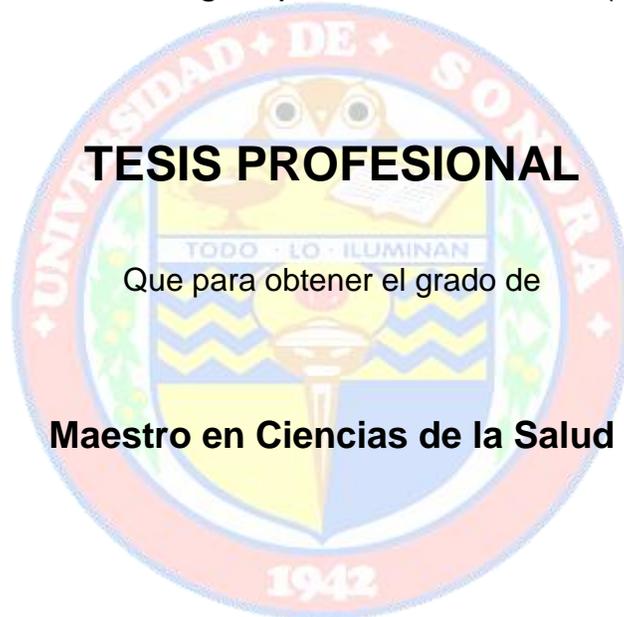


# UNIVERSIDAD DE SONORA

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

“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA OBTENIDOS DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE *Stegnosperma halimifolium* (Benth, 1844)”



## TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias de la Salud**

Presenta

**Salvador Enrique Meneses Sagrero**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



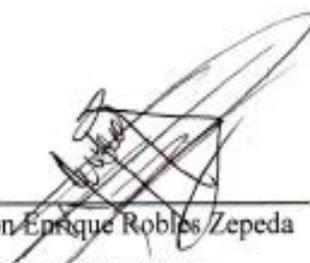
**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



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

## FORMATO DE VOTO APROBATORIO

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de **Salvador Enrique Meneses Sagrero**, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



---

Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda  
Director Académico



---

M.C. Moisés Navarro Navarro  
Secretario



---

Dr. Eduardo Ruiz Bustos  
Vocal



---

Dra. Carmen Lizette del Toro Sánchez  
Suplente

**Agradecemos el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto: “Identificación y caracterización química y biológica de compuestos con actividad anticancerígena de plantas de la etnofarmacopea sonorenses” (Clave Conacyt 83462).**

## DEDICATORIA

Este trabajo de tesis no es solo un conjunto de resultados, este escrito contiene el esfuerzo, la dedicación y la entrega puesta durante estos últimos 2 años, no solo representa un requisito para obtener el grado de maestría, significa un paso más hacia mi desarrollo profesional, una meta más cumplida, conocimiento no solo en el ámbito académico también en el personal, es la prueba de que por más difícil o imposible que parezca un objetivo, la determinación y la voluntad siempre nos ayudara a salir adelante.

Este trabajo de tesis sólo se lo puedo dedicar a las personas que siempre han estado conmigo, las personas más importantes para mí y las que se han convertido en el motor que me impulsa a superarme y cumplir mis metas: mi familia.

A mi madre; Luz, que siempre ha estado a mi lado, que me aguanta y escucha, gracias por enseñarme a luchar por mis objetivos y no darme por vencido, por nunca perder la fe en mí, y por ser la mujer más importante y a la que siempre le estaré agradecido.

A mis hermanas; Diana, Adriana y Patricia, por todo el apoyo y la confianza que me brindaron durante mi trayecto durante la maestría, por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A mis cuñados; Adrián, Luis y Marco, por todas las alegrías, experiencias y buena vibra.

A mis niños, Fernanda, Mateo y Nirvana, por darme la dicha de conocer la experiencia de ser tío, y dar alegría a nuestra familia.

A mi familia del D.F., Tía Mary, Tío Tomas, Tío Ángel, July, Paco, Marlene, Tío Hugo y Tía Carmen, por todo el apoyo y cariño que me expresaron durante mi estancia.

A mi papá, por hacer de mí una persona de bien, gracias por todas tus enseñanzas.

*“Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda del sacrificio”*

***Simón Bolívar***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por llenarme de salud y vida, por permitirme cumplir una meta más junto a mis seres queridos.

Al Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda por brindarme su invaluable apoyo, confianza y paciencia, por abrirme las puertas en esta área y darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis.

A los miembros del comité sinodal, el M.C. Moisés Navarro Navarro, el Dr. Eduardo Ruiz Bustos y la Dra. Lizette del Toro por todo su apoyo, disponibilidad, comentarios, sugerencias y consejos durante mi estancia en el posgrado.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada y su equipo de trabajo: Chayo, Patty, Adriana, Rafa, Ada y Jorge, muchas gracias por todo el apoyo, tiempo, experiencias y conocimiento compartido durante mi estancia su laboratorio de la UNAM.

A mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de nuestra alma mater: Alex Urrea, Mariana, Wenses, Isaac, Dra. Jackie, Mtra. Edna, Heriberto, Raúl, Lili, Sergio, Judas y a nuestro discípulo Ramón, por su compañerismo, todos los buenos momentos y experiencias durante el tiempo que hemos estado en el laboratorio.

A mis amigos dentro del lab: Polly, Mario, Humberto, Sarahí, a mis “primas” Ana Karenth, Lili Pz y fuera de este: Sergio, Emanuel, Reynaldo, Lorena, José, Alex, Juanito, Edith y Dulce, muchas gracias por su entrañable amistad, por su apoyo incondicional y su infinita confianza.

A la Dra. Luisa, muchas gracias por apoyarme prácticamente desde el inicio de esta aventura, dentro y fuera del laboratorio, por tus consejos, confianza, aprecio y valiosa amistad.

A mis compañeros de generación de maestría, por compartir buenos momentos y su conocimiento.

Y a todas las personas que por motivo de extensión sería difícil de citar, muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>OBJETIVOS</b> .....	x
General.....	x
Particular.....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
Cáncer.....	3
Historia del Cáncer.....	3
Estadística del Cáncer.....	4
Desarrollo del Cáncer.....	5
Plantas Medicinales y Metabolitos Secundarios.....	9
Agentes Anticancerígenos Derivados de Plantas.....	13
Plantas Medicinales de Sonora y Actividad Antiproliferativa.....	15
Género <i>Stegnosperma</i> y Estudios de Actividad Biológica.....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
Obtención del Extracto Metanólico.....	20
Obtención de Fracciones Químicas.....	20
Cultivo Celular y Líneas Celulares.....	21
Determinación de la Actividad Antiproliferativa.....	21
Separación de Fracciones por Métodos Cromatográficos.....	22
Elucidación Estructural de Compuestos.....	22
Análisis Estadístico.....	23
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	24
Obtención de los Extractos Metanólicos y Fracciones Químicas.....	24

Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de los Extractos Metanólicos de <i>Stegnosperma halimifolium</i> Mediante el Ensayo MTT.....	24
Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Químicas Obtenidas del Extracto Metanólico del Tallo de <i>Stegnosperma halimifolium</i> ...	27
Perfil Fitoquímico Cualitativo de las Fracciones Químicas del Extracto Metanólico de Tallo de <i>S. halimifolium</i> .....	29
Separación Cromatográfica de la Fracción Química de Hexano y Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549.....	32
Separación de las Fracciones Cromatográficas 7, 9, 10 y 11.....	34
Caracterización Estructural de la Fracción Cromatográfica 8 Obtenida de la Fracción Química de Hexano.....	35
Espinasterol y Actividad Biológica.....	44
Actividad Antiproliferativa del Espinasterol.....	45
<b>CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	51
<b>REFERENCIAS</b> .....	52
<b>ANEXOS</b> .....	58

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>I</b>	Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de <i>Stegnosperma halimifolium</i>	26
<b>II</b>	Actividad antiproliferativa de las fracciones químicas obtenidas del extracto metanólico del tallo de <i>Stegnosperma halimifolium</i>	28
<b>III</b>	Evaluación de las fracciones cromatográficas obtenidas de la fracción química de hexano en la línea celular A549	33
<b>IV</b>	Desplazamientos químicos de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C del compuesto espinasterol	37

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	Proceso de la carcinogénesis	7
<b>2</b>	Metabolismo secundario de las plantas	11
<b>3</b>	Agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales	14
<b>4</b>	<i>Stegnosperma halimifolium</i>	18
<b>5</b>	Estructura química del esterolespinasterol	38
<b>6</b>	HSQC de la FxC 8	39
<b>7</b>	Experimento COSY del compuesto obtenido de la FxC 8, espinasterol	41
<b>8</b>	Experimento HMBC del compuesto espinasterol	41
<b>9</b>	Experimento DEPT 135 del compuesto aislado de la FxC 8, espinasterol	42
<b>10</b>	Espectro de masas del compuesto aislado de la FxC 8, espinasterol	43
<b>11</b>	Actividad antiproliferativa del compuesto espinasterol	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
A.C.	Antes de Cristo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
°C	Grados centígrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COSY	Correlación estructural
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
ER	Receptor de Estrógenos
H <sub>2</sub> O	Agua
HCl	Ácido Clorhídrico
HMBC	Correlación Cuántica Múltiple Heteronuclear
HSQC	Correlación Cuántica Simple Heteronuclear
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria al 50 %
kD	KiloDalton
KOH	Hidróxido de potasio
LPS	Lipopolisacárido
µg/mL	Microgramos sobre mililitro
mL	Mililitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl) – 2,5difeniltetrazolio
nm	Nanómetros
NaOH	Hidróxido de sodio
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

SFB	Suero fetal bovino
TLC	Cromatografía de capa fina
UMA	Unidades de Masa Atómica
UV	Ultravioleta

## **OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar los compuestos químicos del extracto metanólico de *Stegnosperma halimifolium* con actividad antiproliferativa contra las líneas celulares M12.C3.F6, RAW 264.7, HeLa, A549 y L-929.

### **Particulares**

- a) Determinar la actividad antiproliferativa del extracto metanólico y las fracciones de *Stegnosperma halimifolium* sobre las líneas celulares M12.C3.F6, RAW 264.7, HeLa, A549 y L-929.
- b) Elucidar la composición química de los compuestos de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Stegnosperma halimifolium*.

## RESUMEN

Aproximadamente el 60% de la población mundial depende enteramente de las plantas para curar sus afecciones, mismas que han sido reconocidos como una fuente de medicinas terapéuticas. El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, tiene una larga historia, ya sea usándolas como terapia alternativa o en la investigación de fármacos a partir de plantas medicinales. En estudios previos, se demostró que el extracto metanólico de la planta *Stegnosperma halimifolium* posee actividad antiproliferativa frente a líneas celulares cancerosas como M12.C3.F6, RAW 264.7 y HeLa, sin embargo, se desconocen los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los compuestos químicos del extracto metanólico de *Stegnosperma halimifolium* con actividad antiproliferativa contra líneas celulares. Se recolectó e identificó la muestra de *S. halimifolium*, se elaboraron extractos metanólicos de las partes aéreas (tallo y hoja), el extracto metanólico del tallo fue purificado por medio de extracciones con solventes de distinta polaridad y la fracción de hexano con cromatografía en columna y monitoreada por cromatografía en capa fina. La elucidación del compuesto espinasterol, fue realizada con técnicas estructurales como espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protón, carbono y bidimensional. Los extractos metanólicos, fracciones químicas, fracciones cromatográficas y el compuesto espinasterol fueron evaluados para determinar la actividad antiproliferativa por medio del método estandarizado del MTT. Se obtuvieron los extractos metanólicos de tallo, hoja y una combinación de tallo y hoja, de los cuales, el extracto del tallo mostró la mejor actividad antiproliferativa, con un valor de IC<sub>50</sub> de 118 µg/mL frente a la línea celular RAW 264.7. Se obtuvieron las fracciones de hexano, acetato de etilo y etanol a partir de éste, donde la fracción de hexano mostró una mayor actividad en las líneas celulares A549 y RAW 264.7 con valores de IC<sub>50</sub> de 68.6 y 65.9 µg/mL respectivamente, y la fracción de acetato de etilo en las líneas celulares M12.C3.F6 y RAW 264.7 con valores de IC<sub>50</sub> de 78.4 y 50.8 µg/mL respectivamente. Se obtuvieron 16 fracciones cromatográficas a partir de la

fracción de hexano, donde las fracciones cromatográficas 7, 9, 10 y 11 mostraron la mejor actividad frente a la línea celular A549 con valores de  $IC_{50}$  de 60.45, 63.4, 55.22 y 57.39  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. De la fracción cromatográfica 8 se obtuvo el compuesto espinasterol, el cual mostró actividad frente a la línea celular HeLa con valores de  $IC_{50}$  entre los 100.0 – 50.0  $\mu\text{g/mL}$ . Los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa se encuentran en la parte no polar del extracto metanólico, donde el esterol espinasterol es uno de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran cantidad de procesos infecciosos, patológicos y degenerativos, que afectan la salud de los seres humanos. Entre estos procesos destaca el cáncer, que mantiene un alto índice de mortalidad a nivel mundial. Algunas sustancias; (drogas y/o agentes químicos) son extraídas de distintas especies de plantas como compuestos bioactivos, los cuales poseen una destacable actividad biológica, y son ampliamente utilizados en medicina para el tratamiento de diversas enfermedades, como cáncer y diabetes (Asanga y col., 2013).

El cáncer se origina cuando las células en alguna parte del cuerpo comienzan a proliferar de manera descontrolada, debido a la acumulación de alteraciones génicas y epigenéticas en las células, así como la intervención de factores extrínsecos no genéticos que agregan más complejidad al inicio y progresión de las células cancerosas. Esta enfermedad tiene uno de los índices más altos de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, por lo que se considera un problema de salud pública, destacando entre los tipos de cáncer más comunes el pulmonar, gástrico y mamario (Martin de Civetta y Civetta, 2011; Valdespino y Valdespino, 2011; OMS, 2015).

Las plantas tienen una larga historia en el tratamiento del cáncer; actualmente muchas personas que padecen esta enfermedad desean someterse a terapias conocidas como alternativas con productos de uso tradicional. De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (Laza y col., 2003; Ocegueda y col., 2005).

Las plantas también suministran la mayoría de los ingredientes activos de los productos en medicina tradicional, y los extractos de plantas han sido utilizados en programas de cribado en compañías farmacéuticas e institutos universitarios. Se estima

que existen alrededor de 250,000 especies de plantas en el mundo y que probablemente solo al 10% de éstas le ha evaluado algún tipo de actividad biológica (Harvey, 2000).

Nuestro país cuenta con una amplia gama de plantas medicinales usadas en la medicina tradicional, utilizadas por nuestros antepasados, quienes se valían de ellas para curar sus afecciones. Entre ellas se encuentra *Stegnosperma halimifolium*, conocida comúnmente como chapacolor. Estudios previos han demostrado su capacidad antiproliferativa frente a líneas celulares tipo cancerosas, razón por la cual se busca la caracterización de los diferentes compuestos químicos mediante el fraccionamiento del extracto metanólico de esta especie, y por mediante métodos cromatográficos y estructurales determinar cuáles compuestos otorgan la capacidad citotóxica a la planta, con la finalidad de encontrar nuevas moléculas que se puedan utilizar como auxiliares en el tratamiento de este padecimiento.

## ANTECEDENTES

### Cáncer

#### Historia del Cáncer

El cáncer ha estado presente en seres humanos y animales a través de la historia. No es sorpresa que desde el amanecer de la historia la gente haya escrito sobre el cáncer. Algunas de las evidencias más tempranas de cáncer son tumores en huesos fosilizados, momias humanas en el antiguo Egipto y antiguos manuscritos. La descripción más antigua fue descubierta en Egipto y data de alrededor del 3000 A.C., llamada el papiro de Edwin Smith, que describe 8 casos de tumores y úlceras de seno que fueron removidos con cauterización.

El origen de la palabra cáncer se acredita al médico griego Hipócrates, (considerado el padre de la medicina), usando los términos *carcinosis* y *carcinoma*. El médico romano Celsus tradujo el término griego a *cáncer*. Galeno, médico griego usó la palabra *oncos* para describir los tumores.

Durante el renacimiento, los científicos desarrollaron una gran comprensión acerca del cuerpo humano. Científicos como Galileo y Newton comenzaron a usar el método científico, el cual fue utilizado más tarde para el estudio de la enfermedad. Autopsias hechas por Harvey (1628) dieron lugar a un mejor entendimiento de la circulación sanguínea a través del corazón y el cuerpo, el cual era un gran misterio. El cirujano escocés John Hunter sugirió que algunos cánceres pueden ser curados por cirugía. El siglo XIX vio el nacimiento de los oncólogos con el uso de microscopios modernos en el estudio de tejidos enfermos. Rudolf Virchow, llamado el fundador de la patología celular, dio las bases para el estudio patológico moderno del cáncer (American Cancer Society, 2014).

## **Estadística del Cáncer**

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 se reportaron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer y se prevé que el número de nuevos casos aumente un 70 % en los próximos 20 años (de 14 millones en 2012 a 22 millones en 2030). Los tipos de cáncer más comunes son el pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y esofágico (OMS, 2015).

Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se presentan en África, Asia, América Central y Sudamérica, regiones que representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo. En la región de las Américas, esta enfermedad es considerada la segunda causa de muerte, donde se estima que 2.8 millones de personas son diagnosticadas y 1.3 millones fallecen por cáncer cada año; se pronostica que para el 2025 los casos nuevos de cáncer en América aumentarán a más de 4 millones y los decesos a 1.9 millones. Aproximadamente un 47% de las muertes por cáncer en las Américas en el 2012 se produjeron en América Latina y el Caribe, y las proyecciones muestran que para el 2030, se diagnosticarán cada año 1.8 millones de casos nuevos en esta región (PAHO, 2014; OMS, 2015; OPS, 2016).

En México, el comportamiento histórico de la mortalidad por cáncer ha tenido una tendencia ascendente. En 1999 se reportaron 53.6 muertes por cada cien mil habitantes, cifra que aumentó a 55.2 en 2001. Actualmente se considera la segunda causa de muerte a nivel nacional, solo por debajo de la diabetes mellitus. En cuanto a la mortalidad por entidad federativa, los estados que presentan mayor tasa de mortalidad en hombres son: Sonora, Baja California Sur, Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa, Aguascalientes, Tamaulipas, Baja California, Colima y el Distrito Federal. En las mujeres la mayor tasa de mortalidad se presenta en Colima, Sonora, Coahuila, Baja California, Nuevo León, Puebla, Morelos, Distrito Federal, Chiapas y Guerrero. Sonora es uno de los estados que presentan mayor índice de mortalidad debido a esta

enfermedad, destacando entre los tipos de cáncer más comunes el cáncer pulmonar, cáncer cervicouterino y de estómago (Rizo Ríos y col., 2015).

### **Desarrollo del Cáncer**

El cuerpo humano está compuesto por millones de células, las células normales del cuerpo crecen, se dividen formando nuevas células y mueren de manera ordenada. Las células de nuestro organismo están diferenciadas para cumplir funciones específicas, y a excepción de las células nerviosas, deben reproducirse para reemplazar a las células, que llegadas a su madurez o diferenciación, deben morir. La división celular está controlada por 2 sistemas: uno estimulador y otro inhibitorio de los cuales dependen la normalidad de los tejidos y los órganos; dichos sistemas consisten en sustancias elaboradas por la misma célula o productos de las células vecinas, de la matriz extracelular o que provienen de otros tejidos distantes (Martin de Civetta y Civetta, 2011; ACS, 2013).

Las células normales están constantemente sujetas a señales que dictan si la célula puede dividirse, diferenciarse o morir. Las células cancerosas desarrollan un grado de autonomía de esas señales, resultando en un crecimiento descontrolado y proliferación, estas células presentan defectos en los circuitos regulatorios que controlan la proliferación celular normal y su homeostasis. Presentan 2 principales características hereditarias: se reproducen sin ajustarse a las restricciones normales del crecimiento y división celular, e invaden y colonizan territorios normalmente destinados a otras células (Valdespino y Valdespino, 2011; NIH, 2015).

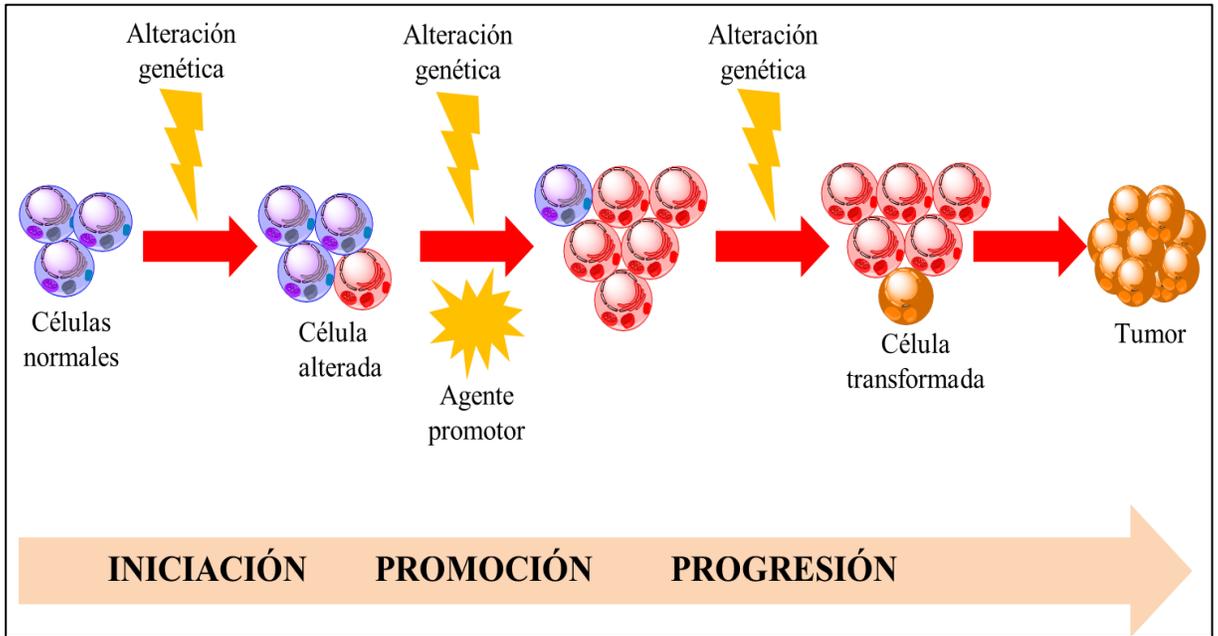
De manera normal el ADN se duplica con un 100% de fidelidad cada vez a través del proceso de replicación, con un pequeño margen de error en cualquier gen, incluyendo los responsables del desarrollo del cáncer. El daño al ADN y los errores de replicación que no son reparados oportunamente aparecen en la siguiente progenie. Raramente cuando una célula madre se divide, una de las células hijas sufre los errores genéticos necesarios para el desarrollo del cáncer. Estas células entonces entran a la

población intermedia, teniendo mayores posibilidades de convertirse en células cancerosas (Cohen y Ellwein, 1991).

