



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE XANTONAS  
NATURALES Y SUS DERIVADOS ACETILADOS Y METILADOS  
EN LINEAS CELULARES TUMORALES.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**JONATHAN RODRIGUEZ CABO MERCADO**



MEXICO, D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

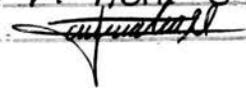
ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jonathan Rodríguez  
Cabo Mercado

FECHA: 19-Abril-04

FIRMA: 

**Jurado asignado:**

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruiz  
Vocal: Prof. Raúl Garza Velasco  
Secretario: Prof. Andrés Navarrete Castro  
1er suplente: Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
2do suplente: Prof. Carlos Damián Zea

**Sitios donde se desarrollo el tema:**

- Laboratorio 210, Productos Naturales, Instituto de Química, U.N.A.M.
- Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Química, U.N.A.M.



**Asesor del Tema:** Dra. Angelina Quintero Ruiz.



**Supervisor Técnico:** M. en C. Elizabeth Estrada Muñiz



**Sustentante:** Jonathan Rodríguez Cabo Mercado

**El presente trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Angelina Quintero Ruiz del Departamento de Biología de la Facultad de Química U.N.A.M. y con el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química U.N.A.M.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mi papá Roberto y mi mamá Guadalupe por su amor, su entrega y por ayudarme a superar mis metas en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos Roberto y Jorge G. por todos los momentos que hemos compartido.

A todos mis profesores de la facultad de química por sus enseñanzas durante las clases, y fuera de ellas.

A la Dra. Angelina Quintero y el Dr. Ricardo Reyes por su paciencia en la realización de este trabajo.

Al Q.F.B. José S. por asistirme en la realización de los experimentos.

A todas las personas del laboratorio de Biología molecular y del laboratorio de Productos naturales por su ayuda.

A los miembros del Jurado por sus correcciones, sugerencias y comentarios.

A mis amigos Gere, Beto, Fátima, Esther, por su amor, amistad, sinceridad y ayuda.

A todos mis amigos desde la secundaria, CCH-sur y de la Facultad de Química con quienes he compartido felicidad y angustia.

Y en general a todas a aquellas personas con quienes he convivido, gracias.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. Abreviaturas .....                                   | 6  |
| 2. Objetivos .....                                      | 9  |
| 3. Hipótesis.....                                       | 10 |
| 4. Antecedentes.....                                    | 11 |
| <br>  |    |
| 5. Metodología  |    |
| 5.1. Aislamiento y caracterización.....                 | 42 |
| 5.2.Modificación estructural de las xantonas.....       | 49 |
| 5.3.Citotoxicidad.....                                  | 53 |
| 5.4.Soluciones.....                                     | 58 |
| <br>  |    |
| 6. Resultados y Discusión                               |    |
| 6.1.Aislamiento y caracterización.....                  | 61 |
| 6.2.Modificación estructural .....                      | 64 |
| 6.3.Citotoxicidad.....                                  | 66 |
| 6.4.Resultados de citotoxicidad para las xantonas.....  | 68 |
| 6.5.Resultados de citotoxicidad para los extractos..... | 78 |
| <br>  |    |
| 7. Conclusiones.....                                    | 86 |
| 8. Perspectivas.....                                    | 87 |
| 9. Bibliografía.....                                    | 88 |
| 10. Apéndice.....                                       | 95 |

## 1. ABREVIATURAS

|                      |  |
|----------------------|--|
| µg                   | Microgramos  |
| µL                   | micro Litros   |
| µM                   | microMolaridad   |
| Cm                   | Centímetros  |
| col.                 | Colaboradores  |
| m                    | Metros   |
| mm                   | Milímetros   |
| °C                   | grados centígrados   |
| ADN                  | Ácido desoxiribonucleico   |
| Ar                   | Aromático  |
| ARN                  | Ácido Ribonucleico   |
| c.b.p.               | cuanto basta para  |
| <i>C.brasiliense</i> | <i>Calophyllum brasiliense</i>   |
| c.c.                 | cromatografía en columna   |
| c.c.f.               | cromatografía en capa fina   |
| C1,2,3,4,5           | concentración 1,2,3,4,5  |
| CMA's                | moléculas de adhesión  |
| coA                  | coenzima A   |
| δ                    | desplazamiento químico   |
| D-MEM                | Medio Tagle modificado de Dulbecco   |
| DMSO                 | dimetil sulfóxido  |
| G                    | Gramos   |
| <i>G. intermedia</i> | <i>Garcinia intermedia</i>   |
| G1                   | Fase del ciclo celular que se encuentra entre el espacio en la división celular y la síntesis de ADN |
| G2                   | Fase del ciclo celular que se encuentra en el espacio entre la síntesis de ADN y la división celular |
| H                    | Horas  |
| HCl                  | ácido clorhídrico  |
| HEPES                | Ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazin.N'-(2-etanosulfónico)  |
| HRMN                 | Resonancia magnetica nuclear de protón   |

|                  |   |
|------------------|---|
| Hz               | Hetz  |
| IC <sub>50</sub> | Concentración del compuesto que produce 50 % de inhibición del crecimiento celular. |
| IIIac            | xantona III acetilada   |
| III <sub>m</sub> | xantona III metilada  |
| IVac             | xantona IV acetilada  |
| J                | Constante de acoplamiento   |
| Kg               | Kilo gramos   |
| M                | Fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células                       |
| Me               | Sustituyente metilo   |
| MHz              | Mega Hertz  |
| mL               | mili Litros   |
| MTT              | Bromuro de 3(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio                         |
| N                | Normalidad  |
| NaOH             | hidróxido de sodio  |
| Nm               | Nanómetros  |
| No.              | Número  |
| Oac              | Sustituyente acetilo  |
| OH               | Sustituyente hidroxilo  |
| OMe              | Sustituyente metoxilo   |
| p.f.             | Punto de fusión   |
| p.p.m.           | partes por millón   |
| PBS              | Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4   |
| PBS-EDTA         | Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiamino tetraacético.            |
| r.p.m.           | Revoluciones por minuto   |
| Rf.              | Frente de referencia  |
| RMN              | Resonancia magnética nuclear  |
| S                | Fase del ciclo celular durante la que se realiza la síntesis del ADN                |
| SRB              | Sulfo Rodamina B  |
| SSA              | Secretaria de salud   |
| U.V.             | Ultra violeta   |

Vme  
WHO

xantonaV metilada  
World Health Organization

## 2. OBJETIVOS

- Aislar y caracterizar a las xantonas provenientes del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*.
  
- Llevar a cabo la síntesis de los derivados acetilados y metilados de las xantonas identificadas.
  
- Determinar la citotoxicidad de las xantonas y sus derivados en diferentes líneas celulares tumorales humanas.
  
- Determinar la citotoxicidad de los extractos de *Calophyllum brasiliense* y de *Garcinia intermedia* en diferentes líneas celulares tumorales humanas.

### 3. HIPÓTESIS

- Se ha demostrado que las xantonas de tipo preniladas presentan actividad citotóxica en diferentes líneas celulares tumorales, se propone entonces que, las xantonas preniladas aisladas de *Calophyllum brasiliense* así como los derivados acetilados y metilados presenten actividad citotóxica en líneas celulares tumorales humanas.
  
- Se ha demostrado que la familia *Guttiferae* es una fuente rica de flavonoides, benzopiranos, cumarinas y xantonas, de estos últimos grupos de compuestos se conoce su potencial citotóxico, es por ello que se prevé que los extractos de *Calophyllum brasiliense* y *Garcinia intermedia* presentarán actividad citotóxica cuando sean probados en líneas celulares tumorales.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. CÁNCER.

