, M. I.; Isla, M. I.; Cudmani, N. G.; Vattuone, M. A.; Sampietro, A. R. *J. Ethnopharmacology*. **1999**, *68*, 97-102. e) Sforcin, J. M.; Fernandes Jr, A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C. *J.*

- Ethnopharmacology*. **2000**, *73*, 243-249. f) Marcucci, M.C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantes, A.P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. *J. Ethnopharmacology*. **2001**, *74*, 105-112. g) Hagazi, A. G.; Abd El Hady, F. K. Z. *Naturforsch.* **2002**, *57c*, 395-402.
20. a) Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. *J. Ethnopharmacology*. **1999**, *64*, 235-240. b) Murad, J. M.; Calvi, S. A.; Soares, A. M. V. C.; Bankova, V.; Sforcin, J. M. *J. Ethnopharmacology*. **2002**, *79*, 331-334.
21. a) Islas, M. I.; Nieva, Moreno M. I.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. *J. Ethnopharmacology* **2000**, *76*, 165-170. b) Hagazi, Ahmed G.; Abd El Hady, Faten K. Z. *Naturforsch.* **2002**, *57c*, 395-402.
22. a) Ito, J.; Chang, F-R.; Wang, H-K.; Park, Y. K.; Ikagaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K. H.. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1278-1281.;b) Fesen, M. R.; Kohn, K. W.; Leteurtre, F.; Pommier, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2399-2403.
23. Natarajan, K.; Singh, S.; Burke, Jr. T. R.; Grunberger, D.; Aggarwal, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 9090-9095.
24. Banskota, A. H.; Nagaoka, T.; Yoshie, S. L.; Tezuka, Y.; Awale, S.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. *J. Ethnopharmacology*, **2002**, *80*, 67-73.
25. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 896-900.