Sin importar cuántas mutaciones específicas haya involucradas en la carcinogénesis en un sitio específico, el proceso ocurre en 3 fases definidas: iniciación, promoción y progresión (Figura 1). En la fase de iniciación, la célula madre se convierte iniciando con la adquisición de una o más mutaciones, que lideran el escape parcial del control homeostático de crecimiento. En la segunda fase, la promoción, las células se expanden clonalmente para dar origen a una población de células iniciadas. Una de esas células iniciadas adquiere la promoción de cambios genéticos necesarios para el desarrollo del fenotipo maligno. Esta es la tercera fase, la conversión maligna, llamada comúnmente progresión, la cual incluye eventos tales como la evolución clonal de tumores, después de su transformación maligna (Moolgavkar y Luebeck, 2003).

Las células iniciadas muestran ser propensas a la extensión clonal, lo que puede ocurrir autónomamente o ser estimulada por factores endógenos o exógenos. Actualmente se sabe que la fase de iniciación requiere un agente que induzca un cambio irreversible en una célula. La iniciación seguida de la exposición de algún mutágeno (ya sea físico, químico o biológico) resulta en cambios no observables en la célula o la morfología, pero tiene una alta posibilidad de desarrollar la formación de cáncer. Existen sustancias químicas que pueden actuar como inhibidores o activadores de enzimas que a su vez pueden facilitar la acción de éstas en el daño genómico y activar algún oncogen. Factores físicos como la luz ultravioleta, rayos X; así como algunos agentes químicos y algunos síndromes genéticos pueden predisponer y afectar a individuos con una serie de diferentes tipos de cáncer. Los recientes descubrimientos de oncogenes y los genes supresores de tumor han provisto de fuerte evidencia del rol de las mutaciones en el proceso de carcinogénesis (Luebeck y Hazelton, 2002; Trosko, 2006; Martin de Civetta y Civetta, 2011).

En la fase de promoción, la célula iniciada incrementa su clonación, debido a la exposición de algunos agentes o condiciones que no inducen un daño al ADN, pueden



**Figura 1.** Proceso de la carcinogénesis.

inhibir la reparación de ADN dañado, o causa mutaciones directamente, contribuyendo a la fase de promoción de la carcinogénesis. Sustancias químicas tales como ésteres de forbol, ftalatos o fenobarbitales, los cuales son no mutagénicos, no inician la carcinogénesis, pero son buenos promotores de tumores. La irradiación física y la inflamación crónica y algunos de sus agentes inflamatorios y citocinas pueden actuar como agentes promotores o mitógenos, pudiendo bloquear el proceso de la apoptosis (Trosko y col., 2004; Trosko, 2006).

Finalmente en la etapa de progresión, la acumulación de alteraciones fenotípicas en la población naciente de células iniciadas las convierte del estado pre-maligno en un estado neoplásico. La adquisición de la capacidad de invadir el resto del tejido diana e incluso metastatizarse a otros tejidos u órganos por las células neoplásicas, es la característica del proceso de progresión tumoral con mayor impacto a nivel clínico. El número de alteraciones genéticas en la última etapa de tumor son usualmente mayores en las fases iniciales en varios tipos de cáncer (Notario y col. 1994; Yokota, 2000).

El tratamiento del cáncer está determinado por su localización y el grado de avance en el que se ha diagnosticado la enfermedad. Las principales formas de tratarlo son la cirugía, quimioterapia y la radioterapia. Algunos de estos métodos utilizan fármacos anticancerosos que actúan de diferentes maneras en el cuerpo, principalmente bloqueando la capacidad de reproducción de las células, usualmente, estos medicamentos son agresivos y no solo destruyen las células cancerosas sino que además afectan las células sanas, produciendo efectos negativos en las personas que son tratadas.

El desarrollo de tratamientos contra el cáncer ha sido espectacular, se han desarrollado muchos fármacos con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas, sin embargo, aún se siguen investigando diversas fuentes de fármacos, como lo son los productos naturales. De acuerdo con estadísticas de la OMS, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para complementar o satisfacer sus necesidades médicas (Instituto Nacional de Cancerología, 2004; Ocegueda y col., 2005; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

## **Plantas Medicinales y Metabolitos Secundarios**

A través de los años, los seres humanos han encontrado en la naturaleza la satisfacción de nuestras necesidades básicas, tales como comida, calzado, medios de transporte, y no menos importante el uso que desde tiempos remotos hizo el hombre de las fuentes naturales para curar sus afecciones. El potencial de las plantas para curar la enfermedad es conocido desde siempre en todas las sociedades y este conocimiento ha sido aplicado en la medicina tradicional. Las plantas han sido utilizadas como medicinas por miles de años, ya que desde la edad antigua se han utilizado plantas y algunos de sus derivados en China, Babilonia y Egipto, estas medicinas inicialmente tomaron la forma de drogas crudas tales como tintes, te, polvos u otras formulaciones herbales. El desarrollo de la química ha permitido el aislamiento de algunos de los elementos activos de las plantas, siendo una posible alternativa para la búsqueda de nuevas estructuras químicas que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos. En la actualidad existe un gran interés por la medicina tradicional y natural que algunos llaman complementaria o alternativa, siendo motivo de numerosas investigaciones (Laza Loaces y col., 2003; Schleapfer y Mendoza, 2010).

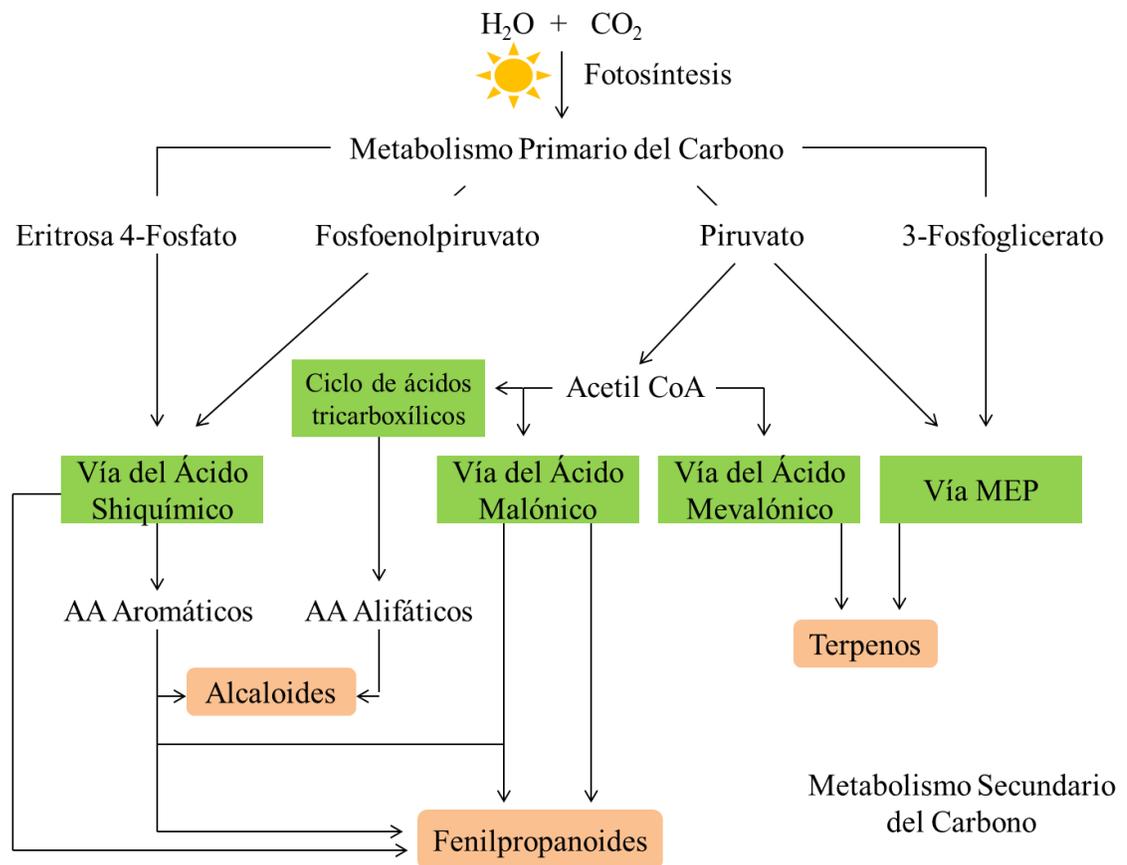
La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos, o cuyos principios activos puedan servir de precursores en la síntesis de nuevos fármacos. Se estima que existen alrededor de 250,000 especies en el mundo, sin embargo, la validación química, farmacológica y/o biomédica solo se ha llevado a cabo en 10% de las especies, marcando así un campo de estudio de suma importancia (Harvey, 2000; Schleapfer y Mendoza, 2010).

Las plantas al ser organismos sedentarios, están obligadas a discriminar entre los diferentes retos que les plantea su entorno y responder a ellos. Estas respuestas a su ambiente biótico y abiótico les permiten una mejor distribución de sus recursos para crecer, reproducirse y defenderse. A diferencia de los animales, las plantas poseen además de un metabolismo primario con el cual producen la energía y las moléculas

necesarias para su funcionamiento, un metabolismo secundario, en el cual destinan una cantidad significativa de energía y carbono asimilado para la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas llamados metabolitos secundarios, que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas y otros metabolitos (Figura 2). Estos metabolitos secundarios además de no poseer una función definida en los procesos antes mencionados, presentan una distribución restringida en el reino vegetal; se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, familias o especies (Vivanco y col., 2005; Avalos y col., 2009).

Algunos de los productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes y polinizadores, repelentes naturales de animales herbívoros, también intervienen en los mecanismos de defensa de la planta frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. Basados en su origen biosintético, los metabolitos secundarios de plantas se pueden clasificar en 4 grandes grupos: terpenoides, alcaloides, compuestos glucósidos y fenilpropanoides o compuestos fenólicos (Sepúlveda Jiménez y col., 2003).

Los terpenos, que suelen ser insolubles en agua, son la clase de metabolitos secundarios más variados estructuralmente. Se originan del precursor de 5 carbonos isopentenil difosfato y son derivados de la unión repetida de estructuras de isopentenilo, la ruta biosintética de estos compuestos da lugar a metabolitos primarios como hormonas, carotenoides, clorofilas, ubiquinonas y esteroides. Se clasifican según el número de unidades de isopentenilo que contienen: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos. Su síntesis es a partir de metabolitos primarios por la ruta del ácido mevalónico y la ruta del metileritrol fosfato. Se ha descrito una gran variedad de propiedades biológicas de estos compuestos como son antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, antiinflamatoria, antihiperlipémica y antiproliferativa (Sepúlveda Jiménez y col., 2003; Ávalos y Pérez, 2009; Guimarães y col., 2014).



**Figura 2.** Metabolismo secundario de las plantas, grupos de metabolitos secundarios principales y su ruta biosintética.

Fuente: Modificado de Ávalos y col., 2009.

Los alcaloides forman una gran familia de más de 15000 metabolitos secundarios, son solubles en agua, tienen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura y poseen actividades biológicas. En los humanos generan reacciones fisiológicas y psicológicas, debido a la interacción con neurotransmisores, a dosis altas son tóxicos pero en dosis bajas tienen una gran utilidad terapéutica como relajantes y analgésicos. Se sintetizan a partir de aminoácidos como lisina, tirosina y triptófano, clasificándose en función de los anillos presentes en la molécula. Algunas de las propiedades biológicas que se han descrito en estos compuestos son actividad anticancerígena, antiproliferativa, antiarrítmica, analgésica, antibacteriana, antimalaria, relajante y anticolinérgica (Sepúlveda Jiménez y col., 2003; Facchini, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

Los compuestos glicósidos son metabolitos de gran importancia en la naturaleza, son solubles en agua, existen tres grupos de glicósidos de especial interés que son saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Poseen propiedades biológicas como actividad antibacteriana, antiproliferativa, se sabe que algunas saponinas poseen actividad antiinflamatoria, antifúngica, antiparasitaria, antimicrobiana, entre otras propiedades biológicas (Kren y Martinkova, 2001; Sparg y col., 2004; Ávalos y Pérez, 2009).

Los compuestos fenólicos o fenilpropanoides son un grupo de compuestos que tienen una variedad de funciones en las plantas, en la defensa de éstas, otorgando color a las flores, olor y sabor a las plantas, entre otras. Se caracterizan por tener un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo; son muy diversas las estructuras de esta familia de metabolitos, desde estructuras sencillas como los ácidos fenólicos hasta la formación de complejos como los taninos. Se sintetizan a partir de 2 rutas, la ruta del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico. Algunas de las actividades biológicas que presentan los fenilpropanoides son actividad antioxidante, inmunomoduladora, antimicrobiana, antiparasitaria, antiinflamatoria, entre otras (Kurkin, 2003).

## **Agentes Anticancerígenos Derivados de Plantas Medicinales**

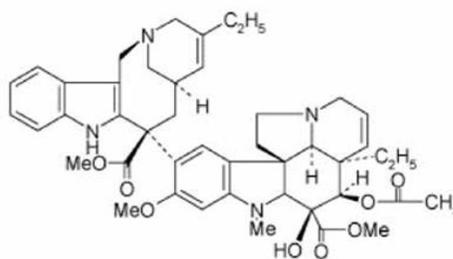
Las plantas tienen una larga historia en el tratamiento del cáncer, aunque muchas veces han sido observadas con escepticismo por las características propias de la enfermedad, sin embargo actualmente, muchas personas que padecen de esta enfermedad desean someterse a terapias conocidas como alternativas. La era actual trae nuevamente el legado de nuestros antepasados, quienes se valían de las plantas para curar sus enfermedades. Las plantas medicinales son una fuente de obtención de principios activos de marcada importancia en las investigaciones actuales. El interés en investigaciones sobre plantas medicinales como posible fuente de obtención de principios activos tiene su historia; instituciones como el propio Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (NCI) han venido desarrollando investigaciones en este campo desde 1955. El descubrimiento de drogas a partir de plantas medicinales ha jugado un importante rol en el tratamiento del cáncer y su efecto, más aplicaciones clínicas de los metabolitos secundarios de plantas y sus derivados. Entre los agentes anticáncer derivados de plantas destacan los alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y camptotecinas (Figura 3) (Laza Loaces y cols., 2003; Balunas y Kinghorn, 2005).

De los productos de origen natural con actividad anticancerígena, quizá los más conocidos son los alcaloides de la vinca: vinblastina y vincristina, los cuales fueron aislados del extracto de las hojas de la planta *Catharanthus roseus*, y han sido utilizados clínicamente por más de 40 años. Los alcaloides de la vinca y algunos de sus derivados semisintéticos actúan uniéndose a la tubulina de manera reversible, causando cambios conformacionales y deteniendo la mitosis en la metafase (Jordan, 2002; Laza Loaces y col., 2003).

La podofilotoxina fue aislada de la resina de la planta *Podophyllum peltatum*, pero fue encontrada demasiado tóxica en ratones, así que se trabajó en derivados con el etopósido aprobado para uso clínico. La epipodofilotoxina actúa uniéndose a la tubulina



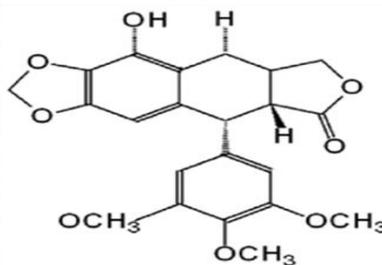
*Catharantus roseus*



Vinblastina



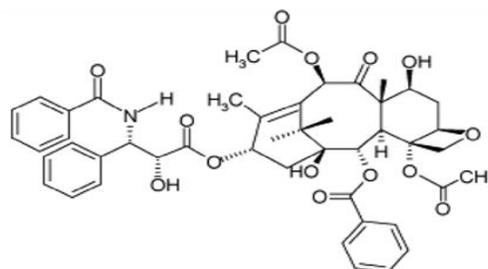
*Podophyllum peltatum*



Podofilotoxina



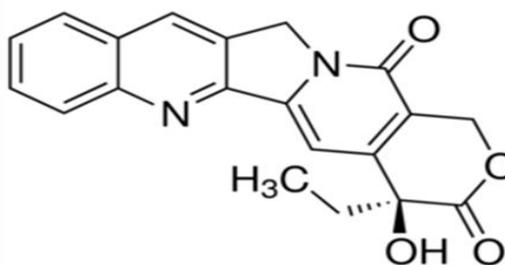
*Taxus brevifolia*



Taxol



*Camptotheca acuminata*



Camptotecina

**Figura 3.** Agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales.

causando que la cadena de ADN se rompa durante la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular por inhibición irreversible de la topoisomerasa II (Balunas y Kinghorn, 2005).

Probablemente el descubrimiento y desarrollo más importante del programa de investigación de productos naturales para el tratamiento del cáncer sea el paclitaxel o taxol, aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*; los taxanos y sus derivados actúan uniéndose a la tubulina, contrarrestando las células en mitosis, estabilizando los microtúbulos. Es efectivo en el tratamiento de cáncer de mama, ovario y pulmón (Jordan, 2003; Balunas y Kinghorn, 2005).

La camptotecina fue aislada de la planta china *Camptotheca acuminata*, ésta actúa por inhibición selectiva de la topoisomerasa I, involucrando el anclaje y reensamble del ADN. Su actividad antineoplásica fue descubierta en los años 50, cuando se buscaban nuevos precursores de la cortisona (Balunas y Kinghorn, 2005; Navarro, 2005).

### **Plantas Medicinales de Sonora y Actividad Antiproliferativa**

Los antiguos pobladores de nuestro territorio desarrollaron unas de las herbolarias más complejas debido a la riqueza cultural y étnica que alcanzaron. Desde tiempos prehispánicos, diferentes grupos étnicos han empleado plantas con fines medicinales. Esto junto a la gran variedad de condiciones ambientales que existen en nuestro territorio, permite que en las plantas se encuentre una amplia gama de sustancias químicas llamadas principios activos. México ocupa el cuarto lugar entre los países considerados con megadiversidad biológica y el quinto en el número de especies de plantas. En México alrededor de 4000 especies de plantas con flores tienen atributos medicinales, sin embargo, se estima que la validación farmacológica, química y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo solo en el 5% de estas especies (Ocegueda y Col., 2005; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

El uso y aplicación de los remedios para tratar enfermedades, es un conocimiento que se transmite de generación en generación. En el estado de Sonora, ubicado al noroeste de México, se estima que los grupos indígenas han utilizado alrededor de 450 tipos diferentes de plantas con propósitos medicinales, incluyendo especies nativas y especies introducidas, algunas de las cuales han sido valoradas científicamente por sus diversas propiedades medicinales. Se ha demostrado en investigaciones recientes, el potencial terapéutico de algunas plantas medicinales sonorenses, utilizadas por las etnias de esta región para aliviar sus males. Rascón (2011) estudió el extracto metanólico de la parte aérea de la planta *Acalypha californica*, la cual mostró actividad antiproliferativa frente a líneas celulares cancerosas M12.C3.F6 (linfoma murino), RAW 264.7 (macrófagos murinos) y HeLa (cáncer de cérvix). Torres (2013) estudió el extracto metanólico de la raíz de la planta *Ibervillea sonora* comúnmente conocida como wareke, utilizada por la etnia mayo como hipoglucemiante, demostrando el potencial antiproliferativo frente a la línea celular cancerosa RAW 264.7. Sánchez (2013) mostró que el extracto metanólico de la parte aérea de *Krameria erecta* conocida como cosahui, posee actividad antiproliferativa frente a líneas celulares cancerosas como M12.C3.F6, RAW 264.7 y HeLa. Rascón (2015) evaluó el extracto metanólico de la planta *Asclepias subulata*, utilizada por las tribus sonorenses para curar el cáncer, frente a líneas celulares cancerosas HeLa, A549 (cáncer de pulmón), LS-180 (cáncer de color) y PC3 (cáncer de próstata) demostrando el gran potencial de esta planta en contra de estas células. Estudios recientes han demostrado que la planta *Stegnosperma halimifolium* posee potencial antiproliferativo en contra de líneas celulares cancerosas de origen humano y murino (Jiménez Estrada y col., 2013).

### **Género *Stegnosperma* y Estudios Relacionados con Actividad Biológica**

Como se mencionó anteriormente, las plantas medicinales del estado de Sonora, poseen una gran variedad de usos por las etnias del estado, mostrando su potencial para ser investigadas para la búsqueda de compuestos que posean un potencial biológico. Las

plantas del género *Stegnosperma*, son especies poco conocidas y estudiadas en cuanto a su potencial biológico. La familia Stegnospermaceae pertenece al orden Caryophyllales, es una familia monogénica, el género *Stegnosperma* y 3 especies: *watsoni*, *cubense* y *halimifolium*. Se distribuye ampliamente desde el norte de México hasta Nicaragua y las Antillas. Se sabe que las plantas de la familia Stegnospermaceae son ricas en betalaínas, y se ha demostrado la presencia de glucosinolatos y algunos flavonoides como quercetina y kaemferol (Kubitzki y col., 1993).

La planta *Stegnosperma halimifolium* conocida comúnmente como chapacolor o hierba de la víbora, es un arbusto siempre verde, con hojas ovaladas y suculentas, flores pequeñas de color blanco, frutos en forma de baya color marrón con una semilla negra característica en su interior, con época de floración de noviembre a marzo (Figura 4). Se distribuye ampliamente en costas y colinas, en México se encuentra principalmente en los estados de Sonora, Baja California, Sinaloa, Michoacán y Guerrero. Las etnias Mayo y Seri la utilizan para aliviar las picaduras de serpientes, masticando la hoja de la planta y colocándola en la herida, también es utilizada en conjunto con la planta “torote prieto” para aliviar los dolores de cabeza, las etnias de Baja California utilizan el polvo de las raíces como sustituto de jabón (Kubitzki y col., 1993; Gordon y col., 1996; Yeltman, 2002).