El cáncer es un crecimiento incontrolado y diseminado de células que pueden afectar a casi cualquier tejido del cuerpo. Cáncer de colon, pulmón y estómago son de los cánceres más comunes en todo el mundo tanto en hombres como en mujeres <sup>(73)</sup>. Entre la población masculina el cáncer de colon y pulmón son los más comunes; mientras que para el caso de mujeres el cáncer de cérvix y mamá son los principales tipos de cáncer. Más de 10 millones de personas alrededor del mundo son diagnosticadas con cáncer cada año y se estima que existirán alrededor de 15 millones de nuevos casos para el año 2020; el cáncer causa 6 millones de muertes cada año lo cual representa el 12 por ciento de muertes anuales en el mundo <sup>(73)</sup>. En México el cáncer es una de las enfermedades con una alta tasa de mortalidad en la población (5.5%) y se han reportado 24,109 casos de muertes asociadas a este padecimiento en el año de 2001, siendo los siguientes órganos los más afectados en orden de importancia: tráquea, bronquios, pulmón, estómago, útero, hígado, próstata, cérvix <sup>(52)</sup>.

El cáncer está considerado como una enfermedad previsible, a través de una vida, alimentación sana y evitando la exposición con agentes cancerígenos. Muchos de los cánceres más frecuentes son curables y se ha reconocido a la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia como los principales tratamientos efectivos <sup>(73)</sup>. El cáncer es el resultado de la desregulación de los genes que controlan el ciclo celular lo que produce expansión y heterogeneidad clonal <sup>(59,61)</sup>. Debido a la gran variedad de órganos que cumplen este requisito, el término cáncer se refiere a alrededor de cien formas diferentes de la enfermedad. Este padecimiento es de origen multifactorial y es un proceso multietapas, por lo que la etiología es diversa. Cuando las células alteradas crecen sin control tiene lugar la invasión del tejido adyacente pudiendo alterar sus funciones <sup>(43)</sup>.

El paso inicial para que una célula normal pueda generar cáncer es la alteración de un gen que participa en la regulación del ciclo celular; por medio de mutaciones, aumento o disminución de la expresión o por fallas en el metabolismo del ADN <sup>(75)</sup>. Aunque se sabe que la adquisición de una mutación es un paso inicial importante, no es suficiente para generar la enfermedad, pues ésta es un proceso molecular y celular dependiente del tiempo y de otras mutaciones por lo que pueden pasar varios años antes de que las células expresen modificaciones fenotípicas, excepto para el caso del cáncer causado por virus altamente oncogénicos <sup>(30, 59, 61)</sup>. En tumores sólidos la clona inicial forma pequeños acúmulos de células con características fenotípicas idénticas al tejido de donde proviene los cuales se llaman adenomas y son de tipo benigno <sup>(69)</sup>.

Durante la progresión tumoral, la acumulación de mutaciones en diversos genes lleva a la pérdida de regulación en el metabolismo del ADN. Para que un tumor crezca, necesita librar ciertos limitantes como, limitación por el tejido adyacente y reducción de la cantidad de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento <sup>(31)</sup>. La falta de oxígeno genera un estado de hipoxia, lo que favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso llamado angiogénesis.

La diseminación y establecimiento de las células tumorales desde su sitio de origen a otro u otros sitios del organismo se denomina metástasis. Para que las células sobrevivan deben estar rodeadas por células similares debido al fenómeno conocido como reconocimiento célula-célula y aquellas que no cumplen este requisito, mueren <sup>(50)</sup>. Las moléculas de adhesión que participan en este proceso son varias, pero las más importantes son las moléculas de adhesión célula-célula (CMA's) y las cadherinas <sup>(20)</sup>.

La capacidad de generar metástasis es lo que lleva generalmente al organismo a la muerte <sup>(43)</sup>.

#### 4.2. QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER.

A través de la quimioterapia las enfermedades neoplásicas malignas son tratadas y en muchos casos son curables <sup>(57)</sup>. Existen muchos tipos de neoplasias y una amplia gama de medicamentos para su tratamiento. Para los diversos tipos de cáncer la quimioterapia puede ser curativa o paliativa (las señales y los síntomas de la enfermedad son parcialmente abatidos por periodos de meses a años). En la actualidad los fármacos anticancerígenos tienden a utilizarse en una fase más temprana del tratamiento, a menudo junto con radiación y cirugía. Es en esta etapa cuando los tumores tienen mayores probabilidades de desaparecer y el paciente tiene mayor capacidad para soportar el tratamiento <sup>(21)</sup>.

Los fármacos citotóxicos actúan sobre células en proliferación (sin embargo no todos lo hacen), por lo que se formuló la hipótesis de que los tumores con alta división celular son más susceptibles al tratamiento, al igual que los tejidos sanos con alto recambio, como la piel, médula ósea, folículos pilosos y epitelio <sup>(12)</sup>. Pero lo anterior no es cierto para todos los casos, ya que algunos tumores de alta proliferación son insensibles al tratamiento y algunos de lento crecimiento son sensibles a éste <sup>(7, 19, 70)</sup>. Si bien se pensó que la forma en que los fármacos citotóxicos disminuían el tamaño del tumor era por necrosis <sup>(70)</sup>, la evidencia actual señala que es la muerte celular programada (apoptosis) es el mecanismo responsable por el que las células tumorales mueren <sup>(29, 32, 53, 62)</sup>, aunque algunos fármacos inducen necrosis a concentraciones elevadas y apoptosis a concentraciones bajas.

Algunos de estos fármacos actúan sobre una fase específica del ciclo celular; por ejemplo, la vincristina, la vinblastina y el paclitaxel son específicos de la fase M; el metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxiurea son específicos de la fase S y el cisplatino, los agentes alquilantes, análogos y antagonistas hormonales no son específicos de alguna de las fases debido a que causan daño inespecífico al ADN o a que inhiben la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación <sup>(12)</sup>.

#### 4.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer poseen diversos mecanismos de acción, debido a la variedad de sus blancos moleculares; por lo tanto, las estructuras químicas son de lo más diversas.

- a) Agentes alquilantes: Estos compuestos marcaron el inicio de la quimioterapia contra el cáncer con el uso de las mostazas nitrogenadas. Las mostazas nitrogenadas reaccionan sobre los nucleófilos celulares y en el ADN, principalmente sobre la posición 7 de la guanina; los agentes alquilantes bifuncionales causan una unión de tipo covalente entre las dos cadenas del ADN. Aunque estos fármacos no actúan sobre una fase específica del ciclo celular, se observa mayor sensibilidad al final de la fase G1 y en la fase S. Ejemplos de este tipo de fármacos son el clorambucil, busulfán y mitomicina C <sup>(23)</sup>.
- b) Antimetabolitos: Estos agentes interfieren con el metabolismo de purinas y pirimidinas causando una disminución en la reserva de nucleótidos; en este grupo se incluyen los análogos del folato, de aminoácidos, de purinas y pirimidinas que participan en la biosíntesis de las bases nitrogenadas del ADN.

Actúan en la fase S del ciclo celular. Un ejemplo de análogo del folato es el metotrexato, de las pirimidinas es el 5-fluorouracilo, de las purinas la 6 mercaptopurina y de los aminoácidos la azaserina <sup>(23)</sup>.

