

# ESTUDIO QUÍMICO DE LA NUEZ DEL MARAÑÓN GIGANTE (*ANACARDIUM GIGANTEUM*)

por

Freddy A. Ramos<sup>1</sup>, Coralia Osorio<sup>\*1</sup>, Carmenza Duque<sup>1</sup>, Claudia Cordero<sup>2</sup>,  
Fabio Aristizábal<sup>2</sup>, Cristina Garzón<sup>3</sup> & Yoshinori Fujimoto<sup>4</sup>

## Resumen

Ramos, F., C. Osorio, C. Duque, C. Cordero, F. Aristizábal, C. Garzón & Y. Fujimoto: Estudio químico de la nuez del marañón gigante (*Anacardium giganteum*) Rev. Acad. Colomb. Cienc. **28** (109): 565-575, 2004. ISSN: 0370-3908.

A partir del extracto metanólico de la nuez de *Anacardium giganteum* se aislaron e identificaron mediante técnicas espectroscópicas (EM, RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C) los siguientes compuestos: 5-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienil]resorcinol **1**, 5-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]resorcinol **2**, 5-[8'(Z)-pentadecenil]resorcinol **3**, ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienil]salicílico **4**, ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]salicílico **5**, ácido 6-[8'(Z)-pentadecenil]salicílico **6**, ácido 6-pentadecilsalicílico **7**, naringenina-7-(6''-O-*p*-cumaroil)-β-D-glucopiranosido **8** y naringenina-7-O-β-D-glucopiranosido **9**. Es importante resaltar que en éste trabajo es la primera vez que se realiza la asignación inequívoca de las señales de RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C del compuesto **8**, mediante el uso de las técnicas bidimensionales HMQC y HMBC. También es la primera vez que se determina la actividad citotóxica de los compuestos **1** - **9** contra las líneas celulares de tumores humanos HEP-2, MCF-7, HT-29 y MKN-45. En dichos ensayos de citotoxicidad, los compuestos **1** - **3** y **8** fueron activos contra las cuatro líneas celulares utilizadas.

**Palabras clave:** Anacardiaceae, *Anacardium giganteum*, lípidos fenólicos, citotoxicidad, marañón gigante.

## Abstract

From the methanolic extract of the *Anacardium giganteum* nut, the following compounds: 5-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienyl]resorcinol **1**, 5-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienyl]resorcinol **2**, 5-

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>4</sup> Department of Materials Science, Tokyo Institute of Technology, O-okayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8551, Japan.

\* A quien debe enviarse la correspondencia. Tel: +57-1-3165000, ext. 14472/14452. Fax: +57-1-3165220. E-mail: cosorior@unal.edu.co

[8'-(Z)-pentadecenyl]resorcinol **3**, 6-[8'-(Z),11'-(Z),14-pentadecatrienyl]salicylic acid **4**, 6-[8'-(Z),11'-(Z)-pentadecadienyl] salicylic acid **5**, 6-[8'-(Z)-pentadecenyl]salicylic acid **6**, 6-pentadecylsalicylic acid **7**, naringenin-7-(6''-O-*p*-cumaroyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside **8** and naringenin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside **9**, were isolated and identified by spectroscopic techniques (MS,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). It is important to note that this is the first time that the unequivocal assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signals of compound **8** is made on the basis on its HMQC and HMBC spectra. This is also the first time that cytotoxic activity of compounds **1** – **9** against human tumor cell lines HEP-2, MCF-7, HT-29 and MKN-45 is evaluated. In these assays, compounds **1** – **3** and **8** were active against the above-mentioned cell lines.

**Key words:** Anacardiaceae, *Anacardium giganteum*, phenolic lipids, citotoxicity, giant marañón.

## Introducción

La selva tropical húmeda de la región amazónica, es una de las áreas de biodiversidad más ricas del mundo, por albergar varios miles de especies de plantas y animales que son utilizados para diferentes fines, entre ellos: alimento, aceite, fibras, combustible, perfumes, medicinas, anti-conceptivos, entre otros. Este gran potencial, lamentablemente se encuentra amenazado por diferentes procesos como la deforestación, la ampliación de la frontera agrícola, la explotación de los recursos mineros y la apertura de vías de comunicación, los cuales están disminuyendo ostensiblemente la biomasa, y lo que es más grave, están acabando con la población aborígen que históricamente ha vivido en esta zona explotando racionalmente de sus recursos (TCA 1994). Uno de los aspectos más significativos del saber ancestral de éstas comunidades, es la utilización de las plantas medicinales; de modo que para los países de la cuenca amazónica, la protección de dicho saber ancestral y la defensa de los recursos genéticos por medio de la creación de una sólida base científico-tecnológica, deben ser aspectos fundamentales a contemplarse en sus políticas nacionales y regionales.

El presente trabajo hace parte de los estudios de las especies frutales de origen amazónico que se están realizando en nuestro grupo de investigación (Bonilla A *et al.* 2004; Nakagawa H *et al.* 2004). Dichos estudios están enfocados a la búsqueda de compuestos con actividad biológica (particularmente actividad citotóxica), con miras a lograr un aprovechamiento integral de estas especies.

*Anacardium giganteum*, es un árbol frutal no domesticado, nativo de zonas tropicales amazónicas que crece entre 0-500 msnm y alcanza en promedio 25 m de altura y 60 cm de diámetro. Comúnmente se conoce con los nombres de marañón gigante, marañón amazónico, sasha casho, cajui y añaná. La nuez es una drupa poco carnosa,

reniforme, de color café que está unida a un pseudofruto carnoso, el cual es de color naranja o naranja-rojizo externamente y amarillo claro en el interior cuando está maduro, y cuyas dimensiones varían entre 7 y 9 cm de largo por 5 a 7 cm de diámetro. El pseudofruto contiene una pulpa succulenta, fibrosa, con abundante jugo agrídulce, de color rosado y de sabor muy agradable. Se consume directamente o se utiliza en la preparación de refrescos y bebidas fermentadas. La nuez contiene una almendra comestible luego de un proceso de tostado; tiene además un alto contenido de un líquido color café, el cual es usado por las comunidades indígenas en el tratamiento de la tos, la eliminación de mezquinos y verrugas, como cicatrizante y como antidiarreico (Arévalo LA *et al.*, 2001; TCA 1997). Es importante mencionar que al momento de iniciar el presente trabajo sólo existía un estudio químico de la especie en el cual se señaló el aislamiento del ácido 6-undecil salicílico a partir del fruto (Sharma NK *et al.*, 1966).

Teniendo en cuenta que el extracto metanólico de la nuez de *Anacardium giganteum* presentó actividad citotóxica contra algunas líneas celulares humanas, se desarrolló el presente trabajo con el fin de aislar e identificar algunos de los compuestos presentes en dicho extracto y determinar cuáles eran los responsables de la actividad citotóxica.