Existe poca información acerca de la actividad biológica de la planta *Stegnosperma halimifolium* y de su familia. Ortiz (2010) mostró que el extracto metanólico de la parte aérea de esta planta posee actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares cancerosas HeLa, RAW 264.7 y M12.C3.F6 con valores de  $IC_{50}$  cercanos a los 200  $\mu\text{g/mL}$ . Jiménez-Estrada y col. (2013) demostraron la capacidad antiproliferativa de su extracto metanólico en contra de las líneas celulares cancerosas HeLa, RAW 264.7 y M12.C3.F6 con valores de  $IC_{50}$  entre 400 y 200  $\mu\text{g/mL}$ , también demostraron que el extracto metanólico posee una baja actividad antioxidante, y bajas concentraciones de fenoles totales y flavonoides.



**Figura 4.** *Stegnosperma halimifolium*. A) Arbusto, B) Flores y C) Frutos inmaduros.

Debido a la poca cantidad de información que existe sobre la actividad biológica de la planta *Stegnosperma halimifolium*, y el desconocimiento de los compuestos responsables que otorgan su capacidad antiproliferativa, es necesario profundizar más en la investigación de *Stegnosperma spp*, con la finalidad de proporcionar más información para la creación de nuevos agentes en contra del cáncer.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Obtención del Extracto Metanólico**

El extracto metanólico se obtuvo utilizando la siguiente metodología: se recolectó la parte aérea (tallo y hoja) de la planta *Stegnosperma halimifolium*, se secó a temperatura ambiente separándola por partes. Posteriormente se utilizó un molino tipo Wiley para posteriormente macerar el material biológico. Se mezcló la muestra vegetal con metanol en una proporción 1:10 a temperatura ambiente, manteniéndose por un período de 10 días, agitando 2 veces diarias. El extracto metanólico se pasó a través de gasa y papel filtro, posteriormente se concentró en evaporador rotatorio (Buchi 850-V) a 60 °C y presión constante. El extracto crudo se guardó en frasco protegido de la luz a -4 °C hasta su uso (Jiménez-Estrada y col., 2013).

### **Obtención de Fracciones Químicas**

El extracto metanólico fue fraccionado por medio de extracciones con solventes en polaridad ascendente. Se realizaron varias extracciones consecutivas de 300 mL con cada uno de los solventes en el siguiente orden: hexano (Índice de polaridad: 0.0), acetato de etilo (4.2) y etanol (5.3), con agitación constante por al menos 12 horas en agitador automático. Posteriormente se concentró en evaporador rotatorio a 60°C y presión constante. Este proceso se realizó con cada uno de los solventes utilizados. Se obtuvieron tres fracciones de distinta polaridad a partir del extracto metanólico, la primera fue la fracción hexánica, la segunda una fracción de acetato de etilo y la tercera la fracción etanólica, éstas fueron llamadas fracciones químicas, para evitar confusión con las fracciones que se obtuvieron del proceso cromatográfico (Rascón, 2011).

## **Cultivo Celular y Líneas Celulares**

El panel de líneas celulares utilizado fue el siguiente: L-929 (células de tejido subcutáneo normal murino), RAW 264.7 (macrófagos de murinos transformados por virus de leucemia de Abelson), M12.C3.F6 (linfoma murino de células B), HeLa (células epiteliales de cáncer cervical humano), LS-180 (adenocarcinoma colorrectal), PC3 (cáncer de próstata) y A549 (adenocarcinoma pulmonar humano). Todos los cultivos de las líneas celulares se mantuvieron en Medio Dulbecco Eagle Modificado (DMEM) suplementado al 5% con SFB inactivado por calor, bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y a temperatura de 37°C en incubadora (Rascón, 2011).

### **Determinación de la Actividad Antiproliferativa**

Para determinar el efecto antiproliferativo del extracto metanólico crudo, de las fracciones químicas así como las posteriores fracciones cromatográficas obtenidas del mismo frente a las líneas celulares, se utilizó el ensayo estandarizado MTT [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl) - 2,5 difeniltetrazolio], el cual se basa en la reducción de la sal de tetrazolio a formazán, por medio de la enzima succinato deshidrogenasa, virando de color amarillo a púrpura (Mossman, 1983).

Partiendo de una suspensión celular ajustada a 200,000 células/mL, en placas de 96 pozos se agregaron 10,000 células (aproximadamente 50 µL) a cada pocillo, éstas se incubaron por 24 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% con la finalidad de permitir la adhesión celular. Los extractos metanólicos, las fracciones, fracciones cromatográficas fueron disueltos en DMSO (soluciones madre), posteriormente fueron diluidos en DMEM suplementado con SFB al 5% para generar diluciones seriadas con las concentraciones finales desde 3.125 – 400 µg/mL. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de estas diluciones a la placa de 96 pozos (cada concentración por triplicado) y se incubaron por 48 horas bajo las condiciones de incubación anteriormente mencionadas. Pasado este período, se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS 1X (con excepción de

la línea celular M12.C3.F6), se adicionó medio fresco y 10  $\mu$ L de solución MTT (5  $\mu$ g/mL) a cada uno de los pozos, incubándose por 4 horas en las condiciones ya referidas. Los cristales de formazán formados fueron disueltos con isopropanol ácido, se determinó la absorbancia en un lector ELISA usando una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm (Jiménez-Estrada y col., 2013).

### **Separación de Fracciones por Métodos Cromatográficos**

Las fracciones obtenidas de las extracciones con solventes que presentaron la mayor actividad antiproliferativa fueron fraccionadas mediante cromatografía en columna de gravedad, se utilizó como fase estacionaria sílica gel (tamaño de poro: 60Å, 200 – 400 mesh), empacada y mezclada con la muestra a separar, y como fase móvil se usaron los solventes hexano, acetato de etilo y metanol, puros o en combinación con el solvente que tenga una ligera mayor polaridad en diferentes proporciones. Se recolectaron subfracciones cada 250 mL, las cuales fueron evaporadas en rotavapor para la recuperación del solvente.

Se llevó a cabo un monitoreo de las fracciones por medio de cromatografía en capa fina (TLC), utilizando cromatofolios de sílica gel, los cuales fueron observados con la ayuda de una lámpara de UV a 254 y 365 nm y se revelaron con una solución de sulfato cérico (Rascón, 2011).

### **Elucidación Estructural de Compuestos**

Con la finalidad de elucidar la naturaleza estructural de los compuestos obtenidos de la fracción con mayor actividad antiproliferativa se utilizaron métodos de determinación estructural tales como resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ -) y de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ -) y espectrometría de masas para determinar el peso molecular de los compuestos (Torres, 2013).

Todo el trabajo de elucidación y caracterización se realizó en el Departamento de Productos Naturales, en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión del Dr. Manuel Jiménez Estrada.

El punto de fusión fue determinado en un aparato Fisher Scientific 115 V, 50-60 Hz. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un aparato FT-IR Bruker Tensor 27, con rango de espectro de  $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , las muestras fueron trabajadas en solución y disueltas con cloroformo ( $\text{CH}_3\text{Cl}$ ). Los espectros de masas fueron obtenidos con un espectrómetro MStation JMS-700, las condiciones fueron las siguientes: modo de ionización:  $\text{EI}^+$ , intervalo de análisis:  $10 - 502 \text{ m/z}$ , temperatura:  $3276.7 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-NMR}$ ), carbono ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) y bidimensionales se realizaron en un espectrómetro Varian Inova, operado a  $500 \text{ MHz}$  para todas las pruebas, la muestra fue disuelta en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), los desplazamientos químicos fueron expresados en  $\delta$  (ppm). El solvente tetrametilsilano (TMS) fue empleado como referencia interna.

### **Análisis Estadístico**

Para calcular los valores de  $\text{IC}_{50}$  se analizaron los porcentajes de proliferación de tres experimentos, por triplicado, y fueron analizados por un análisis de regresión lineal o no lineal, dependiendo de la naturaleza de los datos. Los resultados de los ensayos biológicos fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar de tres repeticiones. Las diferencias entre las medias se evaluaron por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA) de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de los Extractos Metanólicos y Fracciones Químicas

Las muestras de *Stegnosperma halimifolium* fueron recolectadas en Octubre de 2014, aproximadamente a 500 m de CECYTES (29° 04' 59.3" N, 111° 03' 02.9" W), ubicado en la colonia La Manga, a las afueras de la ciudad de Hermosillo, Sonora. La muestra colectada fue la parte aérea (tallo y hoja), la cual fue identificada con la ayuda del Ing. Jesús Sánchez Escalante, taxónomo del herbario de la Universidad de Sonora, registrada con el número de voucher 22658.

Se obtuvo el extracto metanólico de tallo, hoja y parte aérea llamada tallo/hoja, generando rendimientos y cantidad de extractos de 5.8% (58.5713 g a partir de 1 kg de muestra seca), 13.58% (40 g a partir de 300 g de muestra seca) y 12.5% (12.5 g a partir de 100 g de muestra seca) respectivamente.

Las fracciones químicas se obtuvieron a partir del extracto metanólico del tallo por medio de extracciones con solventes en polaridad ascendente, obteniéndose 3 fracciones, la fracción Hexánica (H1), la fracción Acetato de Etilo (H2) y la fracción Etanólica (H3) con rendimientos de 5.03%, 11.57% y 42.27% respectivamente. Cabe señalar que no se obtuvo fracción residual, ya que el material fue soluble con el último solvente utilizado en los lavados.

### **Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de los Extractos Metanólicos de *Stegnosperma halimifolium* Mediante el Ensayo MTT**

Para evaluar la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de la planta se utilizó el ensayo estandarizado MTT, con concentraciones de 400 a 12.5 µg/mL sobre las líneas celulares cancerosas murinas RAW 264.7 y M12.C3.F6, las líneas celulares de origen humano HeLa y A549 y una línea celular no cancerosa de origen murino L-929.

Como se puede observar en la Tabla I el extracto metanólico de tallo/hoja presentó actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares cancerosas murinas RAW 264.7 y M12.C3.F6 con valores de  $IC_{50}$  de 243.12 y 213.67  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Las líneas celulares cancerosas humanas no se vieron afectadas con el extracto, con las concentraciones empleadas. La línea celular no cancerosa tampoco resultó afectada en las condiciones evaluadas. Cabe resaltar que este extracto metanólico mostró cierta selectividad hacia las células cancerosas murinas debido al efecto que tuvo ante estas células y no frente a las células no cancerosas de origen murino.

El extracto metanólico del tallo mostró mayor actividad frente a la línea celular murina RAW 264.7 ( $IC_{50}$  de 118.09  $\mu\text{g/mL}$ ) con respecto a la línea celular M12.C3.F6, la cual mostró una  $IC_{50}$  superior a la máxima concentración utilizada, y con una  $IC_{50}$  48.6% superior que el extracto tallo/hoja. Al igual que el extracto metanólico de tallo/hoja no tuvo un efecto destacado sobre las líneas celulares humanas, ni sobre la línea celular no cancerosa. El extracto metanólico de la hoja no demostró tener actividad frente a ninguna línea celular cancerosa ni sobre la línea celular no cancerosa, aún con la máxima concentración utilizada.

Las plantas del género *Stegnosperma* son especies que han sido poco evaluadas en relación a su actividad biológica. En investigaciones recientes realizados por Ortiz Sandoval en el 2010, se evaluó el extracto metanólico de la parte aérea de la planta *Stegnosperma halimifolium* frente a diversas líneas celulares, mostrando efectos frente a líneas celulares cancerosas como RAW 264.7 y M12.C3.F6 con valores de  $IC_{50}$  de 208 y 130  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente y HeLa con  $IC_{50}$  de 378  $\mu\text{g/mL}$ , sin presentar efecto antiproliferativo en línea celular no cancerosa a la máxima concentración evaluada. Por su parte Jiménez-Estrada y col. (2013) evaluaron un conjunto de plantas medicinales usadas por las etnias de Sonora, entre las que se incluyó el chapacolor (*Stegnosperma halimifolium*), se evaluó su capacidad antiproliferativa frente a líneas celulares similar al panel utilizado por Ortiz Sandoval, evaluando concentraciones de 800 - 100  $\mu\text{g/mL}$ , en los que se demostró el potencial antiproliferativo del extracto metanólico de esta planta,

**Tabla I.** Actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Stegnosperma halimifolium*.

Extracto Metanólico	IC <sub>50</sub> ± Desviación Estándar (µg/mL)				
	L-929	RAW 264.7**	M12.C3.F6	HeLa	A549
<b>Tallo + Hoja</b>	> 400	243.12 ± 1.5	213.67 ± 1.3	> 400	> 400
<b>Tallo</b>	> 400	118.09 ± 1.75	> 400	> 400	> 400
<b>Hoja</b>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<b>Doxorrubicina*</b>	2.89 ± 0.11	0.38 ± 0.01	1.89 ± 0.06	> 4.0	2.5 ± 1.4

IC<sub>50</sub>: Medida cuantitativa de la eficacia de un compuesto para inhibir un proceso biológico a la mitad de su función o actividad normal.

(\*): Control positivo

(\*\*): Diferencias significativas entre los valores de IC<sub>50</sub> de las líneas celulares cancerosas en base a los valores de la línea celular normal.

con  $IC_{50}$  entre 200 – 400  $\mu\text{g/mL}$  en las líneas RAW 264.7, M12.C3.F6 y HeLa, y efecto en la línea celular no cancerosa L-929 con valores de  $IC_{50}$  entre 200-400  $\mu\text{g/mL}$ .

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el extracto metanólico del tallo/hoja muestra valores de  $IC_{50}$  similares a los estudios previos, en líneas celulares como RAW 264.7 y M12.C3.F6 mostrando valores de  $IC_{50}$  cercanos a los 200  $\mu\text{g/mL}$ , al igual que en la línea celular HeLa en la cual mostró valores cercanos a los 400  $\mu\text{g/mL}$ , similar a los reportados en los estudios previos. Los efectos en la línea celular L-929 también muestran valores similares, cercanos a los 400  $\mu\text{g/mL}$ , además demuestran que el extracto metanólico de tallo/hoja pareciera mostrar indicios de selectividad en las células de origen murino, debido al efecto que tiene ante las líneas celulares cancerosas y no en las líneas celulares normales.

#### **Evaluación de la Actividad Antiproliferativa de las Fracciones Químicas Obtenidas del Extracto Metanólico del Tallo de *Stegnosperma halimifolium***

Basados en los resultados obtenidos de la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos, se seleccionó el extracto metanólico del tallo para utilizarse en el proceso de fraccionamiento con solventes. Se utilizaron las mismas condiciones para la evaluación de la actividad antiproliferativa descritas anteriormente.

Como se observa en la Tabla II, las fracciones más activas fueron las de baja polaridad, la fracción de hexano mostró actividad frente a las líneas celulares murinas RAW 264.7 y M12.C3.F6 con  $IC_{50}$  de 65.9 y 146.1  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Al contrario de los extractos metanólicos crudos de la planta, la línea celular no cancerosa L-929 si sufrió un efecto citotóxico con una  $IC_{50}$  de 133.4  $\mu\text{g/mL}$ . Para el caso de las líneas celulares cancerosas humanas, la fracción hexánica mostró buena actividad frente a la línea celular A549 con una  $IC_{50}$  de 68.6  $\mu\text{g/mL}$ , en comparación con la línea celular HeLa con  $IC_{50}$  de 343.2  $\mu\text{g/mL}$ .

La fracción de acetato de etilo demostró tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de las líneas celulares cancerosas murinas, con una  $IC_{50}$  de 50.8  $\mu\text{g/mL}$  para

**Tabla II. Actividad antiproliferativa de las fracciones químicas obtenidas del extracto metanólico del tallo de *Stegnosperma halimifolium*.**

Fracción	IC <sub>50</sub> ± Desviación Estándar (µg/mL)				
	<b>L-929</b>	<b>RAW 264.7**</b>	<b>M12.C3.F6**</b>	<b>HeLa</b>	<b>A549</b>
<b>Hexano</b>	133.4 ± 1.4	65.9 ± 1.1	146.1 ± 1.4	343.2 ± 2.4	68.6 ± 1.3
<b>Acetato de Etilo</b>	215.8 ± 2.1	50.8 ± 1.1	78.4 ± 1.3	130.9 ± 1.1	349.7 ± 1.2
<b>Etanol</b>	NP	NP	NP	NP	NP
<b>Doxorrubicina*</b>	2.89 ± 0.11	0.38 ± 0.01	1.89 ± 0.06	> 4	2.5 ± 1.4

IC<sub>50</sub>: Medida cuantitativa de la eficacia de un compuesto para inhibir un proceso biológico a la mitad de su función o actividad normal.

NP: No presentó actividad a la máxima concentración utilizada.

(\*): Control positivo.

(\*\*): Diferencias significativas entre los valores de IC<sub>50</sub> de las líneas celulares cancerosas en base a los valores de la línea celular normal

RAW 264.7 y 78.4  $\mu\text{g/mL}$  para M12.C3.F6. En contraste, la línea celular no cancerosa L-929 sufrió un menor efecto por parte de esta fracción que las líneas cancerosas de origen murino, con una  $\text{IC}_{50}$  de 215.8  $\mu\text{g/mL}$ . Por otro lado, esta fracción mostró poco efecto sobre las líneas celulares cancerosas de origen humano utilizadas, con  $\text{IC}_{50}$  de 130.9 y 349.7  $\mu\text{g/mL}$  para HeLa y A549 respectivamente. Al igual que en el extracto metanólico de tallo/hoja, esta fracción mostró cierta selectividad hacia las células cancerosas murinas, debido al marcado efecto que tuvo en éstas y al poco daño que causó en las células no cancerosas de esta especie. La fracción etanólica no demostró tener ningún efecto antiproliferativo frente a las líneas celulares cancerosas murinas, humanas y la línea celular no cancerosa, aun en la máxima concentración utilizada.

Estudios en plantas medicinales de Sonora, demuestran el potencial antiproliferativo que poseen las fracciones químicas obtenidas a partir de los extractos metanólicos de las plantas estudiadas, demostrando que, procesos de purificación en los extractos metanólicos pueden mejorar la actividad biológica en comparación a la actividad que presentaron inicialmente. Las técnicas más utilizadas para el fraccionamiento de los extractos metanólicos son realizar extracciones con solventes de distintas polaridades como hexano, acetato de etilo, cloroformo, diclorometano, etanol entre otros solventes, ya sea por medio de embudos de separación o lavados, extracciones por medio de soxleth, arrastre de vapor, fluido supercrítico, cromatografía en columnas, HPLC, entre otros (Canell, 1998).

Efectos similares se mostraron en la planta de estudio *S. halimifolium*, en el cual las fracciones de hexano y acetato de etilo mostraron valores de  $\text{IC}_{50}$  menores al del extracto metanólico del tallo en las líneas que no había tenido efecto alguno.

#### **Perfil Fitoquímico Cualitativo de las Fracciones Químicas del Extracto Metanólico del Tallo de *S. halimifolium***

Teniendo en cuenta la poca información acerca de los metabolitos secundarios de esta planta, se decidió realizar un perfil fitoquímico cualitativo para tener una idea de la

naturaleza de los compuestos presentes en las fracciones químicas que se obtuvieron a partir del extracto metanólico del tallo (Anexo I).

La fracción química de hexano mostró resultado positivo para la prueba Liebermann – Buchnard, la cual nos permite la identificación de compuestos de naturaleza terpénica y esteroides. La fracción química de acetato de etilo dio positiva la prueba de hidróxido de sodio al 10% mostrando la presencia de flavonoides. Las pruebas de la espuma para identificar la presencia de saponinas, hidróxido de sodio al 10% para identificación de flavonoides y el test de cloruro férrico para la identificación de compuestos fenólicos fueron positivas en la fracción química de etanol.

El análisis fitoquímico cualitativo consiste en un conjunto de pruebas colorimétricas que tiene como propósito determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, lo que nos brinda un pequeño panorama de la naturaleza de los posibles principios activos de alguna planta medicinal que presente actividad biológica. Existe poca información sobre la naturaleza de los metabolitos secundarios de las plantas del género *Stegnosperma* al igual que sobre su actividad biológica. Nuestros resultados muestran una variedad de pruebas con resultados positivos en las fracciones obtenidas del extracto metanólico del tallo. La prueba Liebermann-Buchnard se basa en una reacción coloreada verde, principalmente es positiva para los compuestos que posean el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, estructura base de los esteroides y algunos otros compuestos de naturaleza terpénica. Xu y Patterson (1990) estudiaron la composición de los esteroides de algunas plantas de la familia Phytolaccaceae, entre ellas las plantas del género *Stegnosperma*, anteriormente incluida en esta familia, demostrando la presencia de esteroides como  $\beta$ -sitosterol y 7-stigmadienol en la composición de estas plantas. Existen numerosos reportes de esteroides en las plantas de la familia Phytolaccaceae, además, a compuestos como  $\beta$ -sitosterol se le ha atribuido una gran cantidad de actividades biológicas; se sabe que juega un rol antiproliferativo contra algunos tipos de cáncer, principalmente se ha estudiado con cáncer de colon y mama, también se ha reportado actividad para leucemia, fibrosarcoma, estómago y próstata.  $\beta$ -sitosterol inhibe la proliferación celular e induce

apoptosis por la activación de la caspasa 3 y 8, incrementado los niveles de Fas y actividad de la MAPK, y modulando la expresión de moléculas relacionadas con apoptosis como la Bcl-2 (González Vallinas y col., 2013).

Richardson (1981) reportó la presencia de flavonoides como quercetina y kaempferol en las plantas del género *Stegnosperma* y específicamente en *Stegnosperma halimifolium*. La quercetina es uno de los flavonoides más comunes en vegetales y frutas, en plantas usualmente se encuentra en forma glucosada; se sabe que la quercetina muestra efectos sobre los radicales libres y actividad sobre algunos desordenes como enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Se ha demostrado la inhibición de algunos tipos de cáncer en ensayos *in vitro* y modelos animales, principalmente en el cáncer de pulmón, también se han elucidado los mecanismos anticáncer demostrando la habilidad de quercetina de inhibir la vía de señalización PI3K/Akt y la producción de COX-2 y PGE2 (González Vallinas y col., 2013).

Por otro lado, Kaempferol, es un flavonoide que presenta actividad antidiabética, además estudios indican que este flavonoide exhibe una variedad de bioactividades como cardioprotectora, antiestrógena, ansiolítica, analgésica, antialérgica y osteoporótica. Liao y col. (2016) evaluaron la actividad antiproliferativa de kaempferol ante la línea celular MCF-7 en el cual se observó un notable efecto en la línea celular a través de la inducción de apoptosis.