- c) Inhibidores de las topoisomerasas I y II: Estos fármacos estabilizan la unión de un complejo de topoisomerasa I ó II con el ADN causando rupturas de una o las dos hebras dependiendo de la enzima de que se trate. Estos inhibidores actúan en las fases S y G2. Ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I son la camptotecina y de la topoisomerasa II el etopósido y el tenopósido. <sup>(23)</sup>.
- d) Antibióticos antitumorales: Proviene de microorganismos del género *Streptomyces* y presentan la característica de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN de forma horizontal debido a fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas; esto causa la inhibición de la síntesis de ARN y ADN. Además, algunos presentan la propiedad de formar radicales libres de oxígeno que originan la ruptura de las cadenas de ADN. Ejemplos de este tipo de fármacos son la actinomicina O, la daunorrubicina y las bleomicinas A2 y 82 <sup>(12,23)</sup>.
- e) Inhibidores de la mitosis: En este grupo se incluyen a los alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina, la podofitotoxina y el paclitaxel; estos compuestos se unen a la tubulina y evitan su polimerización deteniendo a las células en metafase <sup>(23)</sup>.
- f) Agentes hormonales: Útiles en el tratamiento de cáncer dependiente de hormonas como el de mama, próstata y cérvix. Estos fármacos se unen al receptor de hormonas esteroides y promueven su migración al núcleo. Ejemplos de este tipo de fármacos son el tamoxifen y la nafodixina <sup>(23)</sup>.

- g) Otros: En este grupo se incluyen fármacos con diversos mecanismos de acción como el cisplatino que forma aductos con el ADN, la procarbazona que no posee un mecanismo de acción claro y la L-asparaginasa que hidroliza la asparagina (23).

#### 4.4. APOPTOSIS

La muerte apoptótica es un evento natural que tiene lugar durante el desarrollo embrionario y es parte de un proceso de eliminación de células en organismos maduros, presentándose en el caso de diversas patologías como las enfermedades neurodegenerativas. Las células apoptóticas presentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que resultan de una serie de eventos controlados genéticamente. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado más de 10 genes que regulan la muerte apoptótica observada durante el desarrollo de este organismo. En tres de estos genes se han identificado homólogos en mamíferos: los genes proapoptóticos *ced-3* y *ced-4* y el gen antiapoptótico *ced-9* (10).

En mamíferos, los homólogos de los genes *ced-3* y *ced-9* son proteasas, miembros de la familia de las caspasas y Bcl-2 respectivamente, mientras que *ced-4* corresponde a la proteína Apaf-1 que recluta caspasas al complejo de muerte. Las caspasas son componentes claves del proceso apoptótico y forman parte de la cascada proteolítica responsable de la degradación de proteínas celulares específicas (66).

También existen moléculas que inhiben la muerte apoptótica por mecanismos distintos a los que sigue *ced-3* y Bcl-2, como las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), caracterizadas primero en baculovirus de insectos, habiéndose ya identificado de sus

homólogos en mamíferos. Se sabe que estas proteínas interactúan con las caspasas inhibiendo su activación a diferentes niveles<sup>(10)</sup>.

#### 4.5. BÚSQUEDA DE NUEVOS FÁRMACOS.

La puesta en el mercado de un nuevo medicamento precisa cubrir una nueva serie de etapas que de forma esquemática podrían resumirse en:

- a) Búsqueda de modelo
- b) Manipulación del modelo
- c) Determinación de formas farmacéuticas y dosificación.

La búsqueda de modelo o “cabeza de serie” supone encontrar una actividad biológica nueva en un compuesto químico. Se trata, en consecuencia, de encontrar nuevas estructuras que puedan servir como punto de partida para su modificación estructural, ante el hecho de que el nuevo compuesto no tiene porqué ser el mejor de los posibles que se puedan preparar (manipulación del modelo)<sup>(4)</sup>.

Puesto que existe una gran probabilidad de que una molécula obtenida por modificación de otra con actividad conocida presente propiedades útiles, el método de variación estructural es más racional y productivo que el ensayo de compuestos naturales o de síntesis seleccionados al azar. Además, presenta también ventajas de tipo económico, ya que tanto los métodos de síntesis como los de ensayos farmacológicos de los análogos serán similares a los de los compuestos de referencia<sup>(4)</sup>.

Algunos de los criterios para la selección de los compuestos de interés son:

- a) Apertura o cierre de anillos. Se conocen numerosos ejemplos en los que este método se ha usado para estudiar la conformación activa de ciertos

neurotransmisores o fármacos diseñando análogos rígidos o semirrígidos de los mismos.

- b) Introducción de enlaces múltiples. La introducción de un enlace doble o triple puede alterar tanto la forma de una molécula como sus propiedades físico-químicas; por ello es frecuente que esta clase de modificaciones produzca variaciones en el tipo de actividad farmacológica.
- c) Homología. Un homólogo de un determinado compuesto es el análogo que resulta de la adición de un carbono a la cadena o anillo original. Un cambio de este tipo suele ir acompañado por un incremento de lipofilicidad <sup>(4)</sup>.

Actualmente los productos naturales de origen vegetal son una excelente opción para satisfacer la demanda de fármacos en el mercado mundial <sup>(35)</sup>; prueba de ello es el Taxol (Paclitaxel). El taxol (paclitaxel) es un diterpeno aislado originalmente del árbol *Taxus brevifolia* con un rendimiento del 0.007 %, por ese motivo se prefirió la semisíntesis a partir de metabolitos secundarios de *Taxus baccata* *Ummaeus* y de *Taxus walfichiana* *Zuccarini* <sup>(44)</sup>. La primera muestra pura de este compuesto se obtuvo en 1966 y la estructura se reportó en 1971 <sup>(60)</sup>. El taxol está indicado en el cáncer de ovario, de mama, de células no pequeñas de pulmón, de esófago, de vejiga, de endometrio, de cérvix, de linfoma y de sarcoma de Kaposi <sup>(15,44)</sup>.

Este fármaco es un inhibidor de la mitosis y causa la estabilización de los microtúbulos <sup>(56)</sup>; esta estabilidad se da por la unión del paclitaxel a la unidad  $\beta$  del dímero de tubulina y los aminoácidos  $\beta$ 1-31 y  $\beta$ 217-233 son importantes para la unión. Los efectos celulares del paclitaxel son dosis y tiempo dependientes y éstos son: inhibición de la proliferación, centrosomas mitóticos con arreglos de microtúbulos no asociados con el

centrómero, incremento en la concentración de tubulina posiblemente por la inducción de la expresión de ésta, resistencia a la despolimerización y apoptosis<sup>(51)</sup>.

Los efectos adversos de este medicamento incluyen mielosupresión, neuropatía, fatiga, alopecia, diarrea y toxicidad de mucosas, piel y uñas<sup>(15)</sup>. El paclitaxel, además, tiene propiedades similares a las endotoxinas que estimulan la síntesis de citocinas proinflamatorias y del radical óxido nítrico en macrófagos. Por otro lado, las xantonas de origen natural se han postulado como potenciales agentes quimioterapéuticos en contra del cáncer debido a las actividades citotóxicas que presentan,<sup>(42)</sup> y a la inducción de la respuesta apoptótica que presentan en líneas celulares tumorales humanas<sup>(35)</sup>. Sin embargo, debido a que las xantonas de origen natural son relativamente limitadas en el tipo y posición de sustituyentes impuestas por las rutas biosintéticas, la síntesis de nuevos compuestos puede aumentar las posibilidades de incorporar sustituyentes en diferentes posiciones y de diferente naturaleza alrededor del núcleo base de las xantonas; con ello crecen las posibilidades de encontrar compuestos que tengan una mayor actividad citotóxica en líneas celulares tumorales<sup>(42)</sup>.