## Materiales y métodos

### General

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  se registraron en los equipos JEOL Lambda-300, JEOL Lambda-400 y JEOL Lambda-500. Para los espectros tomados en  $\text{CDCl}_3$  se usó como referencia la señal del TMS en  $\delta$  0.00 ppm; para los espectros tomados en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , se usó como referencia las señales del solvente en  $\delta_{\text{H}} = 3.3$  ppm y  $\delta_{\text{C}} = 49.0$  ppm. Los espectros de masas en modo IE se lograron en un equipo

de CGAR-EM Shimadzu QP-5050 con detector selectivo de masas en modo *scan* a 70 eV, registrando masas entre  $m/z$  40 y 800 uma. Los espectros de masas en modo IQP se tomaron en el mismo equipo mencionado anteriormente, usando isobutano como gas reactivo, a una presión en la cámara de ionización de  $1 \times 10^{-2}$  Pa, voltaje de ionización de 70 eV y registrando masas entre 70 y 800 uma. Para la separación cromatográfica en CGAR se utilizó una columna HP-1 (25 m x 0.25 mm d.i y espesor de fase de 0.33  $\mu\text{m}$ ) con el siguiente programa de temperatura: 170°C por 10 min, luego se incrementó la temperatura hasta 270°C a 0.5°C/min y finalmente se dejó a 270°C durante 70 min; se utilizó helio como gas transportador a 1 ml/min y una relación de *split* de 1:10. La CLAE analítica se realizó en un equipo MERCK-HITACHI 6000A con detector DAD L-4500. La CLAE preparativa se realizó en un cromatógrafo MERCK-HITACHI 6000 con detector UV-VIS L-4250. La CLAE-EM se realizó con un cromatógrafo Shimadzu 10A acoplado a un detector de masas Shimadzu QP-8000 $\alpha$ , usando la fuente de ionización ESI y detectando los iones positivos con masas entre 50 y 1000 uma. Se usó un flujo de  $\text{N}_2$  de 2.5 l/min para la nebulización, con temperatura del CDL de 250°C, temperatura en la interfase 250°C y voltaje de ionización de 1.5 kV. Para los análisis por CLAE-EM en modo APCI, se usó el mismo equipo con un flujo de  $\text{N}_2$  de 2.5 l/min, temperatura en el CDL de 250°C y en la interfase de 400°C. El voltaje para la ionización fue 1.5 kV y se detectaron iones positivos con masas entre 50 y 1000 uma. La CCD se desarrolló en placas de sílica gel 60  $\text{F}_{254}$  (MERCK) con espesor de 0.25 mm, empleando como revelador *p*-anisaldehído -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calentando a 100°C. Para la cromatografía en columna se utilizó como soporte sólido sílica gel 60 (MERCK, 0.040-0.063 mm). Los solventes usados tanto en CCD como en CC fueron de grado analítico (MERCK), y para los análisis por CLAE y CLAE-EM se usaron solventes grado LiChrosolv (MERCK).

### Material vegetal

Los frutos de *Anacardium giganteum* fueron recolectados en la reserva nacional del parque Araracuara en la Amazonia Colombiana; un espécimen de referencia se depositó en el herbario del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia y fue codificado como COL 479854.

### Aislamiento y purificación de compuestos presentes en la nuez de *Anacardium giganteum*

Las nueces secas de *Anacardium giganteum* (55 g) se cortaron en trozos pequeños y se extrajeron con MeOH (500 ml) a 60°C durante cuatro horas, dos veces. Luego de

eliminar el solvente a presión reducida se obtuvieron 26 g de extracto metanólico crudo, el cual se sometió a partición entre cloroformo y agua, obteniendo dos fases: la clorofórmica (18 g) y la acuosa (8 g). Una parte de la fase clorofórmica (5 g) fue fraccionada por CC en 100g de sílica gel, utilizando como eluente un gradiente discontinuo de hexano-AcOEt (15:1 a 1:10), seguido por un gradiente discontinuo de AcOEt-MeOH (3:1 a 1:3). Se recolectaron 50 fracciones de 5 ml cada una, las cuales se monitorearon por CCD y se reagruparon para su estudio en tres partes: F1 (1-28), F2 (29-39) y F3 (40-50). La fracción F2 (158 mg) fue sometida a CC en 23 g de sílica gel, utilizando como eluente un gradiente discontinuo de benceno-AcOEt (1:0 a 1:1), para recolectar 46 fracciones de 5 ml cada una, las cuales se controlaron por CCD y se reagruparon en cuatro subfracciones: F21 - F24. La subfracción F23 (21-25, 120 mg) se sometió a CLAE-EM en modo ESI, empleando una columna Hypersyl ODS (100 mm x 2.1 mm d.i. x 3  $\mu\text{m}$ ) y como eluente una mezcla de MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (8:2) a un flujo de 0.2 ml/min. Como resultado de este análisis se detectaron tres compuestos, los cuales fueron aislados por CLAE preparativa utilizando una columna Lichrosorb RP-18 (125 mm x 4.6 mm d.i. x 5 $\mu\text{m}$ ) y como eluente una mezcla de MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (8:2) a un flujo de 1.0 ml/min y detector UV a 235 nm. Finalmente se obtuvieron los compuestos puros: **1** (10 mg), **2** (4 mg) y **3** (3 mg), los cuales se analizaron por RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  y CGAR-EM (IE, IQP). La fracción F3 (103 mg) se sometió a CLAE-EM en modo ESI, empleando la misma columna mencionada anteriormente y como eluente una mezcla de MeOH-ácido acético 2% (9:1) a un flujo de 0.2 ml/min. Como resultado de este análisis se detectó la presencia de cuatro compuestos, los cuales fueron aislados por medio de CLAE preparativa utilizando una columna Lichrosorb RP-18 (125 mm x 4.6 mm d.i. x 5 mm), eluyendo con MeOH-ácido acético 2% (9:1) a un flujo de 0.8 ml/min y empleando un detector UV a 280 nm. Los compuestos puros obtenidos: **4** (14 mg), **5** (5 mg), **6** (4 mg) y **7** (1 mg), se analizaron por RMN- $^1\text{H}$  y CGAR-EM (IE, IQP).

Una parte de la fase acuosa (4 g), fue fraccionada por cromatografía instantánea en 75 g de sílica gel, eluyendo con 300 ml de AcOEt, seguido por 300 ml de MeOH para obtener dos fracciones: A1 (0.7 g) y A2 (3 g), respectivamente. El control por CCD de A1 ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 6:1) mostró la presencia de un compuesto con  $R_f$  0.24 que reveló con  $\text{FeCl}_3$  y sulfato sérico amónico. Una parte de esta fracción (550 mg) se sometió a CC en 40 g de sílica gel usando como eluyente un gradiente discontinuo de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:0 a 1:6) para obtener 43 fracciones de 10 ml cada una. Estas fracciones se reagruparon de acuerdo con su comportamiento en CCD en cuatro subfracciones:

A11 - A14. La fracción A14 (38-43, 340 mg) se sometió a CC en 25 g de sílica gel, eluyendo con un gradiente discontinuo de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (15:1 a 1:2), obteniendo 66 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una. Estas fracciones fueron reagrupadas en 8 subfracciones: A141 - A148 de acuerdo con su comportamiento en CCD ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH, 6:1). A partir de la fracción A145 (40) se obtuvo el compuesto **8** (14 mg). Esta fracción se analizó en primera instancia por CLAE y CLAE-EM en modo APCI, empleando la columna Hypersyl ODS mencionada anteriormente y eluyendo con una mezcla de MeCN- $\text{H}_2\text{O}$  (3:7) a un flujo de 0.2 ml/min. Posteriormente, el compuesto **8** se sometió a análisis por EM(IE), RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$ , mono y bidimensional. La fracción A2 (3 g) se sometió a CC en 180 g de sílica gel, usando como eluyente un gradiente discontinuo de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (10:1- 0:1), obteniendo 160 fracciones de aproximadamente 20 ml cada una, las cuales se reagruparon en 4 subfracciones: A21 - A24. La fracción A23 (49-136, 2g) se sometió a sucesivas CC en sílica gel usando primero como eluyente un gradiente discontinuo de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (20:1 a 1:3) y luego una mezcla isocrática de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (8:1) para obtener la fracción denominada A2333 (64 mg). Esta fracción fue sometida a CLAE preparativa usando una columna Shizeido RP-18 (250 mm x 4.6 mm d.i. x 5  $\mu\text{m}$ ) y empleando el gradiente continuo de MeCN-AcOH 1% que se describe a continuación: de 0 a 8 min. 90% AcOH, de 8 a 18 min. gradiente lineal hasta 60% AcOH, de 18 a 25 min. 60% AcOH y de 25 a 30 min. un gradiente lineal hasta 90% AcOH a 1.0 ml/min. Finalmente se obtuvieron 2 mg del compuesto puro **9**, el cual se sometió a los análisis por CLAE-EM y RMN- $^1\text{H}$  con el fin de elucidar su estructura.

### Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de actividad citotóxica del extracto crudo, de algunas fracciones y de los compuestos puros, se realizaron sobre las líneas de células tumorales HEp-2 (células de laringe contaminadas con HeLa), MCF-7 (cáncer de mama), HT-29 (carcinoma de colon) y MKN-45 (carcinoma gástrico). Los ensayos se desarrollaron por duplicado utilizando el método del MTT el cual se describe brevemente a continuación (Cordero CP, 2002): a partir de los cultivos en etapa de crecimiento exponencial, mantenidos a 37°C, 100% de humedad relativa, en medio mínimo esencial con 5% de suero fetal bovino y 50 mg/ml de gentamicina, se obtiene por tripsinización, una suspensión de células tumorales que se inocula en una placa de 96 pozos y éstas se preincuban a 37°C por 24 horas; luego del período de preincubación se adiciona el extracto o el compuesto a evaluar en diferentes concentraciones y se incuba de nuevo por 48 horas. Al finalizar la

incubación se adicionan 200  $\mu\text{L}$  de MTT (0.25 mg/ml en medio de cultivo) y las células se incuban por 4 horas más a 37°C. Luego de eliminar el sobrenadante, el colorante Formazán que se haya obtenido se disuelve en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO con agitación. El coeficiente de extinción dependiente de la concentración del colorante en cada pozo se mide en un espectrofotómetro para placas a 570 nm. Como control positivo se emplea Doxorubicina HCl, un antineoplásico de uso común en clínica, que presenta actividad citotóxica frente a las cuatro líneas de células tumorales ensayadas. Los cálculos de la  $\text{CL}_{50}$  se realizan empleando una regresión con el modelo de Probits.

### Datos espectroscópicos

#### 5-[8'(Z), 11'(Z), 14-Pentadecatrienil] resorcinol (1):

EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 314 ( $\text{M}^+$ , 4), 299 (2), 271 (1), 243 (2), 217 (3), 191 (4), 177 (5), 163 (24), 149 (20), 137 (19), 124 (100), 123 (62), 107 (15), 93 (23), 91 (20), 81 (21), 79 (48), 69 (10), 67 (45), 57 (2), 55 (28), 43 (5), 41 (42); EM (IQ) m/z (int. rel) 315 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 315 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100); RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.29 (8H, m,  $\text{H}_2$ -3'- $\text{H}_2$ -6'), 1.55 (2H, m,  $\text{H}_2$ -2'), 2.04 (2H, q,  $J=6.8$  Hz,  $\text{H}_2$ -7'), 2.46 (2H, t,  $J=7.8$  Hz,  $\text{H}_2$ -1'), 2.79 (2H, t,  $J=5.7$  Hz,  $\text{H}_2$ -10'), 2.81 (2H, t,  $J=6.1$  Hz,  $\text{H}_2$ -13'), 4.99 (1H, dq,  $J=10.3$ , 2.0 Hz, H-15'b), 5.05 (1H, dq,  $J=17.3$ , 2.0 Hz, H-15'a), 5.35-5.43 (4H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 5.82 (1H, tdd,  $J=17.3$ , 10.3, 6.1 Hz, H-14'), 6.17 (1H, t,  $J=2.2$  Hz, H-2), 6.25 (2H, d,  $J=2.2$  Hz, H-4, H-6); RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  25.6 (C-10'), 27.2 (C-7'), 29.2, 29.4, 29.6, 29.6 (C-3', C-4', C-5', C-6'), 31.0 (C-2'), 31.5 (C-13'), 35.8 (C-1'), 100.2 (C-2), 108.1 (C-4, C-6), 114.7 (C-15'), 126.8 (C-9'), 127.6 (C-11'), 129.3 (C-12'), 130.4 (C-8'), 136.8 (C-14'), 146.1 (C-5), 156.4 (C-1, C-3). La asignación de las señales de RMN- $^{13}\text{C}$  está en concordancia con los datos publicados por Sargent M *et al.*, 1990.

#### 5-[8'(Z),11'(Z)-Pentadecadienil]resorcinol (2):

EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 316 ( $\text{M}^+$ , 4), 299 (1), 274 (1), 245 (1), 217 (5), 203 (2), 191 (3), 177 (3), 163 (15), 149 (10), 137 (19), 124 (100), 123 (40), 109 (5), 95 (13), 81 (24), 69 (5), 67 (39), 57 (2), 55 (26), 43 (2), 41 (35); EM (IQ) m/z (int. rel) 317 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 317 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100); RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.91 (3H, t,  $J=7.5$  Hz,  $\text{H}_3$ -15'), 1.38 (2H, sextete,  $J=7.5$  Hz,  $\text{H}_2$ -14'), 1.31-1.41 (8H, m,  $\text{H}_2$ -3'- $\text{H}_2$ -6'), 1.57 (2H, m,  $\text{H}_2$ -2'), 2.04 (4H, q,  $J=6.3$  Hz,  $\text{H}_2$ -7',  $\text{H}_2$ -13'), 2.48 (2H, t,  $J=7.6$  Hz,  $\text{H}_2$ -1'), 2.78 (2H, t,  $J=6.3$  Hz,  $\text{H}_2$ -10'), 5.34-5.38 (4H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 6.17 (1H, br s, H-2), 6.24 (2H, d,  $J=1.9$  Hz, H-4, H-6); RMN- $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.8 (C-15'), 22.8 (C-14'), 25.7 (C-10'), 27.2 (C-7'), 29.2, 29.3, 29.4, 29.6 (C-3', C-4',

C-5', C-6'), 31.0 (C-2'), 31.6 (C-13'), 35.8 (C-1'), 100.1 (C-2), 108.0 (C-4, C-6), 128.0 (C-9', C-11'), 130.1 (C-8', C-12'), 146.1 (C-5), 156.6 (C-1, C-3). La asignación de las señales de RMN-<sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C está en concordancia con los datos publicados por **Sargent M et al.**, 1989.

**5-[8'(Z)-Pentadecenil]resorcinol (3):** EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 318 (M<sup>+</sup>, 3), 297 (1), 275 (2), 250 (1), 236 (1), 222 (5), 205 (3), 191 (4), 165 (6), 163 (8), 149 (6), 137 (15), 124 (100), 123 (45), 111 (3), 107 (2), 95 (3), 81 (3), 69 (10), 67 (8), 57 (2), 55 (40), 43 (36), 41 (38); EM (IQ) m/z (int. rel) 319 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 319 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (3H, t, J=6.9 Hz, H<sub>3</sub>-15'), 1.30 (16H, m, H<sub>2</sub>-3'-H<sub>2</sub>-6', H<sub>2</sub>-11'-H<sub>2</sub>-14'), 1.58 (2H, m, H<sub>2</sub>-2'), 2.01 (4H, q, J=6.1 Hz, H<sub>2</sub>-7', H<sub>2</sub>-10'), 2.48 (2H, t, J=7.8 Hz, H<sub>2</sub>-1'), 5.35 (2H, t, J=5.6 Hz, H-8', H-9'), 6.17 (1H, br s, H-2), 6.24 (2H, br s, H-4, H-6); RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 14.1 (C-15'), 22.7 (C-14'), 27.2 (C-7', C-10'), 29.0, 29.2, 29.4, 29.8, 29.8, 29.8, 31.8 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-11', C-12', C-13'), 31.0 (C-2'), 35.8 (C-1'), 100.1 (C-2), 108.0 (C-4, C-6), 129.8, 130.0 (C-8', C-9'), 146.1 (C-5), 156.6 (C-1, C-3). La asignación de las señales de RMN-<sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C está en concordancia con los datos publicados por **Lytollis WJ et al.**, 1995 e **Itokawa H et al.**, 1987.