Kubitzki y col. (1993) reportaron que algunas tribus de Baja California utilizan el polvo de la raíz de la planta *Stegnosperma halimifolium*, como sustituto de jabón, probablemente por su alto contenido de saponinas. Las saponinas son compuestos que se disuelven en agua para formar soluciones coloidales, las plantas que contienen estos compuestos poseen una gran variedad de actividades biológicas, tal como antiinflamatoria, antifúngica, entre otras. Esta clase de compuestos han sido reportados con efectos antiproliferativos en familias cercanas a Stegnospermaceae. Sparg y col. (2004) reportaron el aislamiento de la saponina furcreastina, a partir del extracto metanólico de las hojas de la planta *Furcraes foetida*, perteneciente a la familia

*Agavaceae*, la cual mostró citotoxicidad selectiva ante fibroblastos de ratón modificados. Asimismo, saponinas aisladas de las raíces de *Acanthophyllum squarrosum*, planta perteneciente a la familia Caryophyllaceae, mostraron un moderado efecto citotóxico en un cultivo de linfocitos, mientras que saponinas triterpénicas aisladas de los extractos acuosos de la raíz de *Securidaca inappendiculata* (Polygalaceae) inhibieron el crecimiento de macrófagos.

### **Separación Cromatográfica de la Fracción Química de Hexano y Evaluación de la Actividad Antiproliferativa en la Línea Celular A549**

Después de evaluar la actividad antiproliferativa de las fracciones químicas obtenidas del extracto metanólico del tallo de *S. halimifolium*, se separó la fracción química de hexano por medio de una columna cromatográfica, se obtuvieron 16 fracciones ya agrupadas y se evaluó su actividad antiproliferativa frente a la línea celular cancerosa A549, evaluando concentraciones de 100 – 12.5 µg/mL. Los resultados se muestran en la Tabla III.

Las fracciones cromatográficas 1, 3 y 14 no mostraron actividad por arriba de la máxima concentración evaluada. Las fracciones 15 y 16 mostraron valores de IC<sub>50</sub> de 96.5 y 95.7 µg/mL respectivamente. Las fracciones cromatográficas 4, 5 y 13 mostraron actividad con valores de IC<sub>50</sub> de 84.7, 81.1 y 84.6 µg/mL respectivamente. Las fracciones 2, 6 y 12 mostraron una actividad antiproliferativa cercana al valor de la fracción química que les dio origen, con valores de IC<sub>50</sub> de 71.9, 71.8 y 73.9 µg/mL respectivamente, pero no superiores a los 68.5 µg/mL correspondientes a la fracción química de hexano. Las fracciones que mostraron una actividad antiproliferativa superior a la fracción química de hexano fueron la fracción 7 (IC<sub>50</sub>= 60.5 µg/mL), la fracción 9 (IC<sub>50</sub>= 63.4 µg/mL), la fracción 10 (IC<sub>50</sub>= 55.2 µg/mL) y la fracción 11 (IC<sub>50</sub>= 57.4 µg/mL). De la fracción 8 se obtuvo un sólido blanquecino el cual no fue evaluado.

**Tabla III.** Evaluación de la actividad antiproliferativa de las fracciones cromatográficas obtenidas de la fracción química de hexano en la línea celular A549.

<b>Fracción Cromatográfica</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL) ± Desv.Est.</b>
1	> 100
2	71.9 ± 1.08
3	> 100
4	84.71 ± 1.32
5	81.13 ± 1.21
6	71.86 ± 1.29
7	60.45 ± 1.2
8	NE
9	63.4 ± 1.14
10	55.22 ± 1.09
11	57.39 ± 1.13
12	73.91 ± 1.17
13	84.65 ± 1.12
14	> 100
15	96.48 ± 1.6
16	95.69 ± 1.19

IC<sub>50</sub>: Medida cuantitativa de la eficacia de un compuesto para inhibir un proceso biológico a la mitad de su función o actividad normal.

(NE): Muestra no evaluada.

La separación de una o más sustancias a partir de un extracto metanólico o fracciones pueden ser procesos largos y tardados, obtener un compuesto puro requiere de varios pasos de separación involucrando diferentes técnicas cromatográficas. La cromatografía es un método de separación que involucra la distribución de un compuesto entre 2 fases, una fase móvil que atraviesa una fase estacionaria, la separación se lleva a cabo basadas en las características de los compuestos que se hayan en la muestra y la interacción entre las 2 fases. Una de las técnicas cromatográficas más utilizadas es la cromatografía en columna, que emplea una fase estacionaria principalmente de sílica gel o sephadex (en el caso de cromatografía en fase reversa), la cual es una matriz porosa que permite el paso de moléculas de diferente tamaño a través de ella. Las fases móviles son principalmente con solventes puros o mezclas, las cuales atraviesan la fase estacionaria por gravedad, desplazando los compuestos más afines al sistema de solventes utilizados por medio de ésta (Canell, 1998; Colegate y Molyneux, 2008).

Los compuestos se extraen en base a su afinidad hacia la fase móvil, agrupándose principalmente por la polaridad en forma descendente. Las familias de metabolitos secundarios que se pueden extraer con solventes de baja polaridad como hexano principalmente son compuestos apolares como aceites esenciales, triterpenos, esteroides, ácidos grasos, algunos alcaloides, flavonoides aglicados, cumarinas, entre otros. Solventes de polaridad media - alta como etanol, extraen compuestos como taninos, alcaloides, antocianinas, algunos triterpenos y esteroides glucosados, glicósidos cardenólidos, flavonoides, entre otros. Solventes de alta polaridad como metanol o agua, extraen compuestos como alcaloides, taninos gálicos, y algunos glucósidos cianogénicos (Santizo, 2004).

### **Separación de las Fracciones Cromatográficas 7, 9, 10 y 11**

Para separar las fracciones cromatográficas que mostraron la mejor actividad antiproliferativa, se utilizaron placas preparativas de sílica gel (20 x 20 cm). Debido a la

cantidad de muestra con la que se contaba se decidió juntar las fracciones 7-9 y la fracción 10-11. Las muestras se disolvieron en diclorometano y las fracciones se extrajeron con una mezcla de hexano-acetato de etilo-metanol en proporción 6.5/2.5/1.0 respectivamente.

De la fracción cromatográfica 7-9 se obtuvieron 9 subfracciones, nombradas de la letra A a la I. De la fracción cromatográfica 10-11 se obtuvieron 9 subfracciones nombradas con los números -4 a 4. A pesar del proceso de separación, no se logró obtener compuestos, además, las fracciones obtenidas estaban compuestas por más de 1 banda. Se obtuvieron bajos rendimientos de la mayoría de las subfracciones, debido a esto y a la compleja mezcla de compuestos, no se lograron caracterizar por técnicas como HPLC, RMN o espectrometría de masas.

### **Caracterización Estructural de la Fracción Cromatográfica 8 Obtenida de la Fracción Química de Hexano**

Como anteriormente se ha mencionado, la fracción cromatográfica 8 se obtuvo como un sólido blanquecino amorfo, pero debido al bajo rendimiento de la fracción no se sometió a la evaluación de la actividad antiproliferativa, sin embargo, se decidió conocer qué clase de compuestos presentaba, realizándose diversas pruebas para caracterizarlo.

Las características físicas de la fracción cromatográfica 8 (FxC 8) son la formación de un sólido amorfo de color blanco, soluble en solventes como diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y cloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ), sin fluorescencia a 254 y 365 nm al ser expuesto a luz UV; se revela una banda de color púrpura en el TLC después de ser revelado con vainillina fosfórica.

Se realizaron resonancias magnéticas nucleares de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) y carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ) para conocer un poco del tipo de compuesto que había en la FxC 8. La RMN  $^1\text{H}$  reveló señales a campo alto, correspondientes a grupos alifáticos como metilos y unidades cíclicas, y señales a campo bajo, asociadas a protones de compuestos con grupos hidroxilos (entre 3 – 4 ppm) y grupos con dobles enlaces en su estructura (entre

4.5 - 5.5 ppm). Analizando un poco más el espectro, en la zona de campo bajo, se observan 3 señales en forma de cuádrupletes en el área característica a dobles ligaduras a desplazamiento químico de 5.1, 5.09 y 4.98 ppm y una señal en forma de multiplete en el área correspondientes a señales características de los grupos hidroxilo a desplazamiento químico de 3.71 ppm.

La RMN<sup>13</sup>C nos muestra señales que refuerzan lo observado en la RMN<sup>1</sup>H, mostrando señales características en el área de carbonos unidos a grupos hidroxilo, entre 60 - 80 ppm, señales en el área representativa de las dobles ligaduras, entre 110 - 150 ppm y señales correspondientes a grupos alifáticos y cíclicos entre 10 - 60 ppm. Las señales a desplazamiento químico de 139.56, 138.15, 129.45 y 117.6 son señales características a los carbonos que se encuentran unidos por dobles enlaces y la señal a desplazamiento químico de 71.1 ppm es una señal típica de carbonos que están unidos a grupos hidroxilos. Los desplazamientos de los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se muestran en la Tabla IV. Comparando los resultados obtenidos en los RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C con la bibliografía, se encontraron estudios relacionados con el aislamientos de compuestos derivados de plantas medicinales, en los cuales se reportó el esteroil espinasterol (Figura 5), posible compuesto obtenido de la FxC 8 (Choi y col., 2003; Ragasa y col., 2005; Zhang y col., 2005; Mhuria y col., 2015).

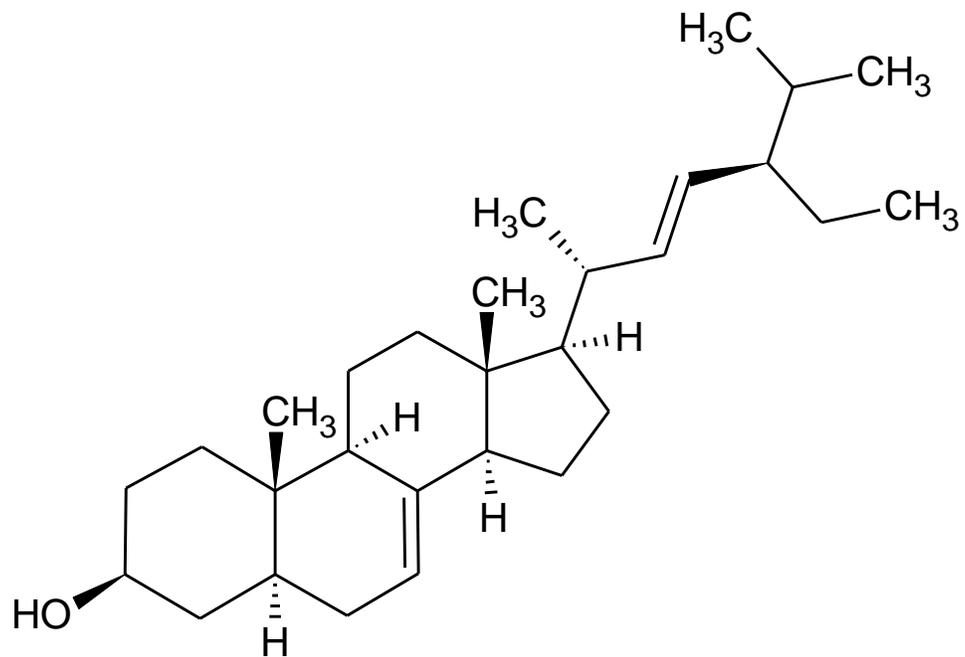
Para corroborar lo anterior, se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones, HSQC, que nos permite ver la correlación de protón y carbono que estén unidos directamente, HMBC, nos permite conocer la correlación entre protón y carbono que estén unidos a 2-3 enlaces de distancia, COSY, nos permite conocer la correlación entre los protones que estén unidos directamente y DEPT 135 nos permite conocer la naturaleza de los carbonos.

Los resultados del HSQC (Figura 6) nos muestran que las señales de desplazamiento químico de 71.1 y 3.52 ppm son debidas al carbono unido al grupo hidroxilo (C3), las señales a 138.15 y 5.1 ppm representan un carbono unido por una doble ligadura (C22), al igual que los desplazamientos de 129.45 y 4.98, 117.46 y 5.09

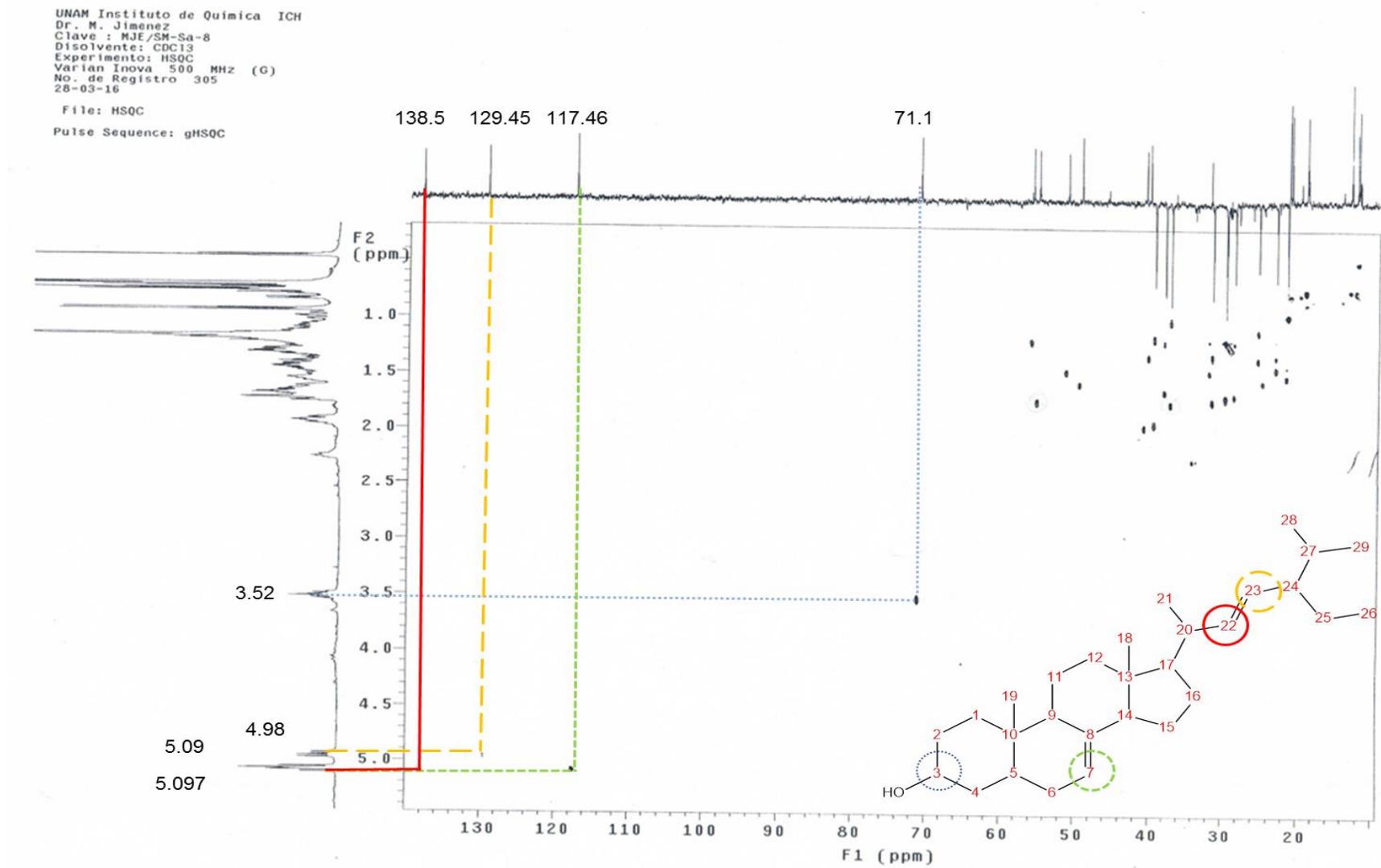
**Tabla IV.** Desplazamientos químicos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto espinasterol.

Posición	RMN $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) ppm	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ ) ppm	Espinasterol $^{13}\text{C}$ ( $^1\text{H}$ )
1	37.155	1.01, 1.74	37.1 (1.09, 1.82)
2	31.479	1.36, 1.72	31.5 (1.39, 1.77)
3	71.079	3.52 (1H, m)	71.1 (3.6, 1H, m)
4	37.997	1.18, 1.63	38.0 (1.27, 1.70)
5	40.275	1.33	40.3 (1.4)
6	29.69	1.15, 1.68	1.22, 1.74
7	117.46	5.09 (1H, m)	117.5 (5.18, 1H, m)
8	139.56	---	139.6
9	49.466	0.66	49.5 (1.66)
10	34.23	---	34.24
11	21.555	1.5	21.6 (1.48)
12	39.476	1.18, 1.92	39.6 (1.23, 2.0)
13	43.29	---	43.3
14	55.135	1.74	51.15 (1.81)
15	23.086	1.31, 1.44	23.0 (1.40, 1.52)
16	28.498	1.2, 1.66	28.5 (1.25)
17	55.918	1.18	55.95 (1.25)
18	12.049	0.5	12.05 (0.55)
19	13.037	0.72	13.0 (0.8)
20	40.817	1.97	40.8 (2.05)
21	21.372	1.5	21.4 (1.02)
22	138.158	5.1 (1H, dd)	138.15 (5.17, 1H, dd)
23	129.457	4.983 (1H, dd)	129.48 (5.09, 1H, dd)
24	51.253	1.45	51.26 (1.55)
25	31.874	1.48	31.9 (1.55)
26	21.079	0.75	21.2 (0.85)
27	18.99	0.72, 0.85	19.0 (0.84)
28	25.393	1.09, 1.33	25.4 (1.18, 1.42)
29	12.24	0.75	12.2 (0.81)

Varian INOVA. 500 MHz.  $\text{CDCl}_3$ . (dd): Dobles de dobles. (m): Multiplete.



**Figura 5.** Estructura química del esteroide spinasterol.



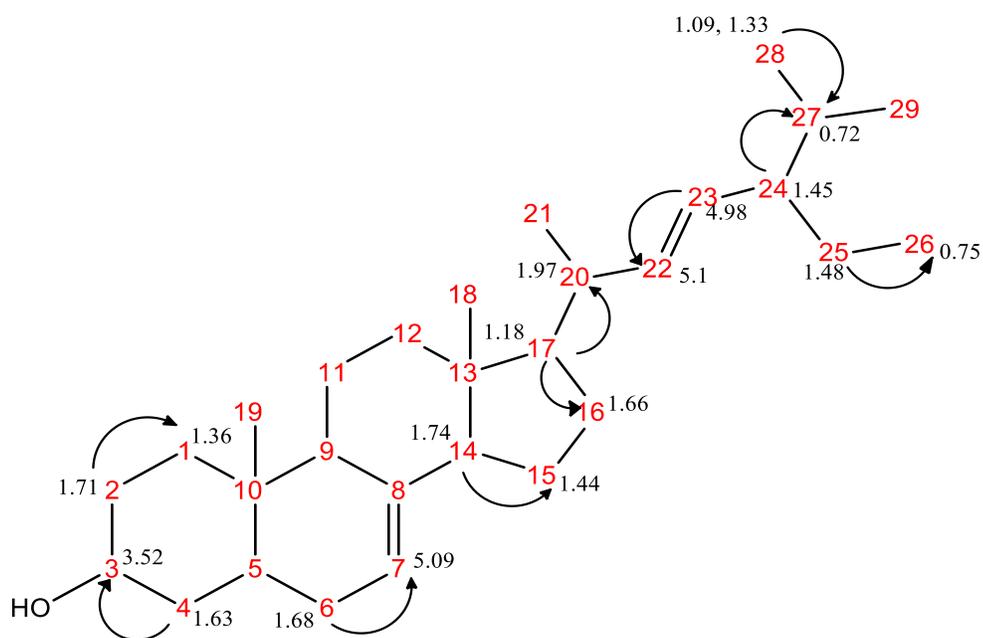
**Figura 6.** HSQC de la FxC 8, señales principales y posición en la estructura del compuesto espinasterol.

ppm (C23 y C7 respectivamente), la señal de 139.56 ppm no aparece conectada a ninguna señal de protón, por lo que probablemente es un carbono cuaternario. Los resultados de COSY (Figura 7) nos muestran una correlación directa entre el protón a desplazamiento químico de 5.1 y 4.98 ppm, confirmando la unión del carbono de 138.15 y 129.45 ppm por un doble enlace, la señal de 1.18 y 1.97 ppm, demuestran la correlación de los C17 y C20, carbonos que se encuentran entre la unión del núcleo esterano y la cadena alifática, también nos muestra la correlación entre las señales de desplazamientos químicos de 3.52 y 1.63 ppm, correspondientes a la unión de C3 y C4.

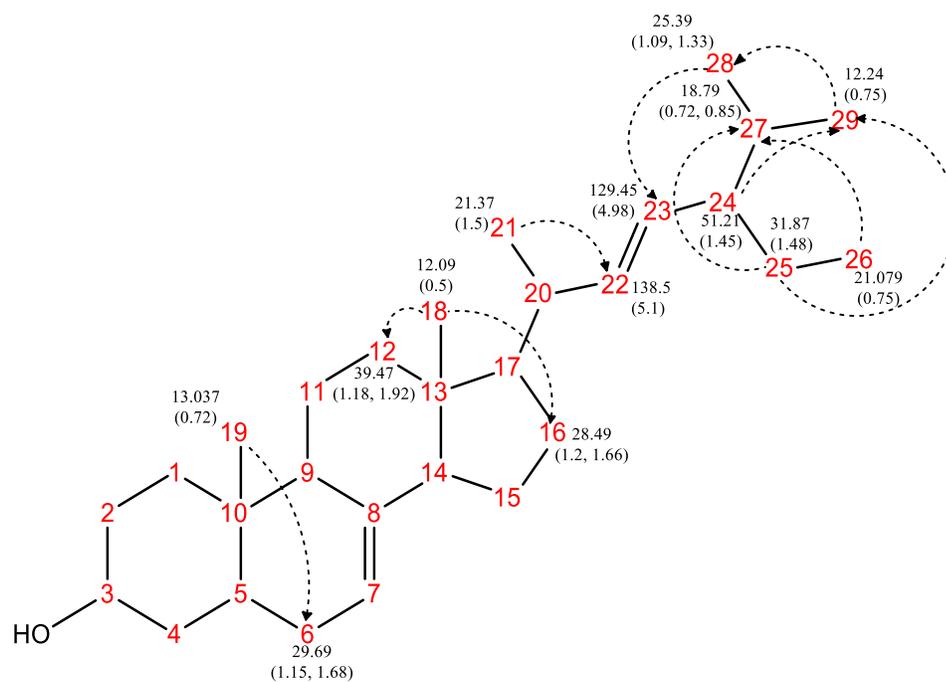
Como se muestra en la Figura 8, los resultados de HMBC muestran la correlación que hay entre las señales a desplazamiento químico de 13.037 y 1.18 ppm que corresponden al C19 y C6 a 3 enlaces de distancia, las señales de 12.049 y 1.18, 1.2 enlaces de distancia, las señales de 21.372 y 5.1 ppm corresponden al C21 unido a 2 enlaces de distancia con el C22, la señal de 51.25 y 0.75 ppm corresponden al C24 unido a 2 enlaces de distancia con el C29, la señal de 31.87 y 0.85, 0.75 corresponden a la unión del C25 con el C27 a 2 enlaces de distancia y a la unión con el C29 a 3 enlaces de distancia, las señales de 25.39 y 4.98 ppm corresponden a la unión del C28 con el C23 a 3 enlaces de distancia y las señales de 12.24 y 1.09 ppm corresponden al C29 unido a 2 enlaces de distancia con el C28.