Existen reportes en la literatura que señalan cómo la naturaleza de los sustituyentes influye en la proliferación de células tumorales *in vitro*. Cuando existe un cambio estructural en un compuesto biológicamente activo, se genera una variación de las características fisicoquímicas del mismo compuesto, como un incremento en la lipofilia<sup>(4)</sup> lo cual resulta de especial interés si este compuesto presenta una baja absorción, sin embargo dependiendo del tipo de sustituyentes y de la posición en la molécula la actividad biológica también se modifica.

#### 4.6. *Guttiferae*.

Los productos naturales de origen vegetal ofrecen una amplia variedad de compuestos bioactivos los cuales podrían satisfacer fácilmente la demanda de fármacos antitumorales <sup>(35)</sup>. Desde que las xantonas han sido aisladas e identificadas en la familia *Guttiferae*, se ha puesto especial atención en los sustituyentes químicos que contiene su estructura base <sup>(14)</sup>. Las xantonas preniladas y los compuestos relacionados estructuralmente, las benzofenonas, exhiben un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas potenciales como son: antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatorios, inhibidores de la monoamino oxidasa y citotoxicidad, entre otros <sup>(14)</sup>. La familia *Guttiferae* es una fuente importante de metabolitos secundarios; por ejemplo, Rukachaisirikul y col. <sup>(48)</sup> reportaron la existencia de nueve xantonas conocidas como nigrolinxantonas (A-I) provenientes de *Garcinia nigrolineata* donde la estructura de estos compuestos presenta un patrón de hidroxilación en las posiciones 1, 3, 4, 6 y 8. De manera similar se ha encontrado en esta misma especie la existencia de otras dos nigrolinxantonas así como algunos flavonoides y quinonas.

La diversidad de xantonas sustituidas presentes en algunas especies, pone de manifiesto la amplia gama de sustituyentes que puede exhibir el núcleo base de las xantonas y, además, evidencia su distribución en la familia *Guttiferae*. Por ejemplo Zhang <sup>(76)</sup> determinó que los extractos de la especie *Garcinia hurburyi* contienen entre otros compuestos ácido gamboico. Dentro de los compuestos más ampliamente estudiados está la mangostina, compuesto aislado de la especie *Garcinia mangostana* como uno de los constituyentes más activos <sup>(37)</sup>. Adicionalmente, la especie *Garcinia xanthochymus* es una fuente importante de 1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-4,7,8-tri(3-metil-2-butanil) xantona <sup>(13)</sup>. Por otro lado para el caso de la especie *Garcinia multiflora* se ha llevado a cabo el

aislamiento y la caracterización de nuevos compuestos derivados de las xantonas, como 4,6,4'-trihidroxi-2,3'-dimetoxi-3-prenilbenzofenona y la 3,8-dihidroxi-2.4.6-trimetoxixantona <sup>(14)</sup>.

Para esta misma familia se ha demostrado que los extractos de *Calophyllum brasiliense* así como los de *Garcinia intermedia*, ambas especies distribuidas en el sur de México y América Latina, presentan una amplia gama de metabolitos potencialmente activos, como son: guttiferona A, 8-desoxi gartanina, amentoflavona, garcinoxantona B para el caso de *Garcinia intermedia* y Jacareubina, 6-desoxijacareubina, xantona V y Xantona VI en el caso de *Calophyllum brasiliense*. Alrededor de los compuestos fenólicos en la familia Guttiferae, las benzofenonas preniladas son conocidas por su amplia distribución en el género *Garcinia*, además de demostrar *in vitro* su actividad citotóxica causada por la inducción de la respuesta apoptótica, por lo tanto los derivados de las benzofenonas son considerados potenciales candidatos en el desarrollo de fármacos anticancerígenos <sup>(35)</sup>.

Se ha reportado la actividad citotóxica de algunos derivados de las benzofenonas como el garcinol, isogarconol y xantocconol en líneas de leucemia humana (NB4, HL60, U937 y K-562), a través de la técnica de exclusión de azul tripano. La actividad de dichos compuestos sugiere estar mediada por la inducción de la respuesta apoptótica como lo demuestran los resultados de fragmentación del ADN, activación de la caspasa 3 y liberación del citocromo C <sup>(35)</sup>. Con la finalidad de demostrar cómo estos constituyentes del género *Garcinia* pudieran llegar a ser potenciales agentes quimiopreventivos en contra de distintos tipos de cáncer, se han llevado a cabo distintos esfuerzos; por ejemplo Ito y col. <sup>(26)</sup> llevaron a cabo el aislamiento y la

caracterización estructural de las fuscaxantonas (A-H) provenientes de la especie *Garcinia fusca*; todas estas nuevas xantonas presentan un grupo prenilo alrededor de la estructura base de las xantonas, además de reportar los efectos inhibitorios inducidos a través del virus Epstein-Barr en células Raji. Por otra parte, algunos compuestos citotóxicos que también han sido aislados del género *Garcinia*, en particular de la especie *Garcinia macrophylla* y que han demostrado actividad citotóxica se encuentra la gutitiferona B con una  $IC_{50}$  de 6.8  $\mu\text{g/mL}$  en células tumorales de ovario.

Por otro lado, Ito y col. <sup>(26)</sup> han reportado el aislamiento de benzofenonas polipreniladas provenientes de *Garcinia assigu* y sus potenciales actividades quimioterapéuticas en contra del cáncer; estos estudios señalan además que, la presencia de un grupo prenilo en diferentes xantonas resulta sumamente importante para que estos compuestos puedan ejercer su efecto. Adicionalmente, se ha demostrado cómo la ciclización del grupo isoprenilo en estructuras de benzofenonas y xantonas resulta indispensable para exacerbar la respuesta citotóxica.

#### 4.7. COMPOSICIÓN DE LA MADERA Y SUS METABOLITOS

La madera está constituida principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales le confieren su estructura y propiedades. De estos, el más importante es la celulosa (35-45 %), la cual es un polímero lineal de unidades de anhidro-D-glucopiranosas con enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídicos. Estas cadenas de celulosa constituyen microfibrillas, formando así el esqueleto de la madera. La hemicelulosa es el polímero menos abundante y es un polisacárido constituido por azúcares como xilosa, glucosa, manosa, galactosa y arabinosa. Estos polímeros son ramificados. La lignina está presente en la madera en una proporción de 15 a 35 % y es un polímero amorfo.

Además de estos polímeros estructurales se encuentran otros compuestos que no forman parte de la estructura de la madera, como son carbohidratos simples, almidón, elementos minerales y metabolitos secundarios o extractivos. El término extractivo incluye una gran variedad de compuestos químicos, tanto primarios como secundarios. Entre los primarios se encuentran los lípidos, ácidos grasos, etc. Entre los secundarios están los flavonoides, isoflavonoides, lignanos, triterpenos, cumarinas, xantonas, compuestos aromáticos y aceites volátiles. Cabe señalar que las especies de madera difieren mucho en cuanto al tipo y cantidad de compuestos extractivos que tienen. También existe una considerable variación en la distribución de los compuestos extractivos de la madera de árboles individuales. Los extractivos no forman parte de la estructura de la pared celular y constituyen entre el 3 y 4 % de la masa seca de la madera y en algunas especies tropicales hasta un 25 %. Son los extractivos los principales responsables de impartir a la madera olores característicos.