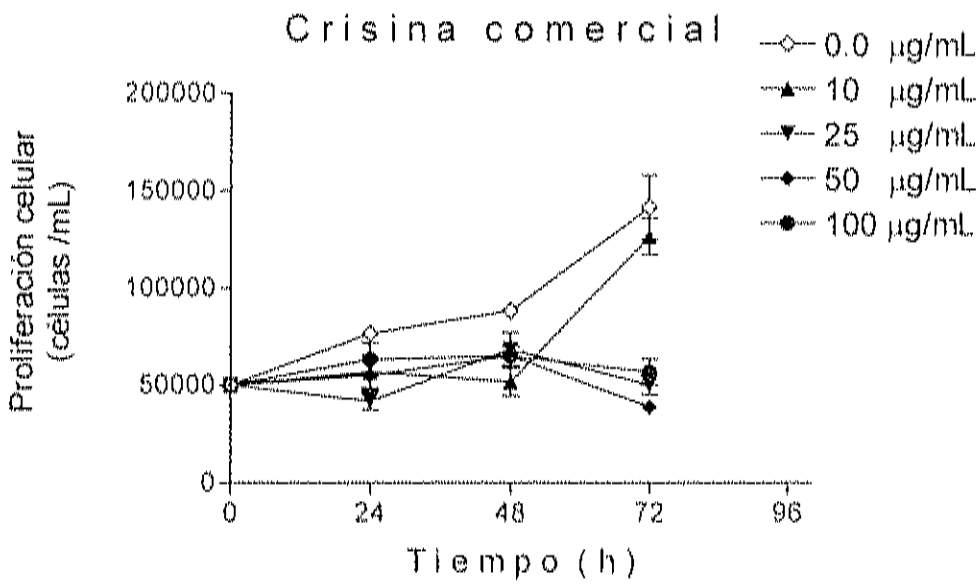
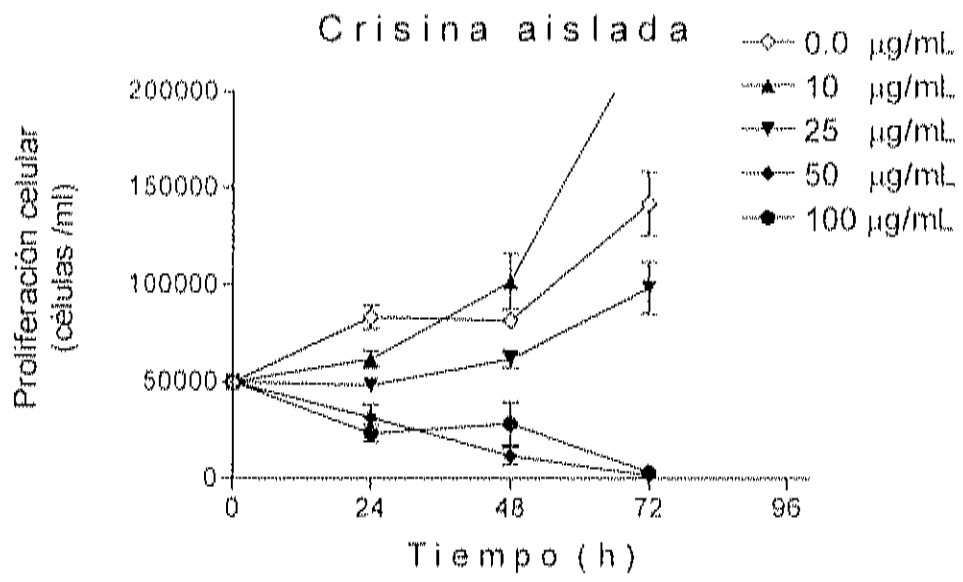
26. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1277-1279.
27. Hirota, M.; Matsuno, T.; Fujiwara, T.; Sugiyama, H.; Mineshita, S. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 366-370.
28. Usia, T.; Banskota, A. H.; Tazuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 673-676.
29. Chen, C.-N.; Wu, C.-L.; Shy, H.-S.; Lin, J.-K. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 503-506.
30. <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/recuperacion/recuperacion03.htm>
31. <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/ArtemisiaLudoviciana.html>
32. Martos, I.; Ferreres, F.; Yao, L.; D'arcy, B.; Caffin, N.; Tomas-Barberan, F.A. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 4744-4748
33. M. Carlos.; Cerda-Garcia-Rojas, L.; Zepeda, G.; and Joseph-Nathan P. *Tetrahedron Computer Methodology.* **1999**, *3*, 113.
34. Fukui, Hiroshi. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **1988**, *V36(10)*, 4174-4176
35. Fang, Jim Min. *Phytochemistry.* **1988**, *V27(5)*, 1395-1397.