**Acido 6-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienil]salicílico (4):** EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 298 ([M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 4), 281 (1), 269 (2), 251 (1), 230 (1), 207 (8), 187 (2), 175 (2), 160 (2), 147 (25), 133 (20), 121 (20), 120 (24), 108 (75), 107 (100), 95 (23), 94 (22), 93 (30), 91 (24), 80 (27), 79 (55), 77 (28), 69 (5), 67 (48), 57 (8), 55 (25), 43 (48), 41 (40); EM (IQ) m/z (int. rel) 341 ([M-H]<sup>+</sup>, 20), 299 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 343 ([M+H]<sup>+</sup>, 100), 325 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 95), 299 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 25); RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.32 (8H, m, H<sub>2</sub>-3'-H<sub>2</sub>-6'), 1.58 (2H, q, J=7.6 Hz, H<sub>2</sub>-2'), 2.04 (2H, q, J=6.7 Hz, H<sub>2</sub>-7'), 2.79 (2H, t, J=5.6 Hz, H<sub>2</sub>-10'), 2.82 (2H, t, J=6.4 Hz, H<sub>2</sub>-13'), 2.97 (2H, t, J=7.9 Hz, H<sub>2</sub>-1'), 4.98 (1H, dq, J=10.2, 1.9 Hz, H-15'b), 5.05 (1H, dq, J=17.3, 1.9 Hz, H-15'a), 5.34-5.43 (4H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 5.82 (1H, tdd, J=17.3, 10.2, 6.3 Hz, H-14'), 6.77 (1H, dd, J=7.6, 1.0 Hz, H-5), 6.87 (1H, dd, J=8.3, 1.0 Hz, H-3), 7.36 (1H, dd, J=8.3, 7.6 Hz, H-4), 11.07 (1H, br s, COOH). La asignación de las señales está concordancia con los datos publicados por **Satoh M et al.**, 2001.

**Acido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]salicílico (5):** EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 343 (M<sup>+</sup>, 1), 326 (1), 300 ([M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 8), 281 (6), 271 (1), 257 (1), 230 (1), 219 (1), 201 (3), 187 (2), 175 (5), 161 (8), 147 (30), 133 (20), 121 (18), 120 (48), 108 (100), 107 (92), 95 (25), 91 (15), 81 (45), 79 (26), 77 (27), 69 (7), 67 (75), 57 (1), 55 (40), 43 (5), 41

(46); EM (IQ) m/z (int. rel) 343 ([M-H]<sup>+</sup>, 20), 301 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 345 ([M+H]<sup>+</sup>, 30), 327 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100), 309 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 25), 301 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 10); RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.90 (3H, t, J=7.4 Hz, H<sub>3</sub>-15'), 1.34-1.41 (10H, m, H<sub>2</sub>-3'-H<sub>2</sub>-6', H<sub>2</sub>-14'), 1.60 (2H, m, H<sub>2</sub>-2'), 2.04 (4H, q, J=6.6 Hz, H<sub>2</sub>-7', H<sub>2</sub>-13'), 2.77 (2H, t, J=5.6 Hz, H<sub>2</sub>-10'), 2.98 (2H, t, J=7.8 Hz, H<sub>2</sub>-1'), 5.29-5.44 (4H, m, H-8', H-9', H-11', H-12'), 6.78 (1H, d, J=7.3 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, J=8.3 Hz, H-3), 7.37 (1H, dd, J=8.3, 7.3 Hz, H-4), 10.80 (1H, br s, COOH). La asignación de las señales está concordancia con los datos publicados por **Satoh M et al.**, 2001.

**Acido 6-[8'(Z)-pentadecenil]salicílico (6):** EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 302 ([M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 8), 284 (1), 267 (1), 249 (1), 234 (1), 219 (1), 206 (6), 189 (2), 175 (2), 161 (3), 147 (8), 133 (10), 121 (11), 120 (25), 108 (100), 107 (45), 95 (2), 91 (5), 81 (4), 79 (4), 77 (5), 69 (5), 67 (4), 57 (1), 55 (25), 41 (20); EM (IQ) m/z (int. rel) 345 ([M-H]<sup>+</sup>, 30), 303 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 347 ([M+H]<sup>+</sup>, 40), 329 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 100), 311 ([M-2H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 20); RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.87 (3H, t, J=6.6 Hz, H<sub>3</sub>-15'), 1.27-1.32 (16H, m, H<sub>2</sub>-3'-H<sub>2</sub>-6', H<sub>2</sub>-11'-H<sub>2</sub>-14'), 1.61 (2H, m, H<sub>2</sub>-2'), 2.01 (4H, m, H<sub>2</sub>-7', H<sub>2</sub>-10'), 2.98 (2H, t, J=7.7 Hz, H<sub>2</sub>-1'), 5.35 (2H, t, J=4.6 Hz, H-8', H-9'), 6.78 (1H, d, J=7.3 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, J=8.1 Hz, H-3), 7.37 (1H, dd, J=8.1, 7.3 Hz, H-4), 10.80 (1H, br s, COOH). La asignación de las señales está concordancia con los datos publicados por **Itokawa H et al.**, 1987.

**Acido 6-pentadecilsalicílico (7):** EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 304 ([M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 8), 279 (1), 261 (1), 240 (1), 208 (8), 207 (10), 193 (2), 167 (10), 162 (2), 149 (35), 133 (8), 121 (8), 120 (6), 108 (100), 107 (45), 95 (8), 91 (5), 77 (15), 71 (14), 69 (14), 57 (25), 55 (20), 44 (35), 43 (50), 41 (30); EM (IQ) m/z (int. rel) 347 ([M-H]<sup>+</sup>, 15), 305 ([M-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>, 100); EM (ESI) m/z (int. rel) 349 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.88 (3H, t, J=7.1 Hz, H<sub>3</sub>-15'), 1.25 (24H, m, H<sub>2</sub>-3'-H<sub>2</sub>-14'), 1.57 (2H, m, H<sub>2</sub>-2'), 2.95 (2H, br t, J=7.5 Hz, H<sub>2</sub>-1'), 6.75 (1H, d, J=6.8 Hz, H-5), 6.85 (1H, d, J=8.0 Hz, H-3), 7.33 (1H, dd, J=8.0, 6.8 Hz, H-4). La asignación de las señales está concordancia con los datos publicados por **Yamagiwa Y et al.**, 1987.

**Naringenina-7-(6''-O-p-cumaroil)-b-D-glucopiranosido (8):** UV (MeOH) λ<sub>max</sub> 227.6, 286.4, 314.1; EM (IE, 70 eV) m/z (int. rel) 272 (60), 271 (58), 255 (10), 244 (2), 229 (1), 215 (1), 201 (2), 179 (25), 166 (40), 153 (100), 147 (25), 124 (20), 120 (75), 119 (23), 107 (30), 91 (43), 69 (33), 65 (28), 51 (15); EM (APCI) m/z (int. rel) 581 ([M+H]<sup>+</sup>, 20), 563 ([M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, 10), 309 ([M-272+H]<sup>+</sup>, 38), 273 (100), 272 (41); RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C ver Tabla 1.

**Tabla 1.** Datos de RMN <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C del compuesto **8** (CD<sub>3</sub>OD, 500 y 125 MHz).

Posición	δ <sub>c</sub> <sup>a</sup>	δ <sub>H</sub> <sup>b</sup>
2	80.4	5.25, dd (12.7, 3.0)
3a	44.1	3.07, dd (17.2, 12.7)
3b	-	2.68, dd (17.2, 3.1)
4	198.4	-
5	164.4	-
6	97.1	6.16, d (2.2)
7	166.8	-
8	97.9	6.21, d (2.2)
9	165.0	-
10	105.0	-
1'	130.9	-
2'	129.0	7.24, d (8.5)
3'	116.4	6.78, d (8.7)
4'	159.0	-
5'	116.4	6.78, d (8.7)
6'	129.0	7.24, d (8.5)
1''	101.1	4.98, d (7.5)
2''	74.6	3.45-3.51 m
3''	77.8	3.49, t (9.0)
4''	71.8	3.39, dd (9.6, 9.0)
5''	75.6	3.75, ddd (9.6, 7.3, 2.2)
6''a	64.7	4.54, dd (11.9, 2.2)
6''b	-	4.28, dd (11.9, 7.3)
1'''	127.2	-
2'''	131.2	7.37, d (8.7)
3'''	116.8	6.77, d (8.7)
4'''	161.2	-
5'''	116.8	6.77, d (8.7)
6'''	131.2	7.37, d (8.7)
7'''	146.9	7.57, d (16.0)
8'''	114.9	6.31, d (15.9)
9'''	169.1	-

<sup>a</sup>Asignaciones realizadas con base en los espectros HMQC y HMBC; <sup>b</sup> δ en ppm, J en Hz.