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo: el primario y el secundario. En el primero se sintetizan compuestos como aminoácidos, glucósidos, nucleótidos, lípidos, etc. En el segundo se sintetizan compuestos como alcaloides, flavonoides, xantonas, terpenos, etc. Los metabolitos primarios son importantes para las funciones celulares y a partir de estos compuestos, se producen los llamados metabolitos secundarios. Estos diversos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en el reino vegetal, se calcula que existen alrededor de 30 000 diferentes compuestos.

Muchos de los metabolitos secundarios se limitan a especies o subespecies únicas, variando en tipo o cantidad de estos; por consiguiente, una evidencia de la relación taxonómica de algunas especies es a través de los metabolitos secundarios que poseen.

Actualmente se ha determinado que los metabolitos secundarios tienen un propósito ecológico y un significado evolutivo, ya que están estrechamente involucrados en las complejas interacciones ecológicas entre plantas y otros organismos. Una de estas es la defensa química contra patógenos y herbívoros. De esta forma se piensa que las plantas producen diversos metabolitos secundarios como medio para repeler a sus depredadores, ya sea por su sabor, su olor o su toxicidad, de tal forma que pueden causar trastornos al depredador o inclusive la muerte del mismo.

Los metabolitos secundarios se pueden encontrar casi en todos los tejidos vegetales; en los tejidos leñosos son muy abundantes y presentan una gran diversidad estructural así como una gran diversidad de actividades farmacológicas. Se ha demostrado que algunas de estas sustancias poseen propiedades citotóxicas como las benzofenonas y xantonas, incluyendo a aquellas xantonas sustituidas (Figura No. 1).

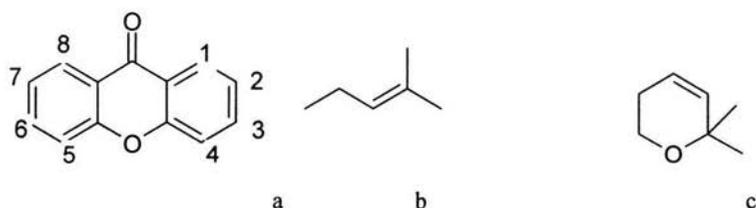


Figura No. 1 a) Estructura básica de las Xantonas. Sustituyentes más comunes de las xantonas b) isoprenilo (2,2-dimetilalil) c) Sustituyente de cromeno producto de la ciclación del isoprenilo con un OH fenólico de la xantona.

Algunos metabolitos secundarios pertenecientes a la familia *Guttiferae* y que han sido tema de profundas investigaciones incluyen  $\beta$ -sitosterol (Figura No. 2), Jacaurebina

(Figura No. 3), 6-dehidroxijacaurebina (Figura No. 4), guanidina (Figura No. 5), isoguanidina (Figura No. 6), cicloguanidina (Figura No. 7).

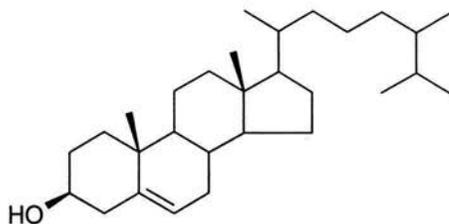


Figura No. 2 Estructura del  $\beta$ -sitosterol.

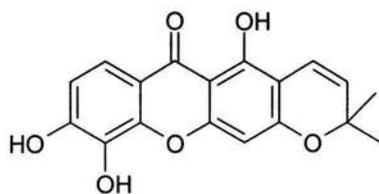


Figura No. 3 Estructura de la Jacaurebina.

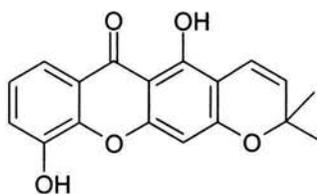


Figura No. 4 Estructura de la 6-desoxijacaurebina.

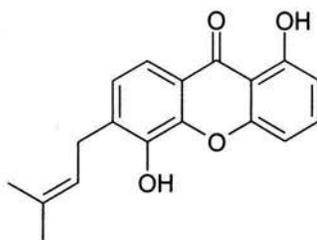


Figura No. 5 Estructura de la Guanidina.

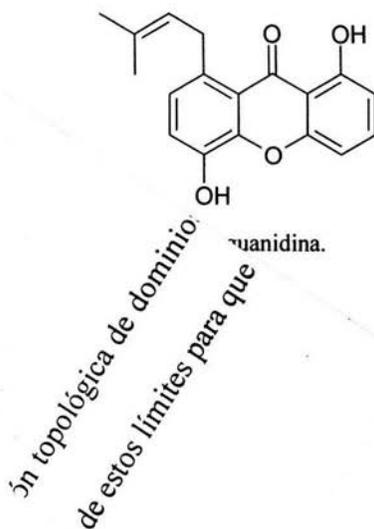


Figura No. 7 Estructura xantidina.

En la familia *Guttiferae* se ha descubierto una amplia distribución de xantonas en diversas especies propias de esta familia; en el caso particular de la especie *Calophyllum brasiliense* ya han sido aisladas y caracterizadas algunas como la 6-desoxijacuberina conocida como xantona I; 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona conocida como xantona II; jacuberina conocida como xantona III; 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona conocida como xantona IV; 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona conocida como xantona V (Figura No. 8). Cabe mencionar que ya ha sido evaluada la actividad citotóxica de algunas de estas xantonas en líneas celulares tumorales con la técnica de SRB <sup>(17)</sup>, y con MTT en las líneas K562, MCF-7, HeLa, Calo, C-33, SW480, SW620 comprobándose su actividad citotóxica y siendo la xantona III, la de mayor actividad, por ello es que estos compuestos ofrecen una alternativa como agentes potenciales antitumorales.

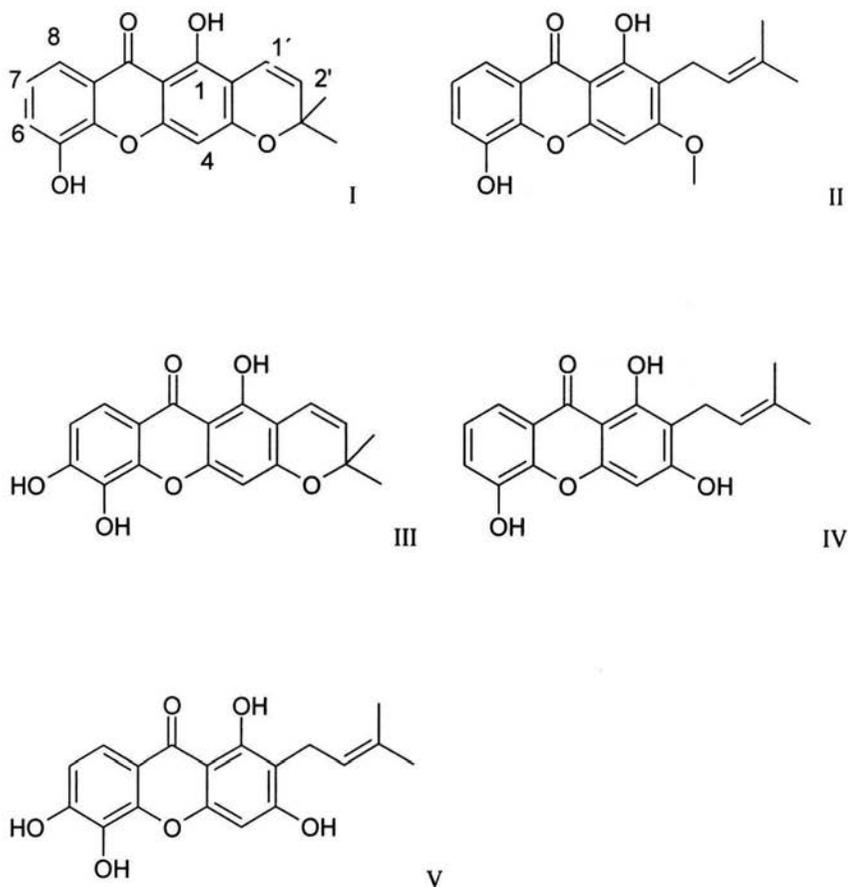


Figura No. 8 Estructuras de xantonas naturales aisladas de *C. brasiliense*.