8. APÉNDICE

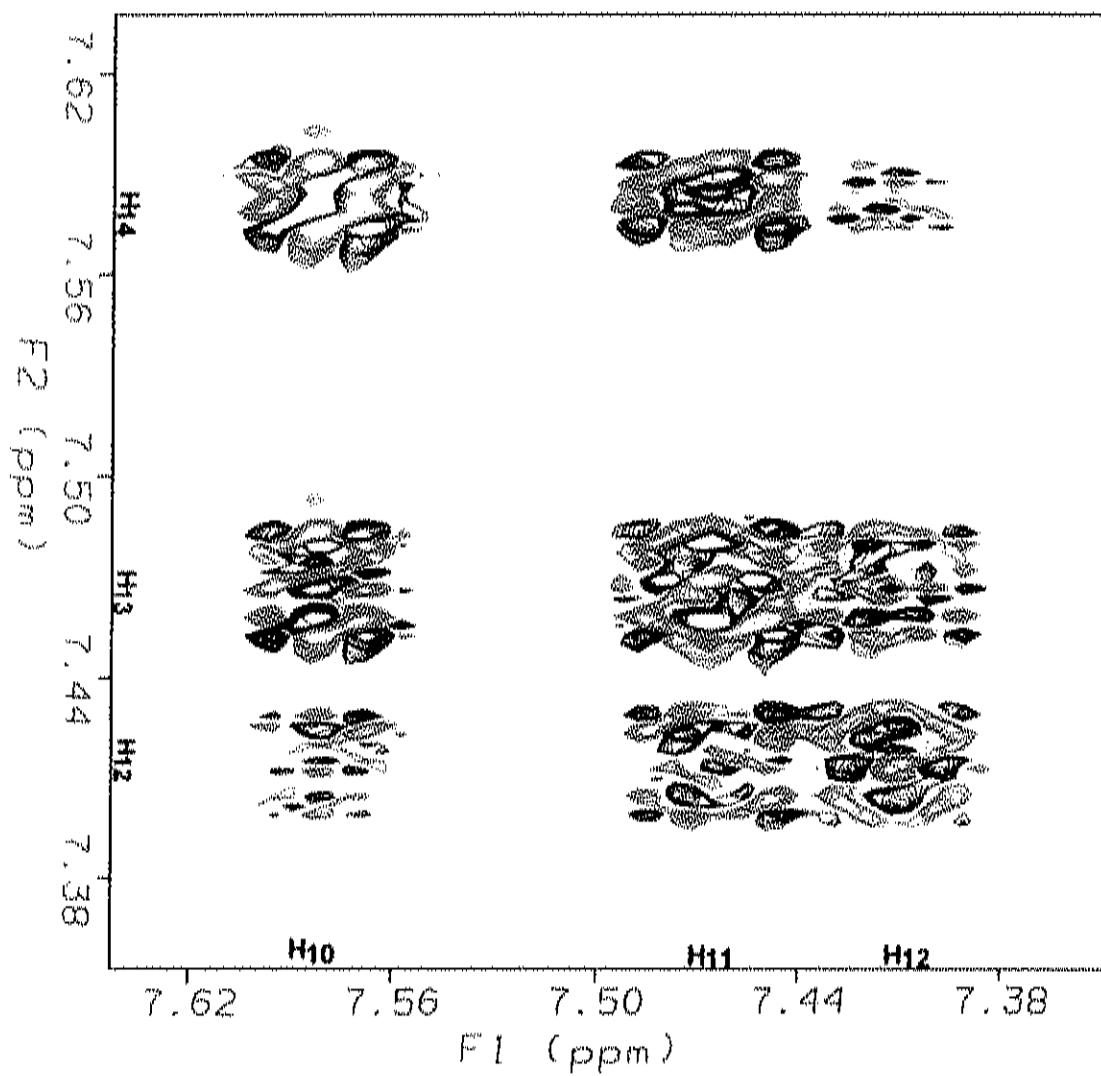
8.1 Efecto sobre la morfología de microcultivos de Células M12.A^K. Fotografías en contraste de fases: **A** células control (20X) **B** células incubadas 24 h con extracto metanólico de propóleos (40X). **N** Células normales adheridas a la caja de cultivo, **n** Células normales en suspensión. **D** Células con morfología alterada sin núcleos definidos.