Los resultados de DEPT 135 (Figura 9) nos corroboran la existencia de 3 carbonos cuaternarios a desplazamientos químicos de 139.56, 43.292 y 34.232 ppm, correspondiendo al C8, C10 y C13 respectivamente, confirmando lo mencionado anteriormente que un carbono cuaternario está unido por un doble enlace; también nos muestra que hay 9 carbonos en forma de CH<sub>2</sub>, con señales de desplazamiento químico de 39.47, 37.99, 37.15, 31.48, 29.65, 28.5, 25.4, 23.02 y 21.55 ppm correspondiendo a los C12, C4, C1, C2, C6, C16, C28, C15 y C11 respectivamente, coincidiendo con los que hay en la estructura del espinasterol dentro del núcleo esterano y en la cadena alifática.

Los resultados de la espectrometría de masas (Figura 10) nos muestran que el peso molecular del compuesto es de 412 UMA, similar al del esterol espinasterol el cual tiene



**Figura 7.** Experimento COSY del compuesto obtenido de la FxC 8, espinasterol.



**Figura 8.** Experimento HMBC del compuesto espinasterol.

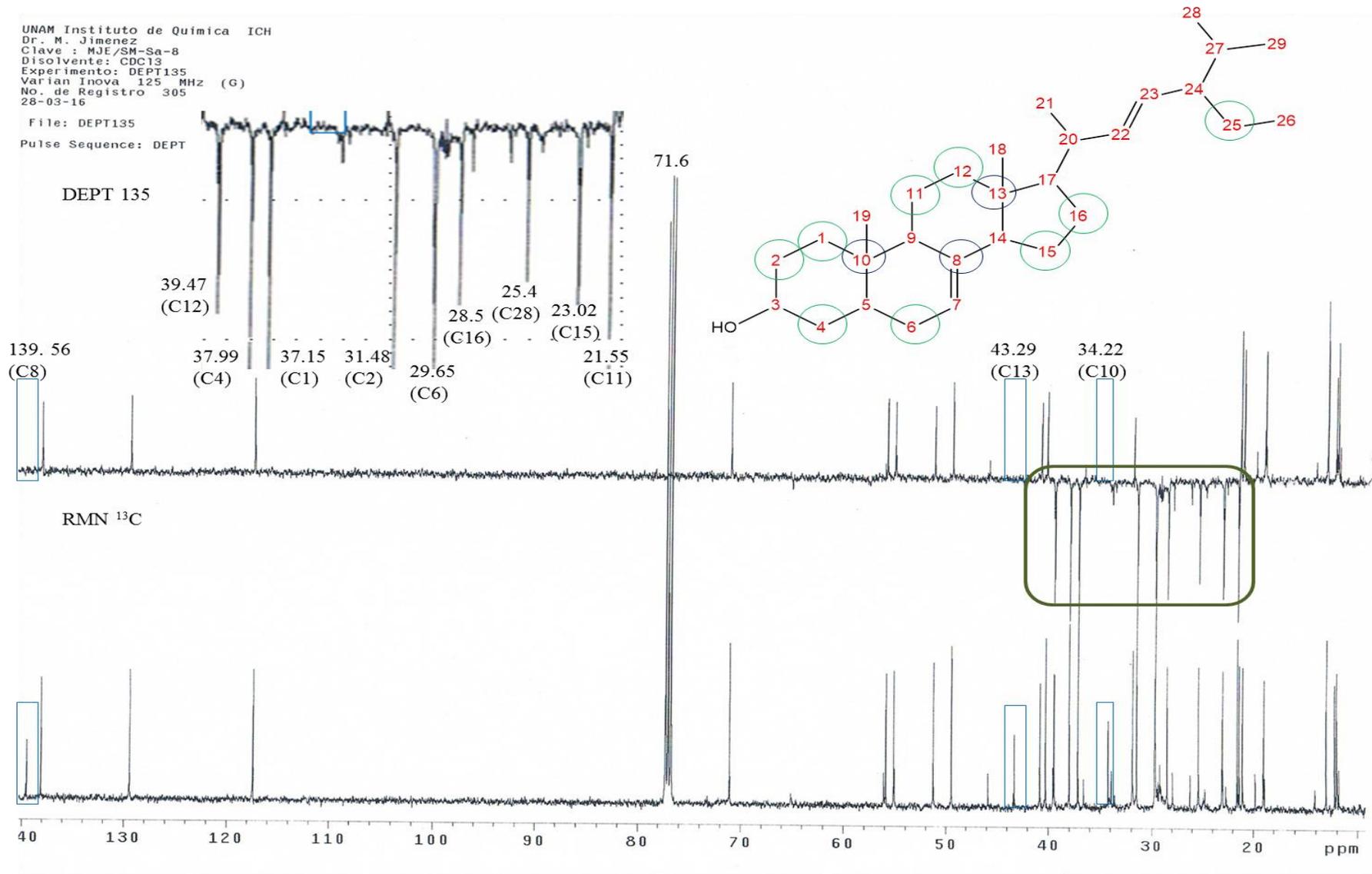
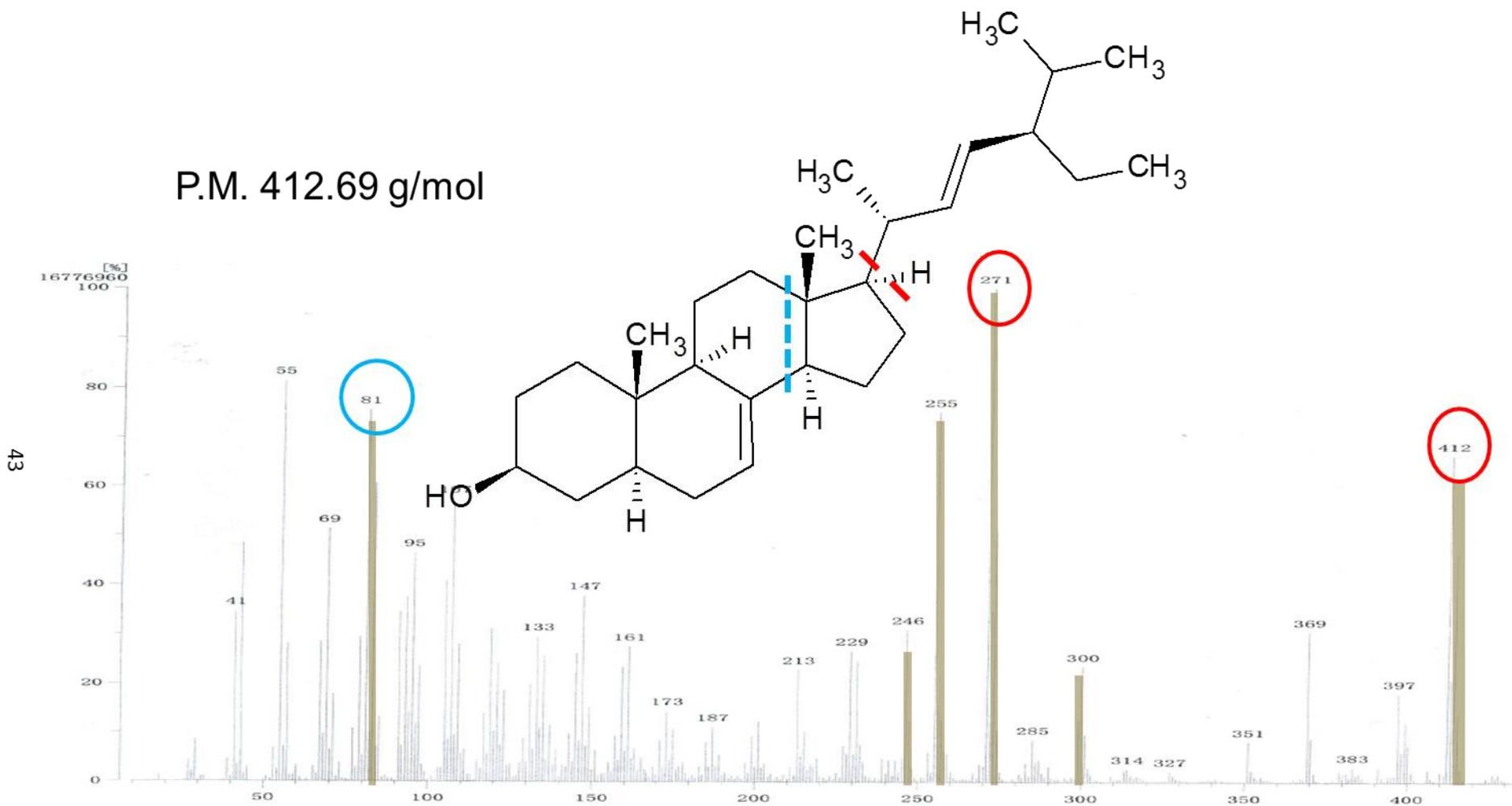


Figura 9. Experimento DEPT 135 del compuesto aislado de la FxC 8, spinasterol.



**Figura 10.** Espectro de masas del compuesto aislado de la FxC 8, espinasterol, los patrones de fragmentación típicos y la parte de la estructura a la que corresponde la pérdida de UMA.

un peso molecular de 412.69 g/mol, con patrón de fragmentación de 81, 246, 255, 300 y 412 UMA, donde la pérdida de 141 UMA del pico de fragmentación de 271 - 412 corresponden a la cadena alifática lateral del esteroles y la pérdida de 271 UMA, corresponden al núcleo esterano (Figura 10).

El espinasterol es un esteroles aislado por primera vez de la espinaca, y ha sido aislado en numerosas plantas de familias como Phytolaccaceae, Cucurbitaceae, Polygalaceae, entre otras cercanas a Stegnospermaceae. Este esteroles ha demostrado tener varias actividades biológicas tales como antiinflamatoria, citoprotectora, antiulcerogénica, antidepresiva, antiproliferativa y antitumoral (Jeong y cols., 2010; Ntie-Kang y Yong, 2014).

### **Espinasterol y Actividad Biológica**

Jeong y col. (2010), evaluaron el efecto antiinflamatorio y citoprotector de espinasterol aislado de la parte aérea de la planta *Aster scaber* (Asteraceae) en la línea celular BV2 (microglia), en el cual este esteroles inhibió la producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducida por LPS, debido a la activación de la vía de señalización de las MAP cinasas, y un efecto citoprotector contra la neurotoxicidad inducida con glutamato en la línea celular HT22 (hipocampo murino), posiblemente de la expresión de la vía de señalización EKT.

Borges y col. (2013), evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico, la fracción de diclorometano y el esteroles espinasterol obtenidos de la planta *Polygala sabulosa*, en el cual la fracción de diclorometano y espinasterol redujeron la respuesta inflamatoria inducida por LPS en ratones con peritonitis, demostrando que el esteroles juega un rol en el control de la inflamación aguda. Lee y col. (2012), evaluaron la producción de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias del espinasterol glucosado en la línea celular RAW 264.7 (macrófagos murinos), donde el esteroles glucosado mostró un efecto inhibitorio en la producción de óxido nítrico y

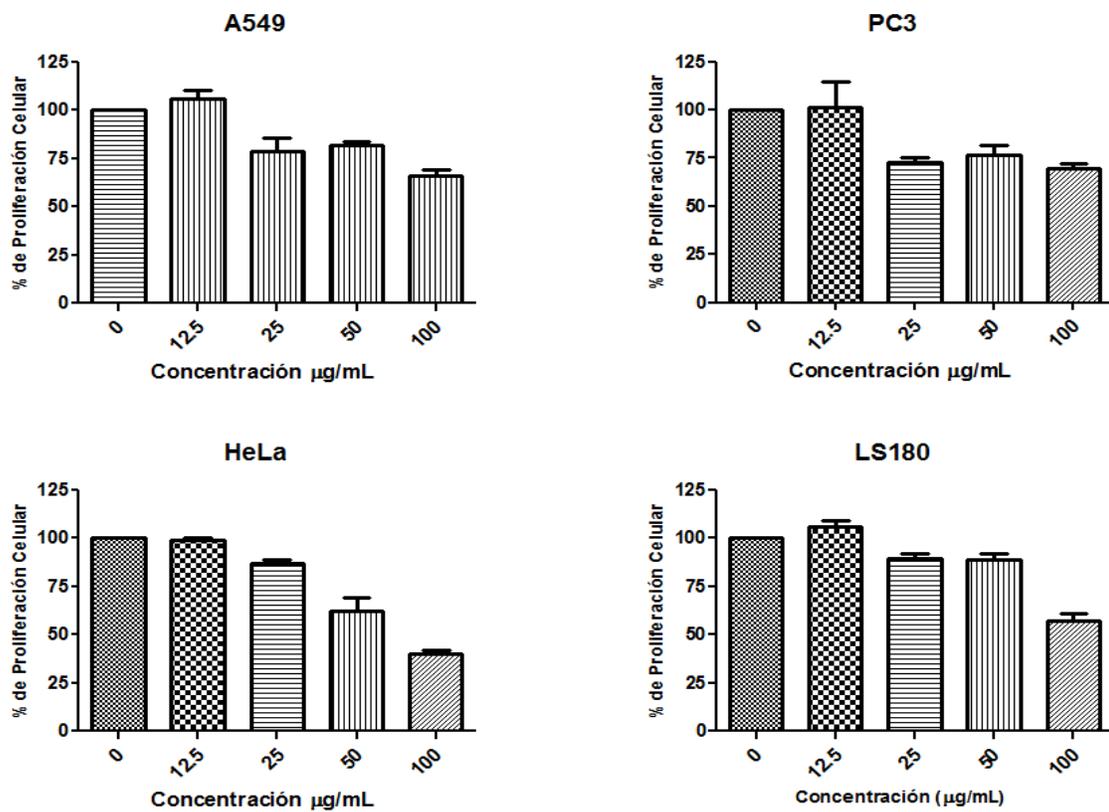
citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  en macrófagos estimulados con LPS, debido a la inhibición de la vía de las MAP cinasas, ERK1/2, JNK y p38 y bloqueo de la vía NF- $\kappa$ B.

Klein Jr. y col. (2010), demostraron el efecto antiulcerogénico del extracto, fracciones y el compuesto espinasterol obtenidos de la planta *Polygala cyparissias* (Polygalaceae), en donde se utilizó un modelo de úlceras inducidas con etanol/HCl, en el cual este esteroide inhibió aproximadamente el 86.2 % de las lesiones. Por otro lado, Socala y Wlaz (2016), evaluaron la capacidad antidepressiva y ansiolítica del espinasterol, donde este no produjo un efecto ansiolítico en los estudios de la prueba luz/oscuridad, pero sí un efecto antidepressivo agudo en la prueba de nado forzado en modelo murino, posiblemente debido a una selectividad antagonista del receptor TRPV1 en el cerebro.

### **Actividad Antiproliferativa del Espinasterol**

Para comprobar si el compuesto aislado, espinasterol, mostraba actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares, se utilizó el método MTT, evaluándose concentraciones de 100 a 12.5  $\mu$ g/mL sobre las líneas celulares HeLa, A549, LS-180 y PC3 (Figura 11).

Los resultados muestran un efecto inhibitorio por encima del 50% de la proliferación celular en las líneas celulares A549, PC3 y LS-180 a la máxima concentración utilizada, sin embargo, en la línea celular HeLa, se muestra un efecto antiproliferativo entre la concentración de 100 y 50  $\mu$ g/mL. Esta línea celular en los ensayos de los extractos metanólicos y en la fracción de hexano no había mostrado ser sensible a éstos, con valores de IC<sub>50</sub> por encima de los 400  $\mu$ g/mL para los extractos y de 349.7  $\mu$ g/mL para la fracción de hexano.



**Figura 11.** Actividad antiproliferativa del compuesto espinasterol.

Diversos estudios demuestran el potencial antiproliferativo y antitumoral del espinasterol, como los realizados por Villaseñor y Domingo (2000) quienes demostraron el potencial antitumoral del espinasterol aislado de las flores de la calabaza (*Cucurbita máxima*) en un modelo de cáncer de piel en ratones, con una disminución de los tumores de 55-65 % aproximadamente.

Ravikumar y col. (2010) investigaron el extracto de éter de petróleo de las semillas de *Polyalthia cerasoides*, en el cual se aisló el esteroide espinasterol para evaluar su actividad antiproliferativa en contra de la línea celular CACO-2 (cáncer de colon), donde espinasterol mostró actividad con un valor de IC<sub>50</sub> de 57.7 nM/mL, también se observaron cambios morfológicos típicos de la apoptosis, posteriormente se confirmó por análisis de fragmentación de ADN.

Csupor-Loeffer y col. (2011), evaluaron la actividad antiproliferativa del extracto de las raíces de la planta *Conyza canadensis*, en la que uno de los compuestos aislados y evaluados fue espinasterol en contra de las líneas celulares HeLa (cáncer cervical), MCF-7 (cáncer de mama), A431 (cáncer de piel) y MRC-5 (célula pulmonar normal), con valores de IC<sub>50</sub> de 61.4 μM, 48.2 μM, 35.3 μM y 61.1 μM respectivamente.

Jeon y col. (2005), evaluaron la capacidad antiproliferativa del extracto de raíz de la planta *Puereria mirifica* y sus fracciones, aislando como producto final el espinasterol, en contra de líneas celulares de origen mamario (MDA-MB-231, MCF-7, ZR-75-1, Hs578T, SK-BR-3), cervical (HeLa, CaSki), ovárico (2774, OVCAR-3, PA-1, SK-OV-3), colorectal (HT-29, SW480, HCT116, DLD-1) y hepático (PLC/PRF-5, SK-Hep-1), en el cual el extracto de la raíz y el esteroide aislado, espinasterol, mostraron un fuerte efecto sobre las líneas celulares cancerígenas de origen ginecológico de mama (MCF-7, MDA-MB-231), ovario (2774) y cérvix (HeLa), probablemente actuando como un fitoestrógeno, como un agonista de receptor de estrógenos E<sub>2</sub> con actividad preferencial en E<sub>α</sub>.

El sistema de señalización de los receptores de estrógenos (ER) juega un rol crucial en el desarrollo de las funciones normales de las características reproductivas en

los seres vivos; estos receptores son abundantes en los tejidos de hombres y mujeres, se conocen 2 tipos de receptores de estrógenos, ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Ambos receptores de estrógenos, son factores de transcripción de genes envueltos en la proliferación, diferenciación y migración celular, e involucran vías de señalización como la del factor de crecimiento epidermal (EGF) y la vía de señalización Notch. El ER $\alpha$  es más activo en el periodo neonato, y ER $\beta$  domina durante la pubertad y en la adultez; en general ER $\alpha$  actúa directamente en la proliferación celular y el ER $\beta$  en la diferenciación y apoptosis. Se ha demostrado que algunos fitoestrógenos muestran mayor afinidad hacia un receptor que otro, se ha reportado que algunos fitoestrógenos que se unen al ER $\beta$  ayudan en la prevención del cáncer colorrectal, también se reporta que cuando el ER $\beta$  es el receptor predominante en células normales de mama, los niveles de estos son reducidos en los tumores mamarios, ambos receptores se distribuyen en diferentes partes del cuerpo humano y ratones, se pueden encontrar en el sistema nervioso central, sistema intestinal, sistema cardiovascular, sistema inmune, riñones, hígado, huesos, mama, cervix, pulmones, colon, próstata, entre otros (Rollerova y Urbancikova, 2000; Heldring y col, 2007; Bai y Gust, 2009; Xiong y col., 2015).

El ER $\alpha$  y ER $\beta$  son productos separados de 2 genes diferentes, la ER $\alpha$  consiste en 596 aminoácidos con un peso molecular de 66 kD y se localiza en el cromosoma 6, mientras que el ER $\beta$  consta de 530 aminoácidos con peso molecular de 28 kD y se encuentra en el cromosoma 14, ambos poseen una estructura compuesta por 6 regiones funcionales, A/B, C, D, E y F, los cuales muestran 4 importantes funciones, unión de ligando, dimerización, unión al ADN y activación de la transcripción. El ER $\alpha$  y ER $\beta$  ha demostrado asociaciones con proteínas que activan la vía de las MAP cinasas que está involucrada en la proliferación y diferenciación celular (Rellenova y Urbancinkova, 2000, Bai y Gust, 2009).

Jeon y cols. (2005) reportan la actividad antiproliferativa de espinasterol presentada en las líneas celulares de cáncer mamario y de cervix, podría ser debido a la acción de este compuesto como fitoestrógeno, posiblemente actuando como un agonista del E<sub>2</sub> (estradiol) con afinidad hacia el receptor de estrógenos ER $\alpha$ . El cáncer de mama

es frecuentemente hormona – dependiente, es decir que las hormonas estimulan el crecimiento de células cancerosas, debido a la activación de vías de señalización que controlan la maduración, proliferación, apoptosis y metabolismo que influyen en el desarrollo y crecimiento de las células tumorales. Los fitoestrógenos son derivados químicos de plantas que tienen actividad estrogénica, los cuales se combinan con los ER e inician la activación de la transcripción. Algunos fitoestrógenos actúan como agonistas estabilizando la conformación de los receptores, facilitando la activación de la transcripción (Heldring y col., 2007; Bai y Gust, 2009).