#### 4.8. *Calophyllum brasiliense*.

Este es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 metros y con un diámetro promedio de 1.80 m cerca de su base. El tronco es derecho, con ramas ascendentes, copa redondeada y densa. Pertenece a la familia *Guttiferae* la cual incluye alrededor de 1000 especies confinadas principalmente a los trópicos. Esta familia está constituida por 6 subfamilias. Una de estas *Calophylleae*, a su vez está agrupada en 3

géneros incluyendo *Calophyllum*. El género está constituido por aproximadamente 130 especies.

*C. brasiliense* se distribuye en América latina desde el sur de México, incluyendo Centroamérica, las Antillas y hasta el noroeste de Sudamérica; en esta última región se han encontrado reportes de la existencia de esta especie en el Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Oeste de Brasil, Bolivia y Perú. En México se encuentra en las vertientes del Golfo y del pacífico. En la primera desde el sur de Veracruz y hasta la península de Yucatán, abarcando Tabasco, norte de Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En la segunda se localiza desde Nayarit hasta la zona costera y depresión central de Chiapas, pasando por Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. La madera de esta especie se considera de muy buena calidad y es empleada para la fabricación de vigas, duelas, mangos para herramientas, triplay, muebles finos, puertas, entre otros.

Estudios fitoquímicos previos indican que el género *Calophyllum* es una fuente rica en metabolitos secundarios tales como xantonas, neoflavoides, cumarinas, benzopiranos, triterpenos y esteroides<sup>(46)</sup>. Los estudios químicos realizados sobre la madera de *C. brasiliense* originaria de Brasil indica que contiene principalmente xantonas y triterpenos. Dentro de los metabolitos propios de esta especie, las xantonas se forman por ciclación de las benzofenonas resultando de la adición de unidades de malonil CoA sobre un precursor en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, un ácido benzoico proveniente del fraccionamiento de un ácido cinámico. Aunque no se encuentran del todo estudiadas se conoce que algunas de ellas como las geninas son inhibidoras del sistema de la monoamino oxidasa y estimulantes del sistema nervioso central; algunas xantonas son fungicidas y potentes

antibacterianos, varias mas, inhiben la agregación plaquetaria y otras como la mangostina son potentes antiinflamatorios <sup>(8)</sup>.

#### 4.9. BIOSÍNTESIS Y SÍNTESIS DE LAS XANTONAS.

Generalmente las xantonas se forman por ciclación de las benzofenonas, producto de la adición de unidades carbonadas (malonil CoA) sobre un precursor en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>(Figura No 9), un ácido benzóico proveniente del fraccionamiento de un ácido cinámico.

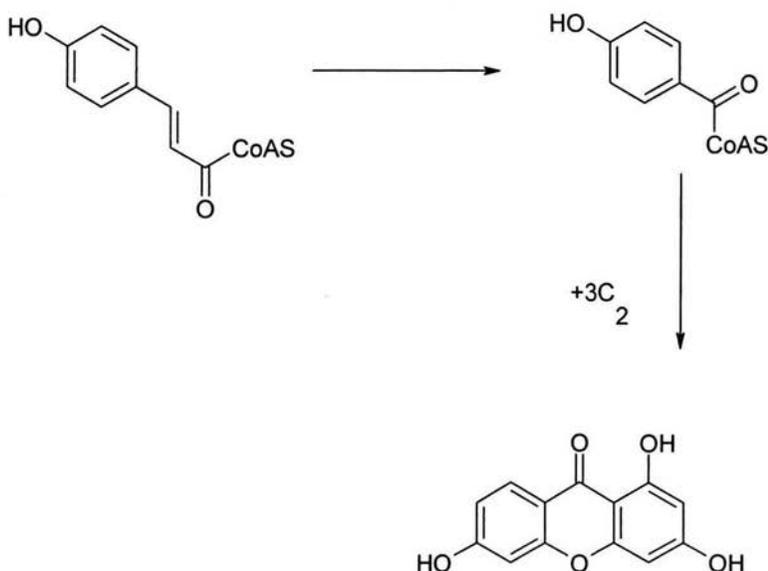


Figura 9. Origen biosintético de las xantonas.

Actualmente se ha considerado que dentro de los métodos para llevar a cabo la síntesis de las xantonas se incluye la vía de la benzofenona (Figura No 10, I) y la vía de los intermediarios del diaril-éter (Figura No. 10, II). En el método clásico para la obtención de las xantonas estas son obtenidas a través de la condensación entre el ácido benzóico

ortooxigenado y un fenol activado en un medio con cloruro de zinc y oxiclورو de fósforo (Figura No. 10, A). Los intermediarios derivados de la benzofenona (Figura No. 10, I) son también accesibles a través de una condensación por acilación de Friedel-Crafts a través de un cloruro de benzoil apropiadamente sustituido con derivados fenólicos (Figura No. 10, B). Por otro lado el método de la benzofenona involucra la ciclización de las benzofenonas 2,2'-dioxigenadas a través de un proceso oxidativo o de sustracción de hidrógenos (Figura No. 10, C). El método diaril fue propuesto por un intermediario de bifenil-éter (Figura No. 10, II) con la formación de un anillo por la conversión en un solo paso a través de la diisopropilamida de litio (Figura No. 10, D) o por un cloruro de acetilo (Figura No. 10, E) <sup>(42)</sup>.

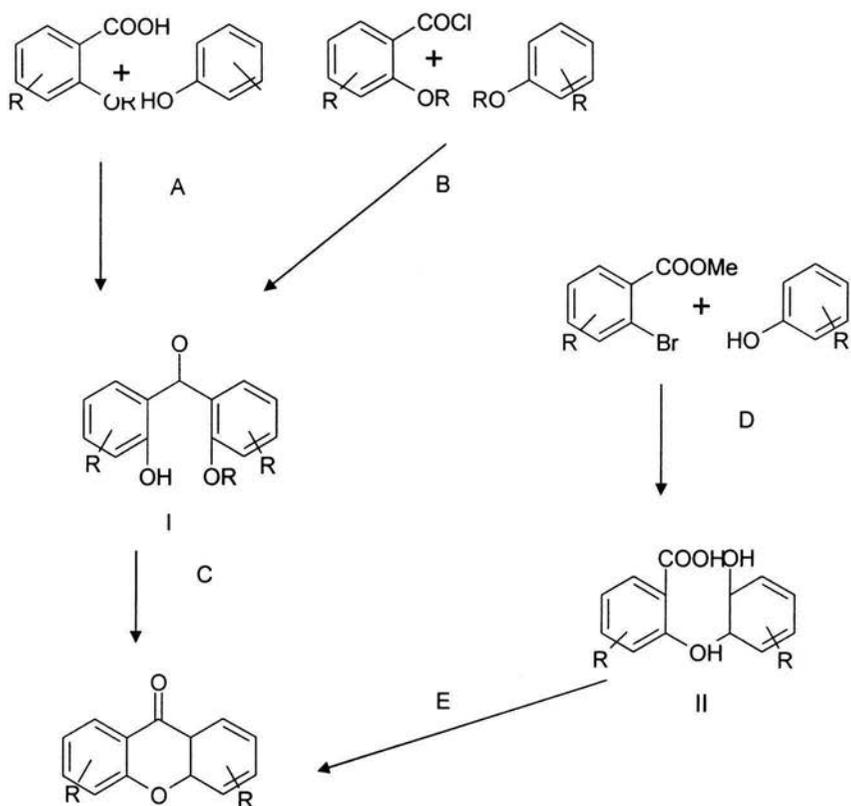


Figura No. 10. Métodos generales de síntesis de las xantonas (Pedro y col. 2002).