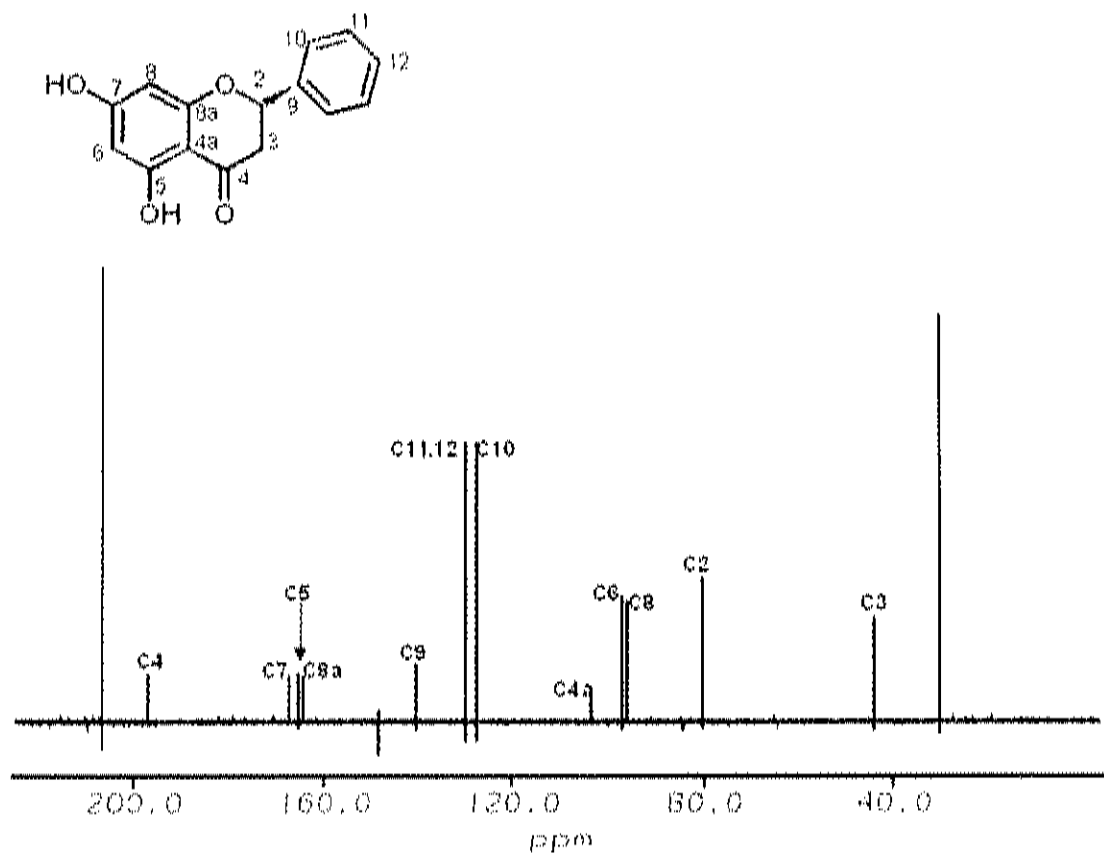
8.2 Actividad Antiproliferativa de Crisina Comercial y Crisina Aislada.



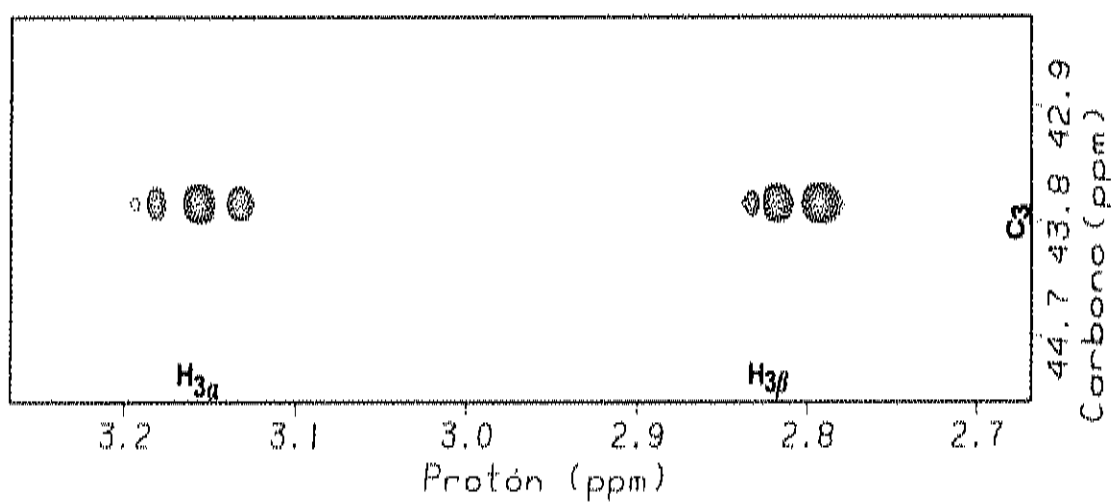
8.3 Experimento de Correlación COSY del Compuesto 1.