Es probable que el compuesto espinasterol considerado en el presente trabajo actué como fitoestrógeno, e interactuó con los receptores de estrógeno, causando así una acción agonista y activando vías de señalización que cause la muerte de las células cancerosas utilizadas en la fase experimental de este proyecto, y que sea uno de los compuestos que otorguen su capacidad antiproliferativa al extracto metanólico del tallo de *Stegnosperma halimifolium*.

## CONCLUSIONES

Los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa del extracto metanólico del tallo de la planta *Stegnosperma halimifolium* se encuentran en la parte no polar del extracto metanólico.

Las fracciones de hexano y acetato de etilo mostraron la mejor actividad antiproliferativa contra de todas las líneas celulares utilizadas.

Las fracciones cromatográficas 7, 9, 10 y 11 obtenidas de la fracción de hexano mostraron mejor actividad antiproliferativa que la fracción que les dio origen.

Se aisló y caracterizó el esterolespinasterol.

El compuesto espinasterol presenta actividad antiproliferativa contra la línea celular HeLa.

## RECOMENDACIONES

Trabajar en la purificación de la fracción de acetato de etilo, para conocer la composición química de los compuestos responsables de la actividad antiproliferativa.

Aumentar el número de líneas celulares para la evaluación de la actividad antiproliferativa.

Probar los extractos metanólicos y sus fracciones con otros experimentos para encontrar otras actividades biológicas de *Stegnosperma halimifolium*.

## REFERENCIAS

- American Cancer Society. 2013. Cancer de origen primario desconocido. [Acceso: 02 de Noviembre de 2014]. Recuperado de: [www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002285-pdf.pdf](http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002285-pdf.pdf)
- American Cancer Society. 2014. The history of cancer. EE. UU. [Acceso: 10 de Junio de 2016]. Recuperado de: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>
- Avalos García A, Pérez Urria E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.
- Bai Z. y Gust R. 2009. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch. Pharm. Life Sci.* 342: 133 – 149.
- Balunas M, Kinghorn AD. 2005. Drugs discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. 78: 431- 441.
- Borges FR, Silva MD, Cordova MM, Schambach TR, Pizzolatti MG, Santos AR. 2014. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid  $\alpha$ -spinasterol from *Polygala sabulosa*. *J.Ethnopharmacol.* 151: 144-150.
- Canell RJ. 1998. Natural Products Isolation. Humana Press Inc. Totowa, N. Jersey. USA.
- Choi SZ, Lee SO, Choi SU, Lee KR. 2003. A new sesquiterpene hydroxiperoxide from aerial parts of *Aster ohari*. *Arch. Pharm. Res.* 26 (7): 521 - 525.
- Cohen SM, Ellwein LB. 1991. Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Research*. 51: 6493-6505.
- Colegate SM., y Molyneux R.J. 2008. Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structural determination. CRC Press. USA.
- Csupor-Loeffler B, Hajdu Z, Zupko I, Molnar J, Forgo P, Vasas A, Kele Z, Hohmann J. 2011. Antiproliferative constituents of the roots of *Conyza canadensis*. *Plant. Med.* 77: 1183-1188.

- Facchini PJ. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 29-66.
- González Vallinas M, González Castrejón M, Rodríguez Casado A, Ramírez de Molina A. 2013. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutrition Reviews.* 71 (9): 585-599.
- Guimarães AG, Serafini MR, Quintans Junior L. 2014. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Patents.* 24 (3): 243-265.
- Harvey A. 2000. Strategies for discovery drugs from previously unexplored natural products. *DDT.* 5: 294-300.
- Heldring N., Pike A., Andersson S., Mathews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Strom A., Treuter E., Warner M. y Gustafsson JA. 2007. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87: 905 - 931.
- Instituto Nacional de Cancerología. 2004. El cáncer: Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Colombia [Acceso: 27 de abril de 2014]. Recuperado de: [www.cancer.gov.co/documentos/Cartillas/El\\_cancer.pdf](http://www.cancer.gov.co/documentos/Cartillas/El_cancer.pdf)
- Jeon GC, Park MS, Yoon DY, Shin CH, Sin HS, Um SJ. 2005. Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria roots*. *Exp. Mol. Med.* 37 (2): 111 - 120.
- Jeong GS, Li B, Lee DS, Kim KH, Lee IK, Lee KR, Kim YC. 2010. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of spinasterol via induction of heme oxygenase-1 in murine hippocampal and microglial cell lines. *Int. Immunopharmacol.* 10: 1587-1594
- Jiménez Estrada M, Velázquez Contreras C, Garibay Escobar A, Sierras Canchola D, Lapizco R, Ortiz Sandoval C, Burgos A, Robles Zepeda RE. 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of plants of the ethnopharmacopeia from northwest of Mexico. *BMC Complement Altern. Med.* 13 (12): 2-8.
- Johnson GD, Moreno Salazar SF, López Estudillo R. 1996. Compendio fitoquímico de la medicina tradicional. Universidad de Sonora. 235.

- Jordan MA. 2002. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*. 2: 1-17.
- Klein LC, Becker R, Santin JR, Lemos M, Filho VC, Faloni de Andrade S. 2010. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St Hillaire & Moquin (Poligalaceae). *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. 381: 121-126.
- Kren V, Martinkova L. 2001. Glucosides in medicine “The role of glycosidic residue in biological activity”. *Curr. Med. Chem*. 8: 1303-1328.
- Kubitzki K., Rohwer H., Bittrich V. 1993. The families and genera of vascular plants. Flowering plants Dicotyledons. Vol. II. Elsevier. USA.
- Kurkin VA. 2003. Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis and biological activity. *Chem. Nat. Compd*. 39 (2): 123-153.
- Laza Loaces D, Rodríguez Luis I, Sardiña Cabrera G. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med*. 8(3).
- Lee TH, Jung M, Bang MH, Chung DY, Kim J. 2012. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF-B activation in RAW 264.7 macrophages cells. *Int. Immunopharmacol*. 13: 264-270.
- Leyva Peralta MA. 2013. Identificación de compuestos con actividad antiproliferativa de *Argemone gracilentia*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Liao W, Chen L, Ma X, Jiao X, Wang Y. 2016. Protective effects of kaempferol reactive oxygen species-induced hemolysis and its antiproliferative activity on human cancer cells. *Eur. J. of Med. Chem*. 114: 24-32.
- Luebeck EG, Hazelton WD. 2002. Multistage carcinogenesis and radiation. *J. Radiol. Prot*. 22: A43-A49.
- Martin de Civetta MT, Civetta JD. 2011. Carcinogénesis. *Salud Pública Mex*. 53 (5): 405-414.

- Moolgavkar SH, Luebeck EG. 2003. Multistage carcinogenesis and the incidence of the human cancer. *Genes Chrom Cancer*. 38: 302-306.
- Muthia A, Santoni A, Darwis D. 2015. Spinasterol: Steroids from *Filicium decipiens* stem bark. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis*. 3 (1): 1-5.
- NCI (National Cancer Institute). 2015. What is cancer? [Acceso: 10 de Junio de 2016]. Recuperado de: <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Ntie-Kang F, Young JN. 2014. The chemistry and biological activities of natural products from Northern African plant families: from Aloaceae to Cupressaceae. *RSC Adv*. 4: 61975- 61991.
- Ocegueda S, Moreno E, Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Conabio. Biodiversitas*. 62: 12-15.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2015. Cancer. [Acceso: 15 de Junio de 2016]. Recuperado de: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). 2016. Día mundial contra el cáncer. [Acceso: 15 de Junio de 2016]. Recuperado de: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11616%3Aworld-cancer-day-2016&catid=3788%3Acancer-events&Itemid=41707&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11616%3Aworld-cancer-day-2016&catid=3788%3Acancer-events&Itemid=41707&lang=es)
- Ortiz Sandoval C. 2010. Evaluación de la actividad antiproliferativa de las plantas *Struthantus palmeri*, *Krameria erecta* y *Stegnosperma halimifolium* originarias de Sonora sobre líneas celulares C3F6, L929, HeLa y RAW. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. México.
- Ragasa CY, Lim K. 2005. Sterols of *Cucurbita maxima*. *Philipp. J. of Sci*. 134 (2): 83-87.
- Rascón Valenzuela LA. 2011. Actividad antiproliferativa de las fracciones del extracto metanólico de la planta sonorensis *Acalypha californica* y caracterización química de sus componentes bioactivos. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.

- Rascón Valenzuela LA. 2015. Caracterización química y biológica de los compuestos químicos con actividad antiproliferativa del extracto metanólico de *Asclepias subulata* (Decne. 1844). Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. México.
- Ravikumar YS, Mahadevan KM, Manjunatha H, Satyanarayana ND. 2010. Antiproliferative, apoptotic and antimutagenic activity of isolated compounds from *Polyalthia cerasoides* seeds. *Phytomedicine*. 17: 513 - 518.
- Richardson M. 1981. Flavonoids of some controversial members of the Caryophyllales. *Pl. Syst. Evol.* 138: 227-233.
- Rizo Ríos P, González Rivera A, Sánchez Cervantes F, Munguía Martínez P. 2015. Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid Med Invest Salud*. 8 (1): 5-15.
- Rollernova E. y Urbancikova M. 2000. Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations*. 34: 203 - 218.
- Santizo Rodas IM. 2004. Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Schlaepfer L, Mendoza JA. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41 (4): 18-27.
- Sepúlveda Jiménez G, Porta Ducoing H, Rocha Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21 (3): 355-363.
- Sierras Canchola D. 2013. Determinación de la actividad antiproliferativa y mecanismo de apoptosis de fracciones del extracto metanólico de *Krameria erecta*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Socala K, Wlaz P. 2016. Evaluation of the antidepressant and anxiolytic like activity of  $\alpha$ -spinasterol, a plant derivative with TRPV1 antagonist effects, in mice. *Behav. Brain Res*. 303: 19-25.
- Sparg SG, Light ME, Van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacology*. 94: 219-243.

- Torres Moreno H. 2013. Aislamiento y caracterización química de compuestos con actividad antiproliferativa de *Ibervillea sonorae*. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. 2004. Ignore hallmarks of carcinogenesis: stem cells and Cell-Cell communication. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1028: 192-201.
- Trosko JE. 2006. From adult stem cells to cancer stem cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089: 36-58.
- Valdespino Gómez VM, Valdespino Castillo VE. 2011. Iniciación y progresión del cáncer: un sistema biológico. *GAMO*. 10 (6): 358-365.
- Villaseñor I., Domingo P. 2000. Anticarcinogenicity potencial of Spinasterol isolated of squash flowers. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 20: 99-105.
- Vivianco JM, Cosío E, Loyola-Vargas VM, Flores HG. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. *Investigación y Ciencia*. 68-75.
- Xiong R., Patel HK., Gutgesell LM., Zhao J., Delgado-Rivera L., Pham T., Zhao H., Carlson K., Martin T., Katzenellenbogen JA., Moore TW., Tonetti DA. y Thatcher G. 2016. Selective human estrogen receptor partial agonist (ShERPAs) for Tamoxifen resistant breast cancer. *J. Med. Chem.* 59: 219 - 237.
- Xu S, Patterson GW. 1990. Sterol composition of the Phytolaccaceae and closely related families. *Lipids*. 25(4): 230-234.
- Yetman D. y Van Devender T. Mayo Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico. Berkeley: University of California Press, 2002. Project MUSE
- Yokota J. 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3): 497-503.
- Zhang L, Yang X, Mei Zou Z, Yang S. 2005. A new sterol glycoside from *Securidaca innaependiculata*. *J. Asian Nat. Prod.* 7 (4): 649 - 653.

## ANEXO 1

### Perfil Fitoquímico Cualitativo

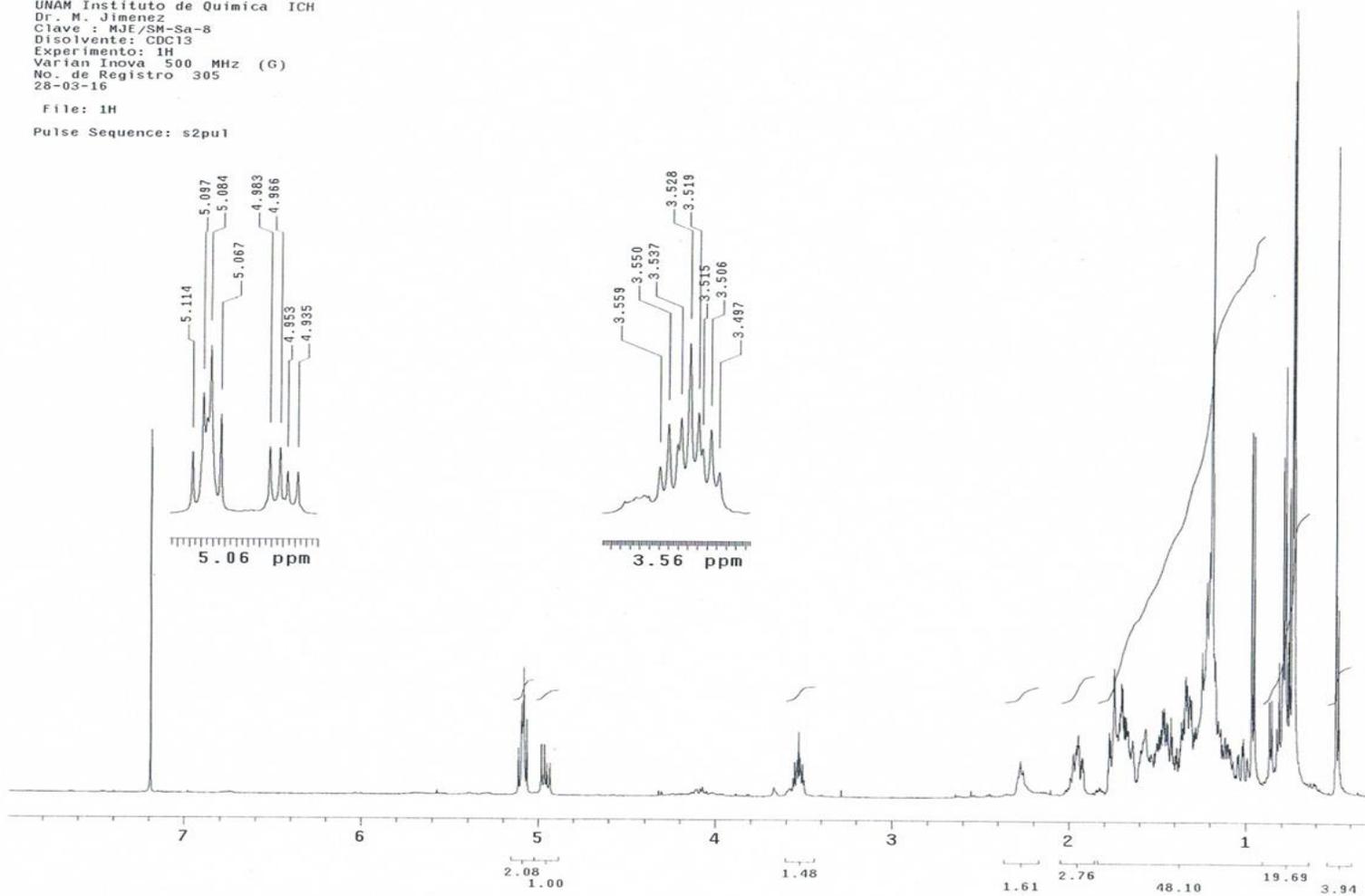
Para identificar la naturaleza de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones químicas del extracto metanólico de tallo de *Stegnosperma halimifolium*, se realizó un perfil fitoquímico cualitativo. Se usaron las siguientes pruebas para estos metabolitos: saponinas (pruebas de Rosenthaler y espuma), cumarinas (prueba del KOH), glucósidos (test de Keller – Kiliani), esteroides y terpenos (Liebermann – Buchnard), alcaloides (prueba de Meyer y Wagner), taninos (test de la gelatina), flavonoides (prueba del NaOH al 10%), quinonas (test de cloroformo) y compuestos fenólicos (prueba del cloruro férrico) (Leyva, 2013; Rascón, 2015).

## ANEXO 2

UNAM Instituto de Química ICH  
Dr. M. Jimenez  
Clave : MJE/SM-Sa-8  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Experimento: 1H  
Varian Inova 500 MHz (G)  
No. de Registro 305  
28-03-16

File: 1H

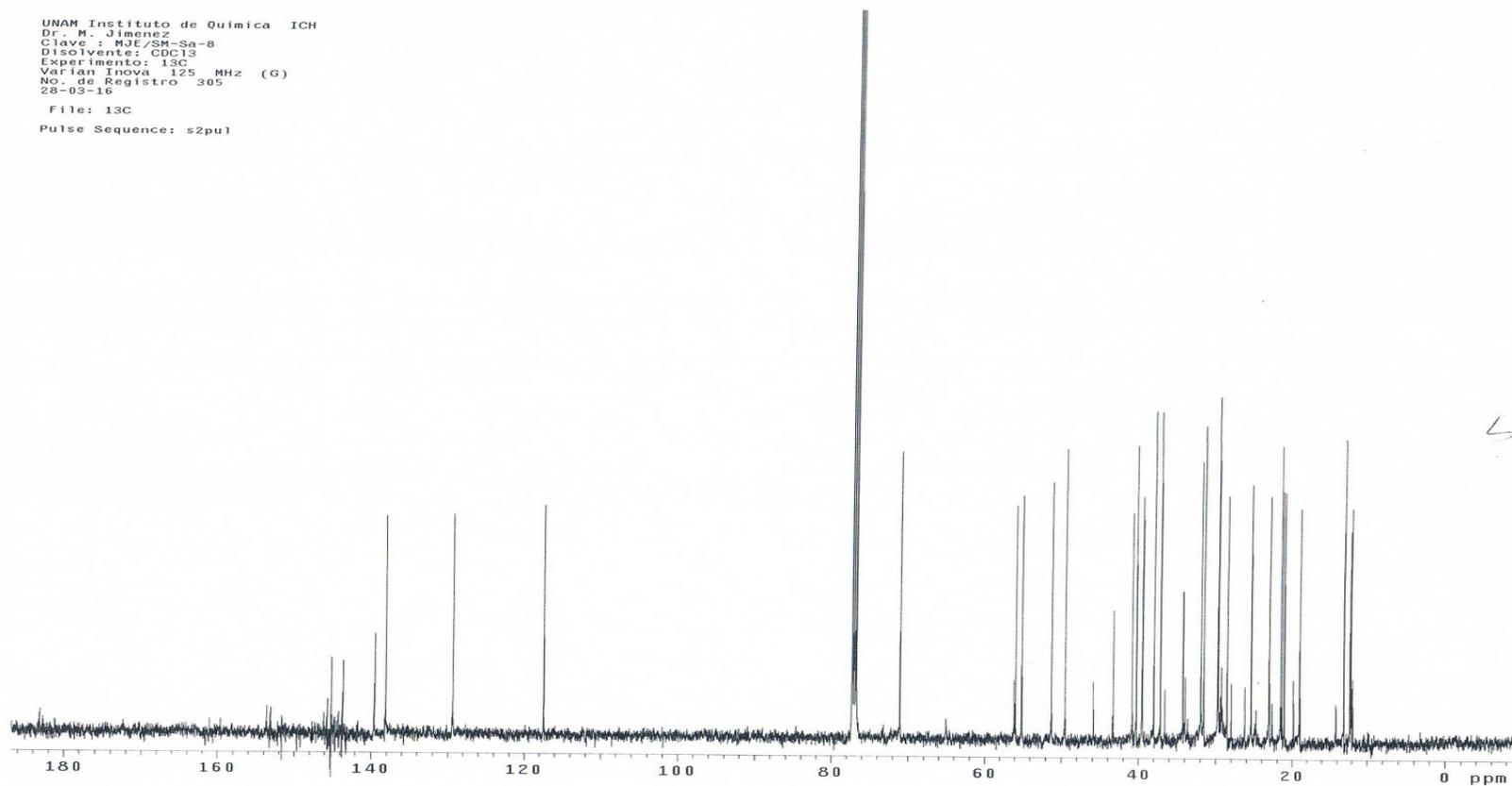
Pulse Sequence: s2pu1



Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la fracción 8. (Varian INOVA, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

### ANEXO 3.

UNAM Instituto de Química ICH  
Dr. M. Jiménez  
Clave : MJE/SM-Sa-8  
Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
Experimento: 13C  
Varian Inova 125 MHz (G)  
No. de Registro 305  
28-03-16  
File: 13C  
Pulse Sequence: s2pu1



09

Espectro de RMN <sup>13</sup>C de la fracción 8. Varian INOVA, 500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

## ANEXO 4.

# **Chemical characterization of fractions with antiproliferative activity of methanolic extract of *Stegnosperma halimifolium*.**

Salvador Enrique Meneses Sagrero <sup>a</sup>, Moisés Navarro Navarro <sup>a</sup>, Eduardo Ruiz Bustos <sup>a</sup>,  
Carmen Lizette del Toro Sánchez, Manuel Jiménez Estrada <sup>c</sup> and Ramón Enrique Robles  
Zepeda <sup>\*·a</sup>.

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo,  
Sonora, México.

<sup>b</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora,  
Hermosillo, Sonora, México.

<sup>c</sup> Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Cd. Universitaria, Cd. de México, México.

## **AUTHOR INFORMATION**

### **Corresponding authors**

\* Universidad de Sonora, Unidad Regional Centro, Departamento de Ciencias Químico  
Biológicas, Hermosillo, Sonora, Mexico. Tel: 52-662-2592162. Fax: 52-662-2592159.  
E-mail: [rrobles@guayacan.uson.mx](mailto:rrobles@guayacan.uson.mx) (R. E. Robles Zepeda)

**ABSTRACT:** Cancer is a major cause of death in the world, representing a significant problem of public health. Plants have been shown a great source of secondary metabolites with anticancer activity. The methanolic extracts of *Stegnosperma halimifolium* has been shown antiproliferative activity against cancer cell lines. The methanolic extract of stem and its hexanic and ethyl acetate fractions showed significant antiproliferative activity against the cell lines. The results show that the compounds responsible of the antiproliferative activity of *Stegnosperma halimifolium* are present in the non-polar fractions of the methanolic extract. The hexane fraction was fractioned by column chromatography, the fractions 7, 9, 10 and 11 shown better activities. The fraction 8 was characterized by NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , was isolated the sterol spinasterol. Spinasterol can be a responsible compound of antiproliferative activity of methanolic extract of *Stegnosperma halimifolium*.