**Naringenina-7-O-β-D-glucopiranosido (9):** UV (MeOH) λ<sub>max</sub> 227.6, 285.6, 328.7; EM (APCI) m/z (int. rel) 435 ([M+H]<sup>+</sup>, 10), 274 (70), 273 ([M-hexosa+H]<sup>+</sup>, 100); RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 2.75 (1H, dd, J=17.0, 3.0 Hz, H-3b), 3.16 (1H, dd, J=17.0, 12.0 Hz, H-3a), 3.39-3.47 (4H, m, H-2''-H-5''), 3.68 (1H, dd, J=12.0, 5.5 Hz, H-6''b), 3.87 (1H, dd, J=12.0, 2.0 Hz, H-6''a), 4.96 (1H, d, J=7.0 Hz, H-1''), 5.38 (1H, dd, J=12.5, 3.0 Hz, H-2), 6.18 (1H, d, J=2.5 Hz, H-6), 6.21 (1H, d, J=2.5 Hz, H-8), 6.81 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.31 (2H, d, J=9.0 Hz, H-2', H-6'). La posición del azúcar se asignó por comparación con los datos de la literatura (Sang S *et al.*, 2002).

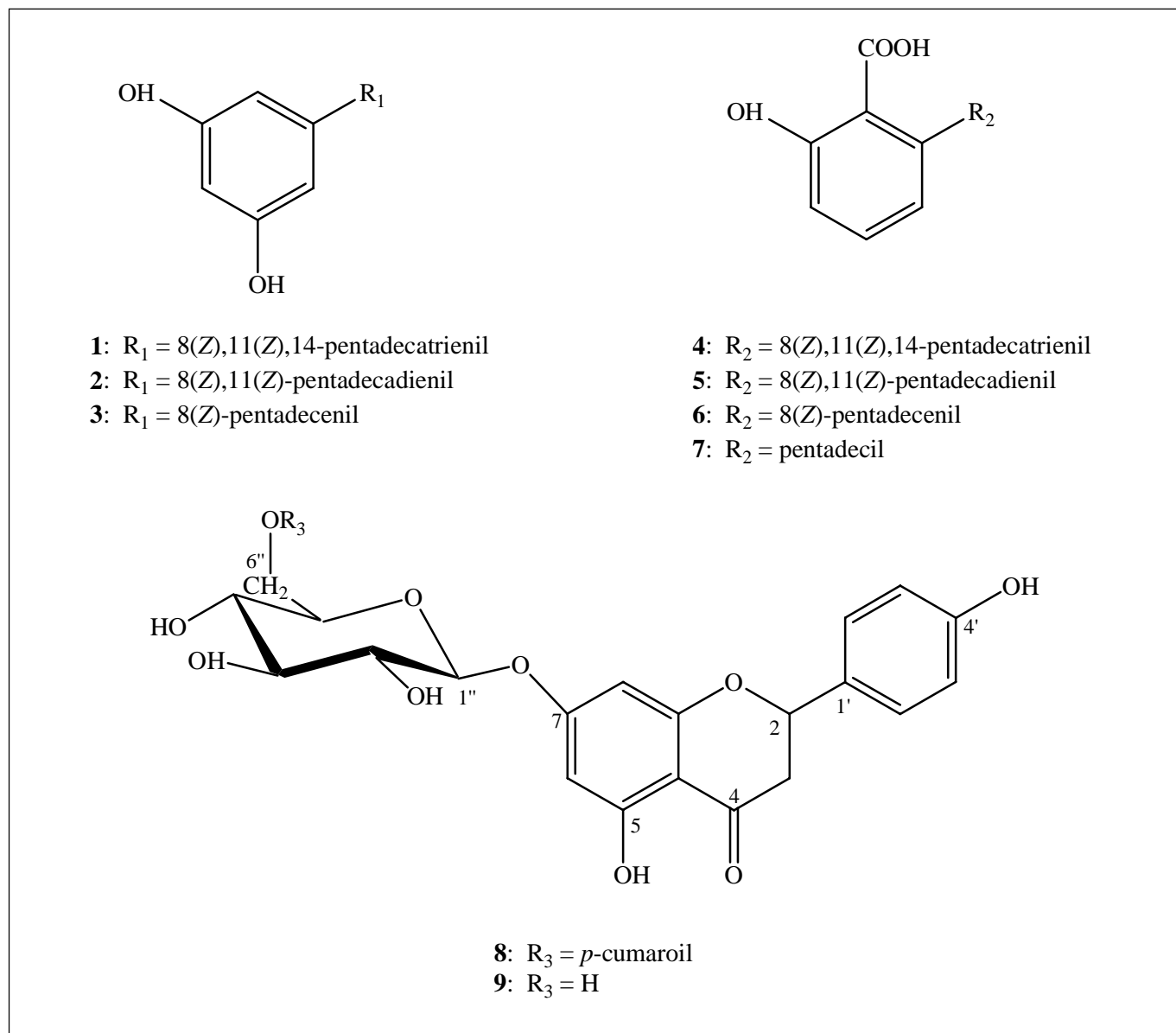
## Resultados y discusión

### Aislamiento y purificación de los compuestos 1-9

El extracto metanólico de la nuez de *A. giganteum* fue sometido a partición entre cloroformo y agua, y la fase

clorofórmica se sometió a CC en silica gel (eluente hexano – AcOEt, 15:1 a 1:10) para obtener tres subfracciones (F1 – F3). Teniendo en cuenta que el extracto metanólico y la fase clorofórmica, así como las fracciones F2 y F3 presentaron actividad citotóxica contra líneas celulares de tumores humanos, éstas se seleccionaron para realizar un fraccionamiento posterior que condujo a la purificación de los compuestos **1** – **7**, siguiendo la metodología descrita en la sección Materiales y Métodos. Las estructuras de todos los compuestos aislados de la nuez de *A. giganteum* se presentan en la Figura 1.

Así, la fracción F2 se sometió a CC en sílica gel (eluente benceno – AcOEt, 1:0 a 1:1) para obtener la fracción F23, la cual al ser analizada por CCD mostró una banda con Rf = 0.75 (benceno – AcOEt, 2:1). Su análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) y por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CGAR-EM) en modo ionización química, indicó que se trataba de una mezcla de los compuestos **1-3**, con pesos moleculares de 314, 316 y 318 uma, respectivamente. Posteriormente, el análisis de la fracción F23 por CGAR-EM en modo impacto electrónico sugirió que los compuestos **1** a **3** eran alquilresorcinoles con una cadena alifática insaturada, por la presencia del pico base en m/z 124, correspondiente a la fragmentación bencílica de este tipo de compuestos (Bouillant ML *et al.*, 1994); por la presencia de los iones en m/z 67 y 95, característicos de fenoles; y por las series de iones C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub><sup>+</sup>, C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub><sup>+</sup> y C<sub>n</sub>H<sub>2n-3</sub><sup>+</sup>, correspondiente a la cadena alifática insaturada. La CLAE preparativa permitió aislar estos tres compuestos en forma pura y su análisis por RMN-<sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C permitió identificar al compuesto **1** como el 5-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienil]resorcinol, aislado previamente a partir de *Anacardium occidentale* (Tyman JHP, 1979); al compuesto **2** como el 5-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]resorcinol, identificado previamente en *Anacardium occidentale* (Tyman JHP, 1979) y al **3** como el 5-[8'(Z)-pentadecenil]resorcinol, el cual ha sido registrado previamente como constituyente de *Anacardium occidentale* (Tyman JHP, 1979), *Knema elegans* (Spencer G *et al.*, 1980), *Oryza sativa* (Bouillant ML *et al.*, 1994), *Lysimachia japonica* (Arisawa M *et al.*, 1989) *Ginkgo biloba* (Itokawa H *et al.*, 1987) y *Hakea trifurcata* (Lytollis WJ *et al.*, 1995). La ubicación del doble enlace entre los carbonos 8' y 9' se confirmó por el ión en m/z 191 (presente en los espectros de masas obtenidos por IE y por IQP) correspondiente al rompimiento alílico de la cadena alifática en el enlace 6'-7', con eliminación 1-4 de Hidrógeno (Suzuki Y *et al.*, 1997). La geometría de los dobles enlaces en las posiciones 8' y 11' se estableció como Z, por comparación del desplazamiento