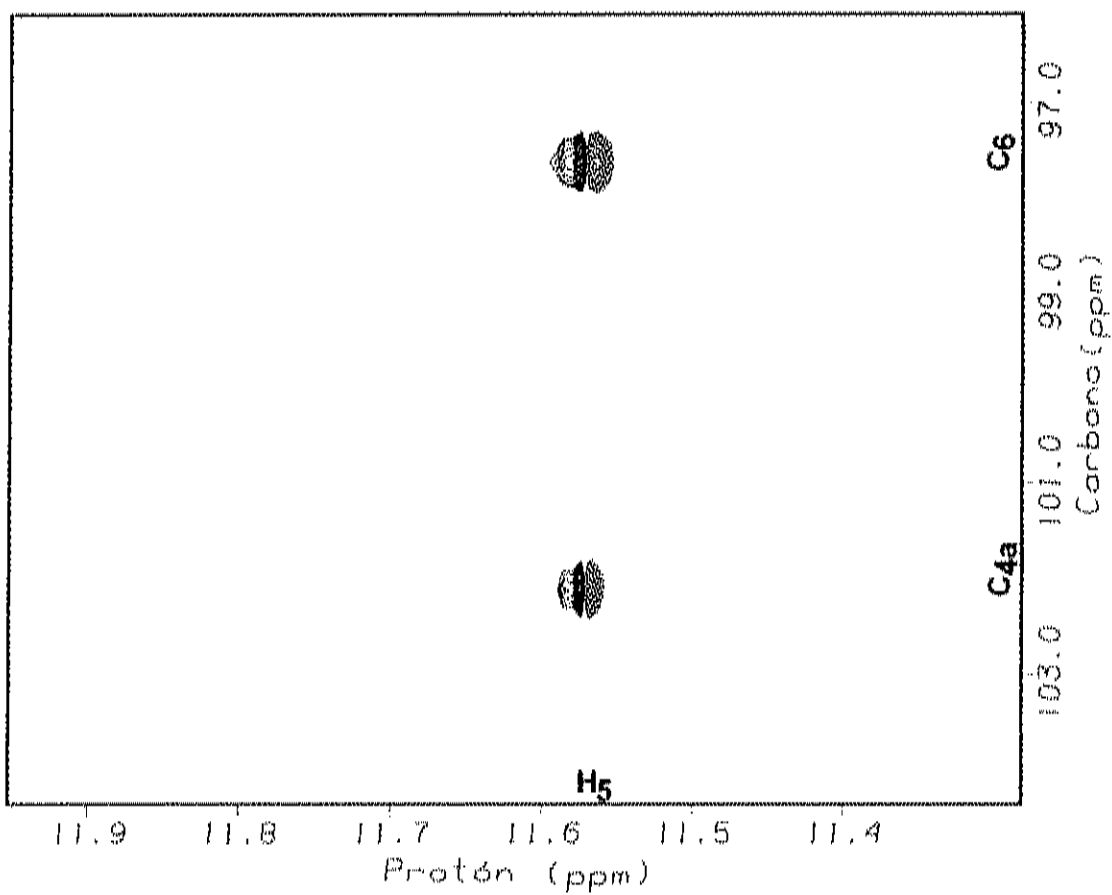
8.4 Espectro de RMN ^{13}C del Compuesto 1 en Acetona- d_6 , 150 MHz.



8.5 Experimento de Correlación HSQC del Compuesto 1.



8.6 Experimento de Correlación HMBC en el Compuesto 2.



8.7 Cromatograma HPLC del Compuesto 3