**KEYWORDS.** *Stegnosperma halimifolium*, Stegnospermaceae, Antiproliferative Activity, Spinasterol.

## 1. Introduction.

Currently a lot of infectious, pathologic and degenerative process affects the health of humans. Cancer is one of the major causes of death in the world, in 2012 this disease causes the death of 8.2 million of people in the world, in Mexico is the third cause of death in the country (WHO 2016; INEGI 2015). Approximately 60% of the world's population relies almost entirely on plants for medication and natural products have long been recognized as an important source of therapeutically effective medicines (Harvey 2000). Mexico has around 4000 species of medicinal plants, however, estimate that the chemical, pharmacological and biomedical validation of the active principles carries out only in the 5% of the species (Oceguera et al., 2005). The state of Sonora, located in the northwest of Mexico, the ethnics has used around 450 different plants with medicinal purpose, include endemic and introduced species, some have been scientifically validated for their medicinal properties. The plants of Stegnospermaceae family and the genus *Stegnosperma* are a species unknown and poorly studied about their biological activities. Stegnospermaceae is a monogenic family that belongs to Caryophyllales order, the genus *Stegnosperma*; this is formed by 3 species, *watsoni*, *cubense* and *halimifolium*, it is widely distributed in the north of Mexico to Nicaragua and the Antilles (Johnson et al, 1996; Yeltman and Van Devender, 2002). The plants of genus *Stegnosperma* are rich in betalains (Kubitzki and Rohwer, 1993), the presence of glucosinolates (Vaughn and Berhow, 2005) and flavonoids like quercetin and kaempferol has been identified (Richardson 1981). The plant *Stegnosperma halimifolium* called commonly chapacolor or snake herb is a shrub, ovate leaf, small white flowers, and fruits like brown berries

with black seed inside, the November to March for flowering season, is found near to coast and hills. Is distributed mainly in Mexico, in the states of Sonora, Baja California, Sinaloa, Michoacán y Guerrero (Kubitzki and Rowher, 1993; Yetman and Van Devender, 2002). The Mayo and Seri ethnicity used the leaf of this plant to heal the bites of snake or cure the headache, tribes of Baja California used the powder of roots like soap substitute. Currently, exist little information about biological activity of *Stegnosperma halimifolium*. Studies realized Ortiz Sandoval (2010) shown the antiproliferative potential of the extract methanolic of *Stegnosperma halimifolium*, this extract was probed in the cell lines HeLa, RAW 264.7, M12.C3.F6 and L-929, shown IC<sub>50</sub> values between the 200 µg/mL. Due to this, is important research the biological potential of the species of *Stegnosperma*, the aim of the present work was chemical characterization of the compounds responsible of the extract methanolic of *Stegnosperma halimifolium*.

## **2. Material and Methods.**

### *2.1 Plant material.*

The stem and leaves of *Stegnosperma halimifolium* were collected in La Manga, around of the city of Hermosillo, Sonora, Mexico (29° 04' 59.3'' N, 111° 03' 02.9 '' W), in October 2014. Botanical specimens were identified by Professor Jesus Sanchez Escalante, head of Herbarium of University of Sonora with voucher specimen no. 22658.

### *2.2 Preparation of methanolic extracts and isolation of spinasterol.*

The stem and leaves were dried in the shade at room temperature and were powdered. The methanol extract was obtained by maceration of dried powder of *Stegnosperma halimifolium* in methanol for 10 days (Jiménez-Estrada et al. 2013). The solvent were removed by evaporation under reduced pressure at 40°C on a rotary evaporator. The methanolic extract of stem was partitioned with the following solvents: *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol consecutively. The preparations obtained of fractionation process were concentrated on a rotary evaporator under pressure at 40°C. The hexane fraction was separated by column chromatography with silica gel as stationary phase and *n*-hexane, ethyl acetate and methanol like gradient.

### *2.3 Cell lines cultures.*

L-929 (murine subcutaneous connective tissue), HeLa (human cervical carcinoma) and A549 (human alveolar carcinoma), LS-180 (colorectal adenocarcinoma), PC3 (prostate carcinoma) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). RAW 264.7 (murine macrophage transformed by virus Abelson leukemia) and M12.C3.F6 (murine cell B lymphoma) were provided by Dr. Emil A. Unanue (Department of Pathology and Immunology, Washington University in St. Louis, MO). Cells were cultured in DMEM supplement with 5% FBS at 37°C and a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### *2.4 Cell viability assay MTT.*

Cell viability assay was evaluated by the MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium] reduction assay with some modifications (Hernandez et al. 2007).

Briefly, cell ( $1 \times 10^4$  per well, 50  $\mu\text{L}$ ) were placed in each well of a 96-well plated. After 24 h incubation at 37C in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  to allow attachment, aliquots (50  $\mu\text{L}$ ) of medium containing different concentrations of extracts, fractions and spinasterol were added and the cell cultures were incubated for 48 h. Preliminary experiments established that the use of DMSO concentrations ranging from 0.06 to 2% in the cells cultures caused no cell damage. Previously, extracts, fractions and the compound spinasterol were dissolved in DMSO and subsequently diluted in the cultured medium. In the last 4 h of incubation time, the cells were washed with PBS. Fresh cultured medium and 10  $\mu\text{L}$  of a MTT solution (5mg/mL) were added to each well. The cell viability was assessed by the ability of metabolically active cells to reduce the tetrazolium salt to colored formazan. The formed formazan crystals were dissolved in acidic isopropyl alcohol. The absorbance of the samples was measured with an ELISA plate reader (Multiskan EX, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Using a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 650 nm. Proliferative cells were expressed in terms of percentage, where the optical density measured from vehicle-treated cells was considered 100% of proliferation. Antiproliferative activity of extracts, fractions and spinasterol was reported as  $\text{IC}_{50}$  values (the  $\text{IC}_{50}$  value was defined as the concentration of extract required to inhibit cell proliferation by 50%) using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Values of proliferation of at least three experiments, with six doses, in triplicated, were log transformed; normalized and nonlinear regression analysis was used to generate a dose-response curve to calculated  $\text{IC}_{50}$  values.

### *2.5 Qualitative phytochemical screening.*

In order to identify the classes of phytochemicals presents in the fractions obtains of the methanolic extract of stem of *S. halimifolium*; a quantitative phytochemical screening was conducted. We used the next specific test: saponins (Rosenthaler test, foam test), cumarines (KOH test), glycosides (Keller-Kiliani test), sterols and terpenes (Liebermann-Buchnard), alcaloids (Wagner, Meyer test), tannins (gelatin test), flavonoids (NaOH 10% test), quinones (chloroform test), and phenol compounds (ferric chloride test) (Rascon Valenzuela, 2011; Leyva Peralta, 2013).

### *2.6 Chemical characterization of spinasterol.*

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and bidimensional experiments were performed on a spectrometer Varian INOVA, operating in 500 MHz in all experiments. The samples were dissolved in deuterated chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ). Chemical shifts were given in  $\delta$  ppm, as internal reference, residual not deuterated dissolvent  $\text{CHCl}_3$  in  $\delta$  7.26 and tetramethylsilane (TMS) in  $\delta$  0 was used. MS experiments were performed on a spectrometer MStation JMS-700, with the next conditions: ionization mode was Electronic Impact (EI) in positive mode, range of analysis was 10-500 m/z, temperature was 3276.7 °C.

## **3. Results.**

### *3.1 Evaluation of antiproliferative activity of methanolic extracts of S. halimifolium.*

In order to evaluate the antiproliferative activity of methanolic extract of stem, leaves and a mixture of leaves/stem of *Stegnosperma halimifolium* these were tested against different cancer cell lines and non-cancer cell line. Methanolic extracts were tested with

concentrations range of 12.5 - 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on the cancer human cell lines A549 and HeLa, murine cancer cell lines RAW 264.7 and M12.C3.F6, and the murine non cancer cell line L-929. The methanolic extract of stem/leaves shown to be active against the murine cancer cell RAW 264.7 ( $\text{IC}_{50}=243.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) and M12.C3.F6 ( $\text{IC}_{50}=213.67 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), but not against the cell lines A549, HeLa and the non-cancer cell line L-929. The methanolic extract of stem shown antiproliferative activity against the cell line RAW 264.7 with values of  $\text{IC}_{50} = 118.09 \mu\text{g}/\text{mL}$ , but had not effect in the rest of the cell lines. The methanolic extract of leaves not shown antiproliferative activity against the cancer and non-cancer cell lines (Table I).

### *3.2 Evaluation of the fractions obtained of methanolic extract of stem.*

The methanolic extract of stem was fractioned with solvents of increasing polarity, obtained the hexanic, ethyl acetate and ethanol fraction. These solvent fractions were tested for antiproliferative activity under same conditions previously described. The hexane fraction shown to be active on the murine cancer cell lines RAW 264.7 and M12.C3.F6 with values of  $\text{IC}_{50} = 65.9 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $146.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, and shown antiproliferative effect against non-cancer cell line L-929 ( $\text{IC}_{50}=133.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). This fraction showed a low effect in the cancer cell line HeLa with  $\text{IC}_{50}$  values =  $343.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ , but against the cell line A549 shown antiproliferative activity with  $\text{IC}_{50}$  values of  $68.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ . The ethyl acetate fraction present antiproliferative activity against the murine cancer cell lines RAW 264.7 and M12.C3.F6 with  $\text{IC}_{50}$  values of  $50.8 \mu\text{g}/\text{mL}$  and  $78.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, and low effect against in the L-929 cell line with  $\text{IC}_{50}$  values =  $215.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ . In other hand, this fraction shown a low effect in the cancer cell line A549

( $IC_{50}=349.7 \mu\text{g/mL}$ ) and the HeLa cell line with  $IC_{50}$  values of  $133.4 \mu\text{g/mL}$ . The ethanolic fraction not showed antiproliferative activity against any cancer cell line and non-cancer cell line (Table II). Our results suggest that the responsible compounds of antiproliferative activity of *Stegnosperma halimifolium* found in the low polarity of the extract methanolic of stem.

### *3.3 Qualitative phytochemical screening.*

The qualitative phytochemical screening of solvents fractions obtained of methanolic extract of *Stegnosperma halimifolium* revealed the presence of sterols and terpenes in hexanic fraction, flavonoids in ethyl acetate fraction and phenolic compounds, flavonoids and saponins in the ethanol fraction. The results revealed that the compounds responsible of the antiproliferative activity of *Stegnosperma halimifolium* are terpenes and flavonoids compounds.

### *3.4 Antiproliferative activity of chromatographic fractions obtained of hexane fraction.*

The hexane fraction was fractioned by column chromatography, were 16 chromatographic fractions, were evaluated in the same conditions that the last experiments. The fractions 7, 9, 10 and 11 shown  $IC_{50}$  values of  $60.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $63.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $55.2 \mu\text{g/mL}$  and  $57.4 \mu\text{g/mL}$ , respectively, against the cancer cell line A549, shown a better antiproliferative effect that it origin fraction (Table III). The chromatographic fraction 8 was obtained as a white powder, and was characterized.

### *3.5 Chemical characterization of fraction 8.*

The chromatographic fraction 8 was obtained as a white solid amorphous, with a melt point of 169°C, soluble in chloroform and dichloromethane, in the TLC was observed a band purple defined when was revealed with phosphoric vanillin and didn't showed fluorescence at 254 and 365 nm.

In order to characterize the fraction 8 were carried out NMR and MS experiments. The <sup>1</sup>H NMR revealed the presence of 3 signals chemical displacement of 5.1, 5.09 and 4.98 ppm, indicated the presence of double bonds in the structure, 3.71 ppm signal revealed the presence of a proton joined at hydroxyl group. The <sup>13</sup>C NMR showed 4 signals to chemical displacement 139.56, 138.15, 129.45 and 117.6 ppm indicate the presence of carbons joins to double bonds, the 71.1 ppm signal represent carbon connected with hydroxyl group.

Compare the results of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR with the literature, found a compound with the similar signals (Table IV), the sterol spinasterol (Choi et al., 2003 Ragasa and Lim, 2005; Zhang et al, 2005; Muthia and Andalas, 2015). HSQC experiment shown signal chemical displacement 71.1 and 3.52 ppm was joined, corresponding to C3, the 138.15 and 5.1 ppm represent the signals of C22, 129.45 and 4.98 ppm, 117.46 and 5.09 ppm represent signals of double bonds (C23 and C7 respectively), the 139.56 ppm signal wasn't joined any proton signal, indicate the presence of quaternary carbon. COSY experiments showed the correlation of proton signal 5.1 and 4.98 ppm; confirm the presence of double bond with the carbon of displacement signal 138.15 and 129.45 ppm, corresponding to C22 and C23, the signal 1.18 and 1.97 ppm demonstrate the directly correlation of C17 and C20, carbons found between union steran nucleus and the

aliphatic chain lateral, too observe the correlation between the 3.52 and 1.63 ppm, corresponding to union of C3 and C4 (Figure 2). The HMBC experiment shown the correlation of the 13.037 and 1.18 ppm corresponding at C19 and C6, joined to 3 bonds of distance, 12.049 and 1.18, 1.2 according to C18 to relation of C12 at 2 bonds distance and C16 at 3 bonds of distance, 21,372 and 5.1 ppm signals correlate the C21 joined to C22 at 2 bonds distance, 51.25 and 0.75 ppm corresponding to join between C24 and C29 to 2 bonds of distance, 31.87 and 0.85, 0.75 ppm represent the C25 with C27 to 2 bonds of distance and C29 to 3 bonds of distance. 25.39 and 4.98 ppm represent the correlation of C28 and C23 to 3 bonds of distance, 12.24 and 1.09 ppm corresponding to C29 joined to C28 to 2 bonds of distance (Figure 3). DEPT 135 corroborated the presence of 3 cuaternarian carbons to chemical displacement signals to 139.56, 43.292 and 34.232 ppm, corresponding C8, C10 and C13 respectively, which the C8 was joined to C7 in a double bond. The presence of 9 CH<sub>2</sub> groups at signals 39.47, 37.99, 37.15, 31.48, 29.65, 28.5, 25.4, 23.02 and 21.55 ppm corresponding to C12, C4, C1, C2, C6, C16, C28, C15 and C11 respectively, coincidence with the spinasterol structure, 8 of the steran nucleus and 1 of the aliphatic chain. MS spectrum revealed the molecular weight of the compound is 412 UMA, with a fragmentation patron of 81, 246, 255, 300 and 412, where, the loss of 141 UMA between the fragmentations peak of 271 - 412 UMA corresponding to lose of the lateral aliphatic chain of sterol, and the loss of 271 UMA corresponding to steran nucleus .

### 3.6 Evaluation of antiproliferative activity of spinasterol.

The isolated compound spinasterol was evaluated for antiproliferative activity against cancer cell lines as HeLa, A549, LS-180 and PC3, the conditions were the same of the last experiments, were uses concentrations of 12.5 – 100 µg/mL for this experiment. The effect in the cell lines LS-180, A549 and PC3 didn't showed antiproliferative effect at the maxima concentration evaluated, however, spinasterol presented an antiproliferative effect in the cell line HeLa, with IC<sub>50</sub> values between 100 – 50 µg/mL.

## 4. Discussion.

The plants of genus *Stegnosperma* are species that has been poorly studied about their phytochemical components and biological activities. Recently researches about antiproliferative activity of methanolic extract of *Stegnosperma halimifolium* demonstrated the potential of this plant against cancer cell lines like HeLa, RAW 264.7 and M12.C3.F6 with IC<sub>50</sub> values between 200 – 400 µg/mL and didn't seen effect in the non-cancer cell line L-929, similar our results of the methanolic extract of stem/leaves with an effect in cell line RAW 264.7 and M12.C3.F6 with IC<sub>50</sub> value of 243.12 µg/mL and 213.67 µg/mL respectively, the effect of the cell line L-929 was similar too, with an IC<sub>50</sub> value under the last concentration evaluate (Ortiz Sandoval 2010; Jiménez-Estrada et al. 2013). However, the IC<sub>50</sub> values of the methanolic extract of stem shown better activity in the cell line RAW 264.7 (118.09 µg/mL), so that this methanolic extract was partitioned by extractions with ascendant polarity solvents. Has been demonstrated that purification process of methanolic extracts can be enhance the potential activity compare

to the original extract, the techniques more used is make extraction with solvents with different polarities like *n*-hexane, dichloromethane, ethanol or water, HPLC, column chromatography or supercritical fluid (Cannell 1998; Colegate and Molyneux, 2008). In this work, used the extractions with solvents, and obtained 3 fractions, *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol, where, the antiproliferative activity of hexane and ethyl acetate fractions were better than the initial methanolic extract of stem, shown activity in cell lines that the methanolic extract didn't have effect, like HeLa and A549 cell line, with IC<sub>50</sub> values of 343.2 µg/mL and 68.6 µg/mL respectively, for hexane fraction, and IC<sub>50</sub> values of 130.9 µg/mL and 349.7 µg/mL respectively, for the ethyl acetate fraction, and enhance the effect in the cell lines RAW 264.7 with IC<sub>50</sub> values of 65.9 µg/mL and 50.8 µg/mL respectively, for hexane and ethyl acetate fraction. The fraction chromatography 8 was obtained by column chromatography of the hexane fraction, and characterized the compound spinasterol. The phytochemical screening shown a positive result for terpenes and sterols, exist reports of the identification of sterols compounds like β-sitosterol and spinasterol in the plant *Stegnosperma halimifolium* (Xu and Patterson, 1990).

Spinasterol was isolated for first time in the spinach, and exist numerous references about the isolation of spinasterol in medicinal plants in families near to Stegnospermaceae, like Polygalaceae, Cucurbitaceae, Phytolaccaceae, among other. Spinasterol has demonstrated possess different biological activities as antiulcerogenic, antigenotoxic, antidepressant, anti-inflammatory and antiproliferative (Villasenor et al., 1996; Ntie-kang and Yong, 2014). Studies of spinasterol isolated of the extract of *Polygala cypris* (Polygalaceae) has been demonstrated the effect antiulcerogenic in a

murine model of ulcer induced by ethanol/HCl, inhibit 86.2% of the injuries (Klein et al., 2010). In other hand, studies demonstrated the antidepressant potential of spinasterol in the proof of forced swimming in mice, maybe an agonist selective effect of the receptor TRPV1 (Soc ała et al., 2015; Soc ała and Wlaż, 2016). Studies of spinasterol isolated of *Aster scaber* plant, evaluated the potential anti-inflammatory in the cell line BV2 (microglial cells), in which, the sterol inhibits the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  LPS induced (Jeong et al., 2010). Spinasterol isolated of the dichloromethane fraction of hydroalcoholic extract of *Polygala sabulosa*, demonstrated that this sterol play a role in the control of agude inflammation (Borges et al., 2014). Studies of the oxide nitric and pro-inflammatory cytokines of the glycoside spinasterol in the cell line RAW 264.7, the glycoside sterol shown an inhibitory effect in the oxide nitric and the cytokines production as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  (Lee et al., 2012).

Spinasterol has demonstrated their potential as an antiproliferative and antitumor compound (Villase or and Domingo, 2000); different studies in cell lines corroborated their effect. Isolation of spinasterol obtained of the methanolic extract of seeds of *Polyalthia cerasoides* was evaluated against the cell line CACO-2 (colorectal cancer), where, spinasterol shown activity with IC<sub>50</sub> values of 57.7 nM/mL (Ravikumar et al., 2010). Spinasterol isolated of the plant *Conyza canadensis* shown antiproliferative activity against cancer cell lines like HeLa, MCF-7, A431 and MRC-5 (Csupor-Loaffer et al., 2011). Studies in the methanolic extract of roots of *Pueraria mirifica*, where a final compound isolated was spinasterol, was probed against cell lines of gynecological origin, this compound shown a strong effect in cancer cell lines of breast (MCF-7 and

MDA-MB-231), ovarian (2774) and cervical (HeLa), maybe act like phytoestrogen, as agonist of the receptor of estrogen E<sub>2</sub> (estradiol) with affinity to estrogen receptor ER $\alpha$  (Shin et al., 2005). The system of signaling of the estrogen receptors (ER) plays a crucial role of the reproductive characteristics in the organism; ER $\alpha$  and ER $\beta$  are the most common, both is found in different parts of human and mice, are normal in the central nervous system, intestinal system, immune system, liver, bones, breast, cervix, prostate, colon, and kidney(Rollernova and Urbancinkova, 2000; Vegeto et al., 2003). Has been demonstrated that some phytoestrogen joins to ER $\beta$  helps to prevention of colorectal cancer (Barone et al., 2008) and exists reports that when the ER $\beta$  are controlling in the normal cells of breast, the levels of these are reducing in the breast tumor (Xiong et al., 2016). The phytoestrogen are chemical derivates of plants with estrogenic activity, some phytoestrogens act like agonist, stabilized the conformation of the receptors, facility the activation of transcription (Bai and Gust, 2009).

## **5. Conclusions.**

Based on the results, spinasterol isolated of the methanolic extract of *Stegnosperma halimifolium* shown antiproliferative activity in the cancer cell line HeLa, maybe this compound act like phytoestrogen, cause an agonist action and activate signalization pathway that cause of dead in this cancer cell line in the experimental process.

## **References.**

- Bai, Zhenlin, and Ronald Gust. 2009. "Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands." *Archiv Der Pharmazie* 342 (3): 133–49. doi:10.1002/ardp.200800174.

- Barone, Michele, Sabina Tanzi, Katia Lofano, Maria Principia Scavo, Raffaella Guido, Lucia Demarinis, Maria Beatrice Principi, Antongiulio Bucci, and Alfredo Di Leo. 2008. "Estrogens, Phytoestrogens and Colorectal Neoproliferative Lesions." *Genes and Nutrition* 3 (1): 7–13. doi:10.1007/s12263-008-0081-6.
- Borges, Fabio R M, Morgana D. Silva, Marina M. Córdova, Tiago R. Schambach, Moacir G. Pizzolatti, and Adair R S Santos. 2014. "Anti-Inflammatory Action of Hydroalcoholic Extract, Dichloromethane Fraction and Steroid  $\alpha$ -Spinasterol from Polygala Sabulosa in LPS-Induced Peritonitis in Mice." *Journal of Ethnopharmacology* 151 (1). Elsevier: 144–50. doi:10.1016/j.jep.2013.10.009.
- Choi SZ., Lee SO., Choi SU., Lee KR. 2003. "A New Sesquiterpene Hydroperoxide from the Aerial Parts of Aster Oharai." *Archive of Pharmaceutical Research* 26 (7): 521–25.
- Colegate SM., Molyneus RJ. 2008. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. Second. Boca Raton, FL, USA: Taylor and Francis. doi:10.5604/17322693.955499.
- Csupor-Loaffer, Boglarka, Zsuzsanna Hajdu, Itsvan Zupko, Judit Molnar, Peter Forgo, Andrea Vasas, Zolton Kele, and Judit Hohmann. 2011. "Antiproliferative Constituents of the Roots of Conyza Canadensis." *Planta Medica* 77 (11): 1183–88. doi:10.1055/s-0030-1270714.
- GD., Jonhson SF., Moreno Salazar R., Lopez Estudillo. 1996. *Compendio Fitoquimico de La Medicina Tradicional*. Edited by Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, Mexico. doi:10.1152/ajpregu.00402.2011.