**Figura 1.** Compuestos identificados (**1-9**) en el extracto metanólico de la nuez de *Anacardium giganteum*.

químico en RMN- $^{13}C$  de los metilenos adyacentes a dichos dobles enlaces con los publicados en la literatura:  $d_c$  adyacente a doble enlace  $Z=27.1$ ,  $E=32.5$  (Lie Ken Jie M *et al.*, 1997).

En forma análoga a la descrita anteriormente, al analizar la fracción F3 (Rf 0.33, CCD, benceno-AcOEt, 2:1) por CLAE-EM en modo ESI positivo se detectó la presencia de cuatro compuestos **4-7** con iones pseudomoleculares  $[M+H]^+$  en  $m/z$  343, 345, 347 y 349, respectivamente. Otros iones intensos que se observaron en dichos espec-

tros y en los de IQP y ESI correspondientes a  $[M-H]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$  y  $[M-CO_2+H]^+$ , evidenciaron la presencia de un grupo COOH en éstos compuestos. Adicionalmente, el perfil de fragmentación de los espectros de masas en modo IE, con un pico intenso en  $m/z$  108 correspondiente a la fragmentación bencílica de un alquilfenol y las series de iones  $C_nH_{2n+1}^+$ ,  $C_nH_{2n-1}^+$  y  $C_nH_{2n-3}^+$ , característicos de una cadena alifática insaturada permitieron concluir que los compuestos **4-6** eran ácidos 6-pentadecilsalicílicos con tres, dos y una insaturación, respectivamente. En el caso del compuesto **7**, el análisis del espectro de masas en modo

IE solo indicó que se trataba de un ácido 6-alkilsalicílico con cadena alifática saturada. Posteriormente, éstos compuestos se aislaron mediante CLAE preparativa y su estructura fue confirmada por RMN-<sup>1</sup>H como: ácido 6-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienil]salicílico **4**, ácido 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienil]salicílico **5**, ácido 6-[8'(Z)-pentadecenil]salicílico **6** y ácido 6-pentadecilsalicílico **7**, respectivamente. Estos compuestos han sido señalados previamente como constituyentes de *Anacardium occidentale* (Tyman JHP, 1979), *Anacardium spondias* (Wang D *et al.* 1998), *Knema elegans* (Spencer G *et al.* 1980), *Knema laurina* (González MJTG *et al.*, 1996) y *Ginkgo biloba* (Itokawa H *et al.*, 1987). La posición de los dobles enlaces entre los carbonos 8' y 9' se confirmó adicionalmente por los iones en m/z 219 y 175 [219-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> en los espectros de masas en modo IE y en modo IQP, correspondientes al rompimiento alílico al doble enlace con eliminación 1-4 de Hidrógeno, y con descarboxilación adicional.

Es importante mencionar que en el presente trabajo no se detectó el ácido 6-undecilsalicílico, compuesto que fue registrado previamente por Sharma NK *et al.*, (1966) como constituyente del fruto de *Anacardium giganteum*, identificándolo sólo por reacciones de degradación, sin utilizar ninguna técnica espectroscópica.

La fase acuosa obtenida después de la partición entre CHCl<sub>3</sub> y agua del extracto metanólico de la nuez de *A. giganteum* no presentó actividad citotóxica relevante; sin embargo, a partir de esta fase se aislaron los compuestos **8** y **9**, de los cuales el primero presentó actividad citotóxica leve contra las líneas celulares utilizadas.

El espectro de masas en modo APCI del compuesto **8** mostró un ión pseudomolecular [M+H]<sup>+</sup> en m/z 581, indicando un peso molecular de 580 uma para este compuesto. Los iones en m/z 273 y 309 [M-272+H]<sup>+</sup> presentes en el espectro de masas en modo IE sugirieron la presencia de una flavanona; la cual fue confirmada por los iones intensos en m/z 153 y 120, característicos de la ruptura Retro-Diels Alder del anillo C de una flavanona trisustituida (Markham KR 1982; Justesen U *et al.*, 1998). Los datos del espectro UV del compuesto **8**, fueron concordantes con la presencia de la flavanona debido a las bandas de absorción I y II en 286.4 y 314.1 nm (Markham KR, 1982).

El análisis detallado del espectro de RMN-<sup>1</sup>H junto con el espectro COSY H-H del compuesto **8** permitieron identificar las siguientes subestructuras: dos anillos aromáticos sustituidos asimétricamente en posición *para*, por la presencia de la señal en δ 7.37 (2H, d, J = 8.7 Hz), que correlaciona con

la señal en δ 6.77 (2H, d, J = 8.7 Hz), y la señal en δ 7.24 (2H, d, J = 8.5 Hz) que correlaciona con la señal en δ 6.78 (2H, d, J = 8.7 Hz); un tercer anillo aromático tetrasustituido, por la correlación de los dobletes en δ 6.21 y 6.16, con una constante de acoplamiento característica de protones en posición *meta* (J = 2.2 Hz); un sistema olefínico con geometría *trans* (J = 16 Hz), por la correlación de los dobletes en δ 7.57 y 6.31, cuyo desplazamiento químico a campo bajo, sugiere que está conjugado con un carbonilo; y un grupo O-CH-CH<sub>2</sub> por el patrón de acoplamiento entre la señal del oximetino en δ 5.25 (1H, dd, J = 12.7 y 3.0 Hz) y los protones diastereotópicos de un metileno en d 3.07 (1H, dd, J = 17.2 y 12.7 Hz) y δ 2.68 (1H, dd, J = 17.2 y 3.1 Hz). Las señales restantes del espectro de RMN-<sup>1</sup>H que aparecen entre 3.39 y 4.98 ppm, corresponden a 5 oximetinos característicos de una unidad de glucosa sustituida en el C-6 por un grupo desprotector (Yokosuka A *et al.*, 2002), cuya identidad fue confirmada adicionalmente por la comparación de los datos del espectro de RMN <sup>13</sup>C con los de la literatura (Breitmaier E *et al.*, 1989). La constante de acoplamiento del protón anomérico en d 4.98 (J = 7.5 Hz) indicó la presencia de un enlace β-D-glucosídico en este compuesto.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observaron las siguientes señales: dos señales en δ 198.4 y δ 169.0 que corresponden a dos carbonos carbonílicos; cinco señales entre δ 166.8 y δ 159.0 asignables a carbonos de anillos aromáticos oxigenados sin hidrógeno; ocho señales entre δ 131.2 y δ 127.2 correspondientes a carbonos aromáticos con un hidrógeno; una señal en δ 101.1 junto con cinco señales entre δ 77.8 y δ 64.6 que corresponden a la subunidad de β-D-glucosa; dos señales en δ 146.8 y δ 114.9 correspondientes a los dos carbonos sp<sup>2</sup> del sistema olefínico; y dos señales restantes en δ 80.2 y 44.1 que se asignaron al grupo O-CH-CH<sub>2</sub>.