#### 4.10. XANTONAS CITOTÓXICAS.

Las xantonas pueden presentar una amplia variedad de sustituyentes alrededor de su núcleo base, ya sea aislados de productos naturales o bien, a través de síntesis química. Dentro de este grupo de xantonas sustituidas se ha reportado que, aquellas que presentan como sustituyente grupos prenilo e hidroxilo demuestran una mayor actividad citotóxica en líneas celulares tumorales. Por ejemplo, Sordat-Diserens y col. <sup>(58)</sup> demostraron la existencia de la xantona prenilada conocida como 4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dienil)-1,3,5-trihidroxi-9H-xanton-9-ona (Figura No. 11), obtenida de un extracto de la especie *Garcinia livingstonei* de la familia *Guttiferae* y los experimentos de

citotoxicidad en células SW480 y SW680 determinaron la  $IC_{50}$  en 1.5  $\mu M$  y 12.8  $\mu M$  respectivamente.

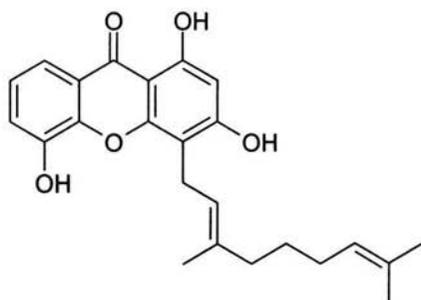


Figura No. 11. Estructura de la 4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dienil)-1,3,5-trihidroxi-9H-xanton-9-ona aislada de *Garcinia livingstonei*.

Dentro de la misma familia (*Guttiferae*), se ha encontrado una gran diversidad de xantonas potencialmente citotóxicas como el caso de la tropezifolixantona y la manglexantona (Figura No. 12) ambos compuestos provenientes de la raíz de *Tovomita brevistaminea*, especie distribuida en Brasil. Estos dos compuestos demostraron poseer una actividad citotóxica en células KB con una  $IC_{50}$  de 10.0 y 4.6  $\mu M$  respectivamente (54,55).

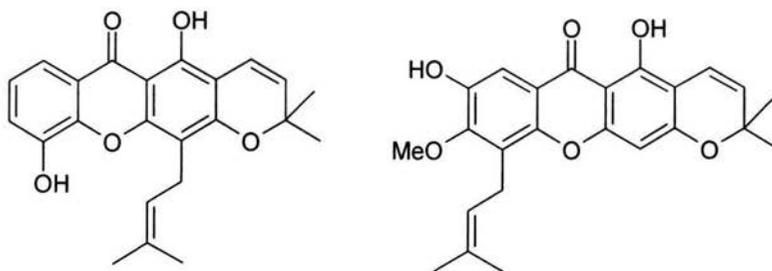


Figura No. 12. Estructura de la tropezifolixantona y la manglexantona aisladas de *Tovomita brevistaminea*.

Por otro lado Ho y col. <sup>(25)</sup> aislaron y caracterizaron seis xantonas provenientes de *Garcinia mangostana* donde al menos una de ellas, la garcinona E, resultó poseer una actividad citotóxica importante en un panel de catorce líneas celulares tumorales incluyendo cinco líneas celulares de carcinoma hepatocelular, este compuesto exhibe un patrón de sustitución de grupos prenilo en las posiciones 2,5 y 8 además de un patrón de hidroxilación en las posiciones 1, 3, 6 y 7 (Figura No. 13). Sus experimentos evidenciaron entonces que, las líneas más sensible fueron HCC36 y NUGC-3 con una IC<sub>50</sub> de 4.1 μM y 0.4 μM respectivamente.

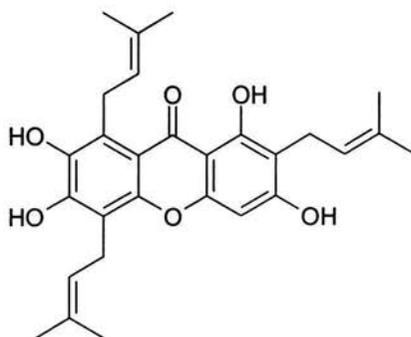


Figura No. 13 Estructura de la garcinona E proveniente de *Garcinia mangostana*.

Posteriormente Pedro y col. <sup>(42)</sup> estudiaron el efecto de veintisiete xantonas en el crecimiento de tres líneas celulares tumorales (MCF-7, TK-10, UACC-62) y observaron que la naturaleza de los sustituyentes alrededor del núcleo base de las xantonas poseía un efecto significativo sobre la proliferación en dichas líneas, además, demostraron que los compuestos 1,2-dihidroxixantona, 3,4-dihidroxixantona y 2,3-dihidroxi-4-metoxixantona fueron las más activas en la línea UACC-62. Entre otros estudios Odile Tholson y col. <sup>(40)</sup> llevaron a cabo el aislamiento y ensayos de citotoxicidad para seis xantonas preniladas provenientes de *Garcinia bracteata* y afirmaron que todos las

xantonas eran altamente citotóxicas cuando fueron probadas en la línea celular KB siendo la bractactina el compuesto más activo con una  $IC_{50}$  de  $1.4 \mu M$  (Figura No.14 ).

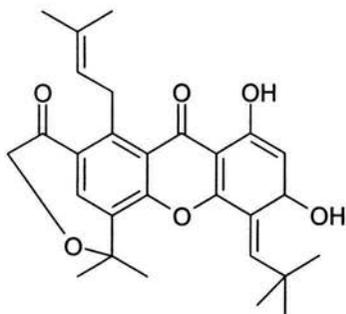


Figura No. 14 Estructura de la bractactina proveniente de *Garcinia bracteata*.

Análogamente Seo y col. <sup>(54,55)</sup> también encontraron que las xantonas aisladas provenientes de *Cratoxylum sumatranum*, especie perteneciente a la familia *Guttiferae*, presentaron actividad citotóxica en la línea celular KB, donde el compuesto más activo reportado fue la 1, 3, 5, 7-tetrahidroxi-2,8-diisoprenilxantona conocida también como cratoxiarborona B (Figura No. 15) con una  $IC_{50}$  de  $2.5 \mu M$ . Resulta evidente que, tanto el patrón de hidroxilación como de los grupos prenilo alrededor de la estructura base de las xantonas es determinante para exhibir una alta actividad citotóxica.