- Harvey, Alan. 2000. "Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products." *Drug Discovery Today* 5 (7): 294–300. doi:10.1016/S1359-6446(00)01511-7.
- Hernandez, Javier, Francisco M. Goycoolea, Jael Quintero, Ana Acosta, Marco Castañeda, Zaira Dominguez, Refugio Robles, et al. 2007. "Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines." *Planta Medica* 73 (14): 1469–74. doi:10.1055/s-2007-990244.
- INEGI. 2015. "Día Mundial Contra El Cáncer ( 4 De Febrero )", 1–17.
- Jeong, Gil Saeng, Bin Li, Dong Sung Lee, Ki Hyun Kim, Il Kyun Lee, Kang Ro Lee, and Youn Chul Kim. 2010. "Cytoprotective and Anti-Inflammatory Effects of Spinasterol via the Induction of Heme Oxygenase-1 in Murine Hippocampal and Microglial Cell Lines." *International Immunopharmacology* 10 (12). Elsevier B.V.: 1587–94. doi:10.1016/j.intimp.2010.09.013.
- Jiménez-Estrada, Manuel, Carlos Velázquez-Contreras, Adriana Garibay-Escobar, Davisela Sierras-Canchola, Ricardo Lapizco-Vázquez, Carolina Ortiz-Sandoval, Armando Burgos-Hernández, and Ramón Enrique Robles-Zepeda. 2013. "In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Plants of the Ethnopharmacopeia from Northwest of Mexico." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13 (1): 12. doi:10.1186/1472-6882-13-12.
- Klein, Luiz Carlos, Renan Becker Gandolfi, José Roberto Santin, Marivane Lemos, Valdir Cechinel Filho, and Sérgio Faloni De Andrade. 2010. "Antiulcerogenic Activity of Extract, Fractions, and Some Compounds Obtained from *Polygala*

- Cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae).” *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 381 (2): 121–26. doi:10.1007/s00210-009-0485-x.
- Kubitzki, K., Rowher H., Brittich V. 1993. *The Families and Genera of Vascular Plants. Flowering Plants Dicotyledons*. Vol II. USA: Elsevier.
- Lee, Tae Hoon, Mira Jung, Myun Ho Bang, Dae Kyun Chung, and Jiyoung Kim. 2012. “Inhibitory Effects of a Spinasterol Glycoside on Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide and Proinflammatory Cytokines via down-Regulating MAP Kinase Pathways and NF-κB Activation in RAW264.7 Macrophage Cells.” *International Immunopharmacology* 13 (3). Elsevier B.V.: 264–70. doi:10.1016/j.intimp.2012.05.005.
- Leyva Peralta, Mario Alberto. 2013. “Identificación de Compuestos Con Actividad Antiproliferativa de Argemone Gracilenta.” Universidad de Sonora.
- Muthia, Ayu, and Universitas Andalas. 2015. “SPINASTEROL : STEROIDS FROM *Filicium Decipiens* STEM BARK.” *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* 3 (1): 3–8.
- Ntie-kang, Fidele, and Joseph N Yong. 2014. “RSC Advances The Chemistry and Biological Activities of Natural Products from Northern African Plant Families : From Aloaceae to Cupressaceae.” *RSC Advances* 4 (1992). Royal Society of Chemistry: 61975–91. doi:10.1039/C4RA11467A.
- Ocegueda S, Moreno E. and Koleff P. 2005. “Plantas Utilizadas En La Medicina Tradicional Y Su Identificación Científica.” *CONABIO* 62: 12–15.
- Ortiz Sandoval, Carolina. 2010. “Evaluación de La Actividad Antiproliferativa de Las

- Plantas *Struthantus Palmeri*, *Krameria Erecta* Y *Stegnosperma Halimifolium*  
Originarias de Sonora Sobre Lineas Celulares M12.C3.F6, L-929, HeLa Y RAW  
264.7.” Universidad de Sonora.
- Ragasa, Consolacion Y, and Kathleen Lim. 2005. “Sterols from Cucurbita Maxima.”  
*Philippine Journal of Science* 134 (December): 83–87.
- Rascon Valenzuela, Luisa Alondra. 2011. “Actividad Antiproliferativa de Las  
Fracciones Del Extracto Metanolico de La Planta Sonorense *Acalypha Californica*  
Y Caracterizacion Quimica de Sus Componentes Bioactivos.” Universidad de  
Sonora.
- Ravikumar, Y. S., K. M. Mahadevan, H. Manjunatha, and N. D. Satyanarayana. 2010.  
“Antiproliferative, Apoptotic and Antimutagenic Activity of Isolated Compounds  
from *Polyalthia Cerasoides* Seeds.” *Phytomedicine* 17 (7). Elsevier: 513–18.  
doi:10.1016/j.phymed.2009.09.005.
- Richard Cannell. 1998. *Natural Products Isolation*. Edited by Humana Press. *Methods in  
Biotechnology*. Totowa, NJ, USA: Elsevier. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Richardson, P Mick. 1981. “Flavonoids of Some Controversial Members of the  
Caryophyllales.” *Plant Systematic and Evolution* 138: 227–33.
- Rollernova, E., and M. Urbancinkova. 2000. “Intracellular Estrogen Receptors, Their  
Characterization and Function.” *Endocrine Regulations* 34: 203–18.
- Shin, Chul-Ho, Do-Young Yoon, Gook-Che Jeon, Hong-Sig Sin, Myoung-Soon Park,  
and Soo-Jong Um. 2005. “Antitumor Activity of Spinasterol Isolated from Pueraria  
Roots.” *Experimental & Molecular Medicine* 37 (2): 111–20.

doi:10.1038/emm.2005.15.

Socąła, Katarzyna, Dorota Nieoczym, Mateusz Pieróg, and Piotr Właż. 2015. “ $\alpha$ -Spinasterol, a TRPV1 Receptor Antagonist, Elevates the Seizure Threshold in Three Acute Seizure Tests in Mice.” *Journal of Neural Transmission* 122 (9): 1239–47. doi:10.1007/s00702-015-1391-7.

Socąła, Katarzyna, and Piotr Właż. 2016. “Evaluation of the Antidepressant- and Anxiolytic-like Activity of  $\alpha$ -Spinasterol, a Plant Derivative with TRPV1 Antagonistic Effects, in Mice.” *Behavioural Brain Research* 303: 19–25. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.048.

T., Yetman D. & Van Devender. 2002. *Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico*. Edited by University of California Press. Berkeley, CA, USA.

Vaughn, Steven F., and Mark A. Berhow. 2005. “Glucosinolate Hydrolysis Products from Various Plant Sources: pH Effects, Isolation, and Purification.” *Industrial Crops and Products* 21 (2): 193–202. doi:10.1016/j.indcrop.2004.03.004.

Vegeto, Elisabetta, Silvia Belcredito, Sabrina Eterri, Serena Ghisletti, Alessia Brusadelli, Clara Meda, Andrée Krust, et al. 2003. “Estrogen Receptor-Alpha Mediates the Brain Antiinflammatory Activity of Estradiol.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9614–19. doi:10.1073/pnas.1531957100.

Villasenor, Irene M., Pauline Lemon, Allan Palileo, and John B. Bremner. 1996. “Antigenotoxic Spinasterol From *Curcubita Maxima* Flowers.” *Mutation Research*

360: 89–93.

Villaseñor, Irene M., and Annette P. Domingo. 2000. “Anticarcinogenicity Potential of Spinasterol Isolated from Squash Flowers.” *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* 20 (3): 99–105. doi:10.1002/(SICI)1520-6866(2000)20:3<99::AID-TCM1>3.0.CO;2-7.

WHO. 2016. “Cancer 2016,” 1–6.

Xiong, Rui, Hitisha K. Patel, Lauren M. Gutgesell, Jiong Zhao, Loruham Delgado-Rivera, Thao N D Pham, Huiping Zhao, et al. 2016. “Selective Human Estrogen Receptor Partial Agonists (ShERPAs) for Tamoxifen-Resistant Breast Cancer.” *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (1): 219–37. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01276.

Xu, Shihua, and Glenn W. Patterson. 1990. “Sterol Composition of the Phytolaccaceae and Closely Related Families.” *Lipids* 25: 230–34. doi:10.1007/BF02535753.

Zhang L., Yang X., Mei Zou Z., Yang S. 2005. “A New Sterol Glycoside from *Securidaca Innapendiculata*.” *Journal of Asian Natural Products* 4: 649–53.

**TABLES.**

Methanolic extract	IC <sub>50</sub> ± Standard Desviation (µg/mL)				
	<b>L-929</b>	<b>RAW 264.7**</b>	<b>M12.C3.F6</b>	<b>HeLa</b>	<b>A549</b>
<b>Stem + Leaves</b>	> 400	243.12 ± 1.5	213.67 ± 1.3	> 400	> 400
<b>Stem</b>	> 400	118.09 ± 1.75	> 400	> 400	> 400
<b>Leaves</b>	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400
<b>Doxorubicin<sup>a</sup></b>	2.89 ± 0.11	0.38 ± 0.01	1.89 ± 0.06	> 4	2.5 ± 1.4

**Table I.** The results have been expressed in average ± standard deviation. (<sup>a</sup>) Positive control. (\*\*) Significant differences against the cell line L-929.

Fraction	IC <sub>50</sub> ± Standard Deviation (µg/mL)				
	<b>L-929</b>	<b>RAW 264.7**</b>	<b>M12.C3.F6**</b>	<b>HeLa</b>	<b>A549</b>
<b>Hexanic</b>	133.4 ± 1.4	65.9 ± 1.1	146.1 ± 1.4	343.2 ± 2.4	68.6 ± 1.3
<b>Ethyl Acetate</b>	215.8 ± 2.1	50.8 ± 1.1	78.4 ± 1.3	130.9 ± 1.1	349.7 ± 1.2
<b>Ethanol</b>	NP	NP	NP	NP	NP
<b>Doxorubicin<sup>a</sup></b>	2.89 ± 0.11	0.38 ± 0.01	1.89 ± 0.06	> 4	2.5 ± 1.4

**Table II.** The results have been expressed in average ± Standard Deviation. NP: Not Present Activity. (<sup>a</sup>) Positive control. (\*\*) Significant differences against the cell line L-929.

<b>Chromatographic Fraction</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL) ± SD</b>
1	> 100
2	71.9 ± 1.08
3	> 100
4	84.71 ± 1.32
5	81.13 ± 1.21
6	71.86 ± 1.29
7	60.45 ± 1.2
8	NE
9	63.4 ± 1.14
10	55.22 ± 1.09
11	57.39 ± 1.13
12	73.91 ± 1.17
13	84.65 ± 1.12
14	> 100
15	96.48 ± 1.6
16	95.69 ± 1.19

**Table III.** The results has been expressed in average ± Standar Desviation (NE): Sample

Not Evaluated

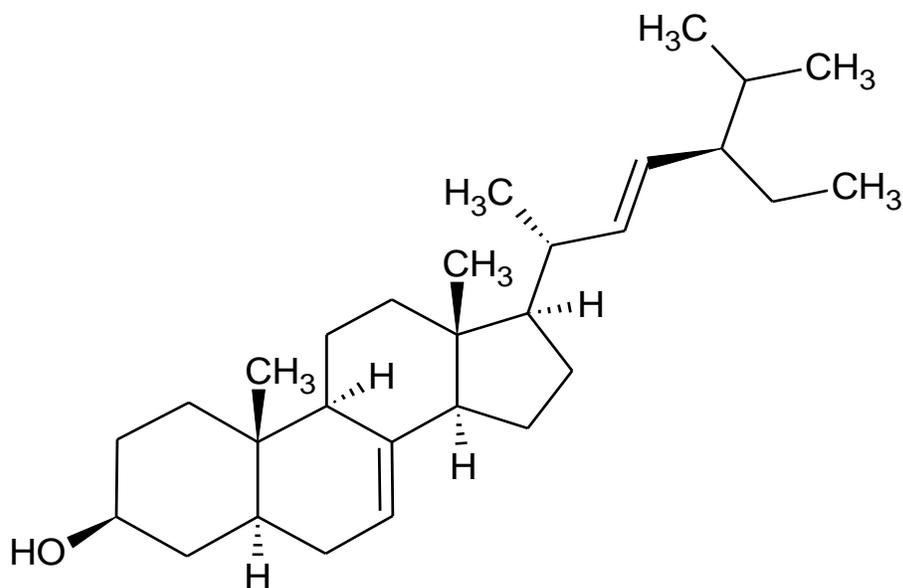
Position	RMN <sup>13</sup> C (δ) ppm	RMN <sup>1</sup> H (δ) ppm	Spinasterol <sup>13</sup> C ( <sup>1</sup> H)
1	37.155	1.01, 1.74	37.1 (1.09, 1.82)
2	31.479	1.36, 1.72	31.5 (1.39, 1.77)
3	71.079	3.52 (1H, m)	71.1 (3.6, 1H, m)
4	37.997	1.18, 1.63	38.0 (1.27, 1.70)
5	40.275	1.33	40.3 (1.4)
6	29.69	1.15, 1.68	1.22, 1.74
7	117.46	5.09 (1H, m)	117.5 (5.18, 1H, m)
8	139.56	---	139.6
9	49.466	0.66	49.5 (1.66)
10	34.23	---	34.24
11	21.555	1.5	21.6 (1.48)
12	39.476	1.18, 1.92	39.6 (1.23, 2.0)
13	43.29	---	43.3
14	55.135	1.74	51.15 (1.81)
15	23.086	1.31, 1.44	23.0 (1.40, 1.52)
16	28.498	1.2, 1.66	28.5 (1.25)
17	55.918	1.18	55.95 (1.25)
18	12.049	0.5	12.05 (0.55)
19	13.037	0.72	13.0 (0.8)
20	40.817	1.97	40.8 (2.05)
21	21.372	1.5	21.4 (1.02)
22	138.158	5.1 (1H, dd)	138.15 (5.17, 1H, dd)
23	129.457	4.983 (1H, dd)	129.48 (5.09, 1H, dd)
24	51.253	1.45	51.26 (1.55)
25	31.874	1.48	31.9 (1.55)
26	21.079	0.75	21.2 (0.85)
27	18.99	0.72, 0.85	19.0 (0.84)
28	25.393	1.09, 1.33	25.4 (1.18, 1.42)
29	12.24	0.75	12.2 (0.81)

**Table IV.**

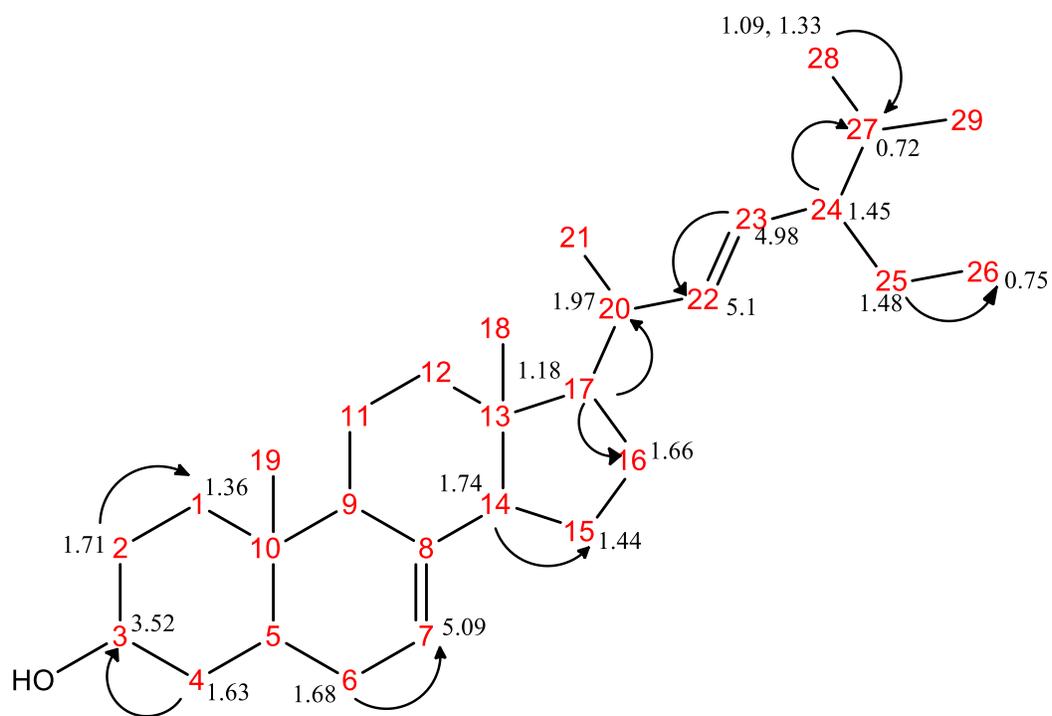
Chemical displacements expressed in (δ) ppm. Varian INOVA. 500 MHz. CDCl<sub>3</sub>. (dd):

Double of double. (m): Multiplete.

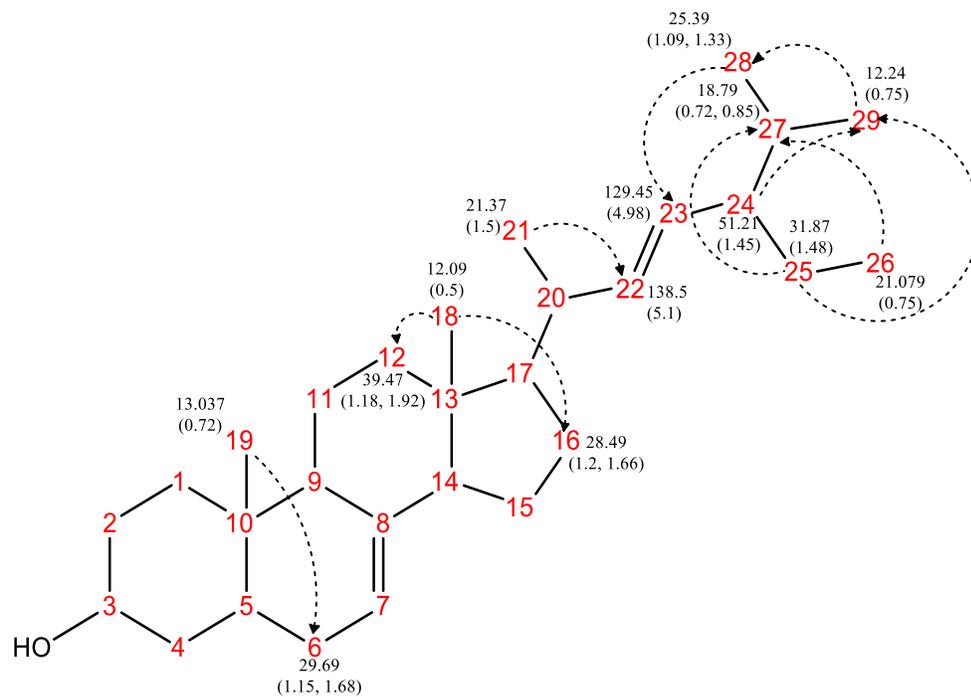
**FIGURES.**



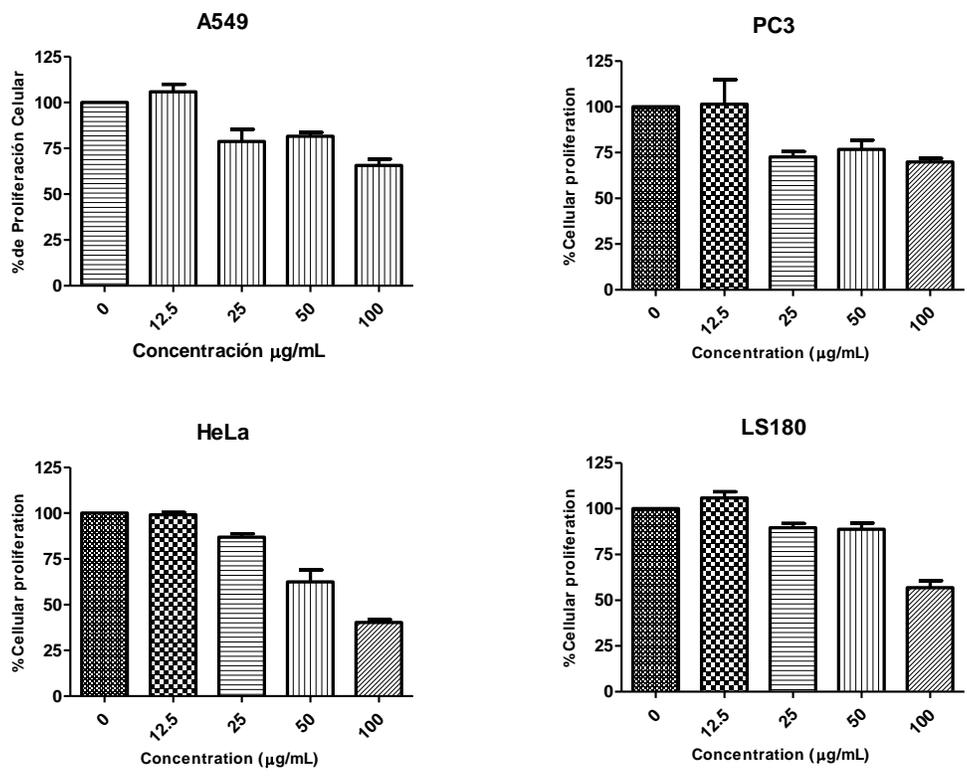
**Figure 1.** Chemical structure of spinasterol.



**Figure 2.** COSY experiment of the compound spinasterol.



**Figure 3.** HMBC experiment of the compound spinasterol.



**Figure 4.** Evaluation of antiproliferative activity of spinasterol.