El análisis de las correlaciones presentes en los espectros de HMQC y HMBC (Figura 2) permitió confirmar la presencia de la flavanona naringenina, sustituida en el carbono 7 por una unidad de β-D-glucosa (correlación entre el carbono cuaternario en δ<sub>c</sub> 166.8 y el protón anomérico de la glucosa en d<sub>H</sub> 4.98). Adicionalmente, se determinó la presencia de una subunidad *p*-cumaroil unida al carbono 6'' de la glucosa (correlación del carbono carbonílico en δ<sub>c</sub> 169.1 con los protones olefínicos en δ<sub>H</sub> 7.57 y 6.31 y los protones del C-6'' de la glucosa en δ<sub>H</sub> 4.54 y 4.28).

Con base en el análisis anterior, se dedujo que la estructura del compuesto **8** era la 5,7,4'-trihidroflavanona-7-(6''-O-4-hidroxycinamoil)-O-β-D-glucopiranosido, comúnmente conocida como naringenina-7-(6''-O-*p*-



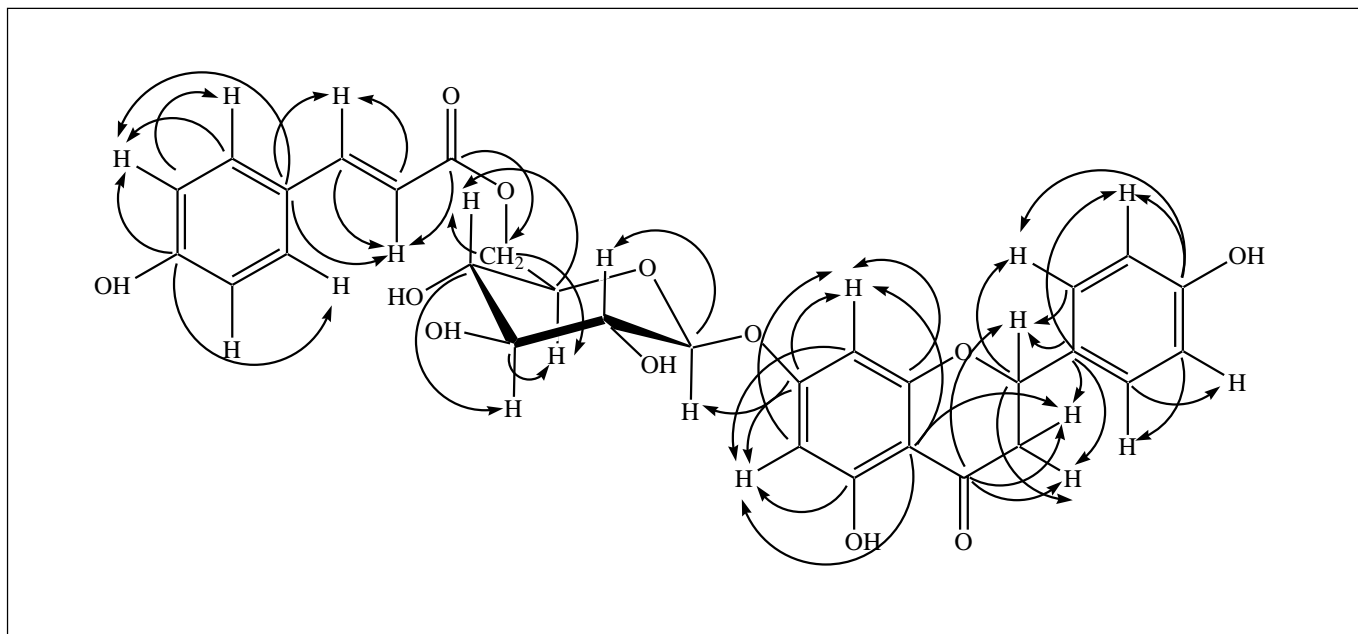


Figura 2. Correlaciones presentes en el espectro HMBC del compuesto 8.

cumaroil)- $\beta$ -D- glucopiranosido. Este compuesto ha sido previamente aislado a partir de *Anacardium occidentale* (Rahman W *et al.*, 1978), *Anisomeles ovata* (Rao L *et al.*, 1985), *Phlomis aurea* (El-Negoumy SI *et al.*, 1986) y *Mabea fistulifera* subsp. robusta (Garcés W *et al.*, 1997); sin embargo, en este trabajo es la primera vez que se realiza la asignación completa de todas las señales de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de este compuesto (Tabla 1) mediante el uso de las técnicas bidimensionales HMQC y HMBC.

El análisis espectroscópico del compuesto 9 indicó que su estructura era similar a la del compuesto 8, con excepción de la desaparición de las señales correspondientes a la subunidad *p*-cumaroil. De esta forma se propuso que el compuesto 9 era la 5,7,4'-trihidroxi-flavanona-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido, conocido como naringenina-7-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosido o prunina, el cual ha sido aislado de diversas fuentes naturales.

### Ensayos de citotoxicidad

El extracto crudo de la nuez de *A. giganteum*, así como las diferentes fracciones se sometieron a ensayos de citotoxicidad contra las células tumorales humanas HEp-2, MCF-7, HT-29 y MKN-45, encontrando una actividad leve para el extracto crudo y la fase clorofórmica. La fase acuosa solo presentó actividad leve frente a la línea celular MCF-7. Posteriormente, los compuestos puros 1 – 9 se so-

metieron a los mismos bioensayos encontrando que los 5-alkilresorcinoles 1-3 exhibían una actividad moderada y que el compuesto 8 tenía una actividad leve, contra las líneas tumorales ensayadas; siendo los compuestos 1 y 2 los que presentaron mayor actividad. Los compuestos 4 – 7 y el 9, no fueron activos frente a estas líneas celulares. Los resultados de éstos ensayos se resumen en la Tabla 2.

Vale la pena resaltar que todos los compuestos fueron en general menos activos frente a la línea celular HT-29, mostrando un indicio de selectividad frente a las otras tres líneas celulares (HEp-2, MCF-7 y MKN-45). Esta es la primera vez que se determina la actividad citotóxica de los compuestos 1 – 9 contra las líneas celulares HEp-2, MCF-7, HT-29 y MKN-45.

Aunque la citotoxicidad de los compuestos obtenidos a partir de la nuez de *Anacardium giganteum* no es muy alta sobre las líneas empleadas, la  $\text{LC}_{50}$  para los compuestos 1-3 está en el mismo orden de magnitud del valor 4 mg/ml, considerado como límite superior de selección de compuestos promisorios para convertirse en medicamentos (Jantová S *et al.*, 2003; Betancur-Galvis L *et al.*, 2001). Adicionalmente, éstos compuestos pueden ser combinados con otros con el fin de aumentar su efecto citotóxico (Kozubek A *et al.*, 1999; Kubo I *et al.*, 1993). La citotoxicidad de los compuestos 1 a 7 han sido probada frente a las líneas celulares BT-20 (cáncer de mama) y HeLa (carcinoma de cervix) (Kubo I *et al.*, 1993) encon-

**Tabla 2.** Resultados de los ensayos de citotoxicidad de los compuestos aislados de la nuez de *Anacardium giganteum*.

Líneas celulares →	CL <sub>50</sub>			
	HEp-2 (µg/ml)	MCF-7 (µg/ml)	HT-29 (µg/ml)	MKN-45 (µM)
Compuestos ↓				
1	6.5 (6.1 - 6.8)	8.4 (8.1 - 8.7)	9.7 (9.5 - 9.8)	8.0 (7.7 - 8.4)
2	3.7 (3.2 - 4.2)	7.7	10.2 (9.4 - 11.5)	7.5 (5.8 - 9.7)
3	12.2 (11.0 - 13.4)	15.6 (14.1 - 17.2)	20.4 (19.9 - 20.9)	21.2 (20.3 - 22.1)
8	24.4 (20.5 - 28.4)	20.9 (18.6 - 23.3)	37.1 (34.7 - 39.4)	25.8 (22.6 - 28.8)
Doxorubicina HCl	0.6 (0.5 - 0.8)	0.2 (0.1 - 0.3)	0.1 (0.1 - 0.2)	0.3 (0.2 - 0.4)

Intervalo de confianza para  $\alpha = 0.05$ .

trando al igual que en los resultados mostrados en este trabajo, que los 5-alquenilresorcinoles son más activos que los ácidos 6-alquenilsalicílicos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación otorgada por Colciencias-BID; por el programa IPICS (International Program in Chemical Science) de la Universidad de Uppsala, Suecia; y por la agencia JSPS (Japan Society for the Promotion of Science) del gobierno del Japón, para la realización del presente trabajo.