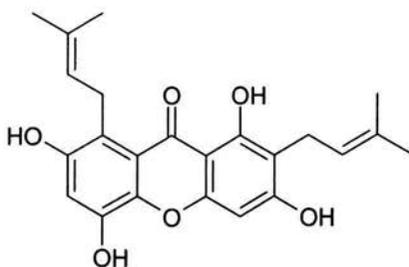


Figura No. 15 Estructura de la cratoxiarborona B, proveniente de *Cratoxylum sumatranum*.

*Allanbackia floribunda* es una especie que también pertenece a la familia *Guttiferae* y se encuentra ampliamente distribuida en las costas del oeste de África, los extractos obtenidos de diversas partes de la especie han sido utilizados en países como Camerún, Gabón y Congo para el tratamiento de padecimientos múltiples, entre estos la disentería y diarrea. Nkengfack y col. <sup>(39)</sup> determinaron que, uno de sus componentes principales la 1, 3, 5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-4-(1,1-dimetilprop-2-enil) xantona denominada allanxantona A (Figura No. 16) poseía actividad citotóxica en la línea celular KB, revelando una IC<sub>50</sub> de 41.5 µM.

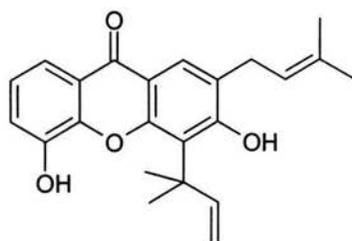


Figura No. 16 Estructura de la 1, 3, 5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-4-(1,1-dimetilprop-2-enil) xantona (allanxantona A).

Aunado a estos estudios podemos mencionar otras xantonas citotóxicas como la 1,8-dihidroxi-3-(3,7-dimetil-7-metoxi-octa-2-eniloxi)-6-metilxantona (Figura No. 17) aislada de *Vismia guineensis* <sup>(6)</sup> o la  $\alpha$ -mangostina (Figura No. 18) aislada de *Garcinia mangostina* la cual reportó una IC<sub>50</sub> de 10 µM en células de leucemia <sup>(34)</sup>.

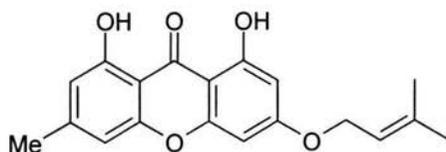


Figura No. 17 Estructura de la 1,8-dihidroxi-3-(3,7-dimetil-7-metoxi-octa-2-eniloxi)-6-metilxantona proveniente de *Vismia guineensis*.

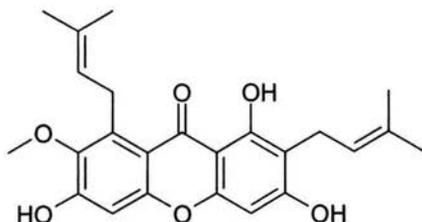


Figura No. 18 Estructura de la  $\alpha$ -mangostina aislada de *Garcinia mangostina*.

#### 4.11. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR XANTONAS

Muchos nuevos compuestos catalogados como posibles agentes quimioterapéuticos en contra de diversos tipos de cáncer han demostrado llevar a cabo su acción a través de la respuesta apoptótica <sup>(74)</sup>. La apoptosis de las células tumorales es provocada por una variedad de factores intra y extracelulares incluyendo citocinas, genes supresores tumorales, oncogenes, radiación y fármacos anticancerígenos <sup>(35)</sup>.

La apoptosis es un proceso altamente organizado donde la célula muere y presenta características que le permite ser diferenciada de otros tipos de muerte, como son: la disrupción del citoesqueleto, modificación de la membrana celular, alteración nuclear (condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del ADN), alteraciones de volumen celular, la pérdida del potencial de membrana, la activación de la caspasa 3, entre otras características propias de este tipo de muerte <sup>(74)</sup>. La señal apoptótica así como la ejecución del programa de muerte requiere de la activación de una serie de caspasas (proteasas específicas de cisteinil-aspartato), su activación involucra un proceso proteolítico entre los tres dominios que conforman a estas enzimas

y es la activación de la caspasa tres la que es considerada como el principal efector de la apoptosis<sup>(35)</sup>.

Se han encontrado reportes en la literatura que señalan cómo algunas xantonas median su actividad citotóxica a través de la activación del programa de muerte; diversos tipos de experimentos han reiterado algunas de las características de la apoptosis. Específicamente en la familia *Guttiferae*, la evidencia señala a la apoptosis como el proceso por el cual las células cancerígenas mueren después de ser expuestas a xantonas aisladas de especies propias de esta familia<sup>(41)</sup>.

La gaudichaudiona A (Figura No. 19.1) una xantona prenilada citotóxica obtenida de la especie *Garcinia gaudichaudii* presentó un efecto inhibitorio en células Jurkat de leucemia y se registró una variedad de eventos apoptóticos que llevó Wu y col.<sup>(74)</sup> a plantear que dicho compuesto ejerce su efecto a través de la inducción de la apoptosis. Otro caso similar se encontró en la especie *Garcinia mangostana*, esta se distribuye en el sureste de Asia, los estudios fitoquímicos han indicado la presencia de una amplia variedad de metabolitos activos, entre estos se encuentran las xantonas preniladas. El aislamiento, la caracterización así como los ensayos de citotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales humanas (K562, NB4, U937, HL60) para otra xantona conocida como  $\beta$ -mangostina (Figura No. 19.2) contenida en la misma especie *Garcinia mangostana*, llevaron a Matsumoto y colaboradores en el 2003<sup>(35)</sup> a demostrar la inducción de la apoptosis en una línea de leucemia humana (HL60) después de un periodo de 72 horas de exposición.

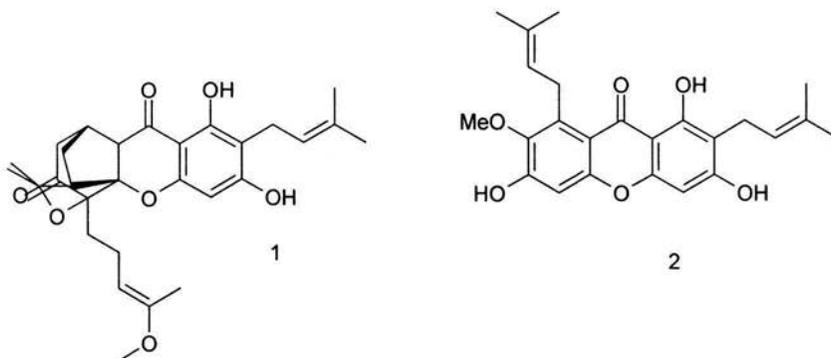


Figura No. 19 Estructuras de la gaudichaudiona A (1) y  $\alpha$ -mangostina (2).

Los experimentos de fragmentación internucleosomal del ADN en ensayos de electroforesis, la activación de la caspasa 3 revelada a través de Western blot, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial por la apertura de canales iónicos así como la exposición de la fosfatidil serina en la membrana celular son solo algunos ejemplos de los experimentos que se han llevado a cabo para indicar como estas dos xantonas inducen una respuesta apoptótica en las líneas celulares tumorales. Aunado a estos estudios, cabe mencionar que los efectos inhibitorios en la topoisomerasa I, la esfingomielinasa ácida y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa registrados para la  $\alpha$ -mangostina, forman parte de la evidencia para demarcar a este tipo de compuestos como potentes inductores de la apoptosis<sup>(35)</sup>. Estas observaciones y algunos otros estudios que se realizan