### Bibliografía

- Arévalo LE, Reyes J.** 2001. Aproximación al conocimiento de la familia *Anacardiaceae* en aspectos taxonómicos, fitogeográficos y etnobotánicos en la región del Aracuaera (Amazonia colombiana). Tesis de Biología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Arisawa M, Ohomura K, Kobayashi A, Morita N.** 1989. A cytotoxic constituent of *Lysimachia japonica* thumb (Primulaceae) and the structure activity relationships of related compounds. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(9): 2431-2434.
- Betancur-Galvis L, Zuluaga C, Arno M, González MA, Zaragoza RJ.** 2001. Structure-activity relationship of in vitro antiviral and cytotoxic activity of semisynthetic analogues of scopadulane diterpenes. *J. Nat. Prod.* **64**(10): 1318-1321.
- Bonilla A, Duque C, Garzón C, Takaishi Y, Yamaguchi K, Hara N, Fujimoto Y.** New antimicrobial yellow pigments from the seeds of Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Phytochemistry. Sometido.*
- Bouillant ML, Jacoud C, Zanella J, Favre-Bonvin J, Bally R.** 1994. Identification of 5-(12-heptadecenyl)-resorcinol in rice root exudates. *Phytochemistry* **35**(3): 769-771.
- Breitmaier E, Voelter W.** 1989. Carbon-13 NMR Spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Edition. VCH. Weinheim. Pags. 450-465.
- Cordero, CP.** 2002. Implementación de un método *in vitro* de evaluación preliminar de actividad anticancer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- El-Negoumy SI, Abdalla MF, Saleh NAM.** 1986. Flavonoids of *Phlomis aurea* and *Phlomis floccosa*. *Phytochemistry* **25**(3): 772-774.
- Garcés W, Garcés F, Pellicciari I, Hara SM, Ferreira F, Nakasse L, Siqueira J.** 1997. A bioactive naringenin coumaroil glucoside from *Mabea fistulifera* subsp. *robusta*. *Planta Med.* **63** (4): 386.
- González MJTG, De Oliveira CJC, Fernández JO, Kijoa A, Herz W.** 1996. Further alkyl and alkylphenols of *Knema astrosiamensis*. Location of the double bound in the alkenyl side chains. *Phytochemistry* **43**(6): 1333-1337.
- Itokawa H, Totsuka N, Nakahara K, Takeya K, Lepoittevin JP, Asakawa Y.** 1987. Antitumor principles from *Ginkgo biloba* L. *Chem. Pharm. Bull.* **35**(7): 3016-3020.
- Jantová S, Cipák L, Cernaková M, Kostalová D.** 2003. Effect of berberine on proliferation, cell cycle and apoptosis in HeLa and L1210 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **55**: 1143-1149.
- Justensen U, Knithsen P, Leth T.** 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *J. Chromat. A.* **799**(1-2): 101-110.
- Kozubek A, Tyman JHP.** 1999. Resorcinolic lipeds, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem. Rev.* **99**(1): 1-25.
- Kubo I, Ochi MO, Vieira PC, Komatsu S.** 1993. Antitumor agents from cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *J. Agric. Food Chem.* **41**(6): 1012-1015.

- Lytollis WJ, Scannell RT, An H, Murty VS, Reddy KS, Barr JR, Hecht SM.** 1995. 5-Alkylresorcinols from *Hakea trifurcata* that cleave DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **117**(51): 12683-12690.
- Lie Ken Jie M, Mustafa J.** 1997. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. Applications to fatty acids and tryacylglycerols. *Lipids* **32**(10): 1019-1034.
- Markham KR.** 1982. *Techniques of Flavonoid Identification.* Academic Press, London.
- Nakagawa H, Takaishi Y, Fujimoto Y, Osorio C, Duque C, Garzón C.** Chemical constituents from the Colombian medical planta *Maytenus laevis*. *J. Nat. Prod.* Sometido.
- Rahman W, Ishratullah K, Wagner H, Seligmann O, Chari V, Österdhal BG.** 1978. Prunin-6''-O-p-coumarate, a new acylated flavanone glycoside from *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry* **17**(6): 1064-1065.
- Rao L, Kumari G, Rao N.** 1985. Flavonoid glycosides from *Anisomeles ovata*. *J. Nat. Prod.* **48**(1): 150-151.
- Sang S, Lapsley K, Jeong W, Lachance P, Ho Ch, Rosen R.** 2002. **Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch)** *J. Agric. Food Chem.* **50**(8): 2459-2463.
- Sargent M, Wangchareontrakul S.** 1989. Synthesis and identification of alkenyl and alkadienyl catechols from Brimese Lac. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2**: 431-439.
- Sargent M, Wangchareontrakul S.** 1990. The synthesis of the first natural host germination stimulant for *Striga asiatica* (Witchweed). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **5**: 1429-1434.
- Satoh M, Takeushi N, Nishimura T, Ohta T, Tobinaga S.** 2001. Synthesis of anacardic acids, 6-[8'(Z),11'(Z)-pentadecadienyl]-salicylic acid and 6-[8'(Z),11'(Z),14-pentadecatrienyl]salicylic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **49**(1): 18-22.
- Sharma NK, Sharma VN.** 1966. Structure of anagigantic acid isolated from *Anacardium giganteum*. *Indian J. Chem.*, **4**(11): 504.
- Spencer G, Tjarks LW, Kleiman R.** 1980. Alkyl and phenylalkyl anacardic acids from *Knema elegans* seed oil. *J. Nat. Prod.* **43**(6): 724-730.
- Suzuki Y, Esumi Y, Uramoto M, Kono Y, Sakurai A.** 1997. Structural analyses of carbon chains in 5-alk(en)ylresorcinols of rye and wheat whole flour by tandem mass spectrometry. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**(3): 480-486.
- TCA, Tratado de Cooperación Amazónica.** 1994. *Plantas medicinales amazónicas. Realidad y perspectivas.* Tratado de Cooperación Amazónica, Secretaría pro Tempore. Lima (Perú).
- TCA, Tratado de Cooperación Amazónica.** 1997. *Cultivo de frutales nativos amazónicos, manual para el extensionista.* Tratado de Cooperación Amazónica, Secretaría pro Tempore. Lima (Perú).
- Tyman JHP.** 1979. Non isoprenoid long chain phenols. *Chem Soc. Rev.* **8**: 499-537.
- Wang D, Girard TJ, Kasten TP, LaChance RM, Miller-Widerman MA, Durley RC.** 1998. Inhibitory activity of unsaturated fatty acids and anacardic acids toward soluble tissue factor VII-a complex. *J. Nat. Prod.* **61**(11): 1352-1355.
- Yamagiwa Y, Ohayashi K, Sakamoto Y, Arikawa S, Kamikawa T.** 1987. Synthesis of anacardic acids and ginkgoic acid. *Tetrahedron*, **43**(15): 3387-3394.
- Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y.** 2002. Steroidal and pregnane glycosides from rhizomes of *Tacca chantrieri*. *J. Nat. Prod.* **65**(9): 1293-1298.

Recibido el 12 de marzo de 2004

Aceptado para su publicación el 10 de octubre de 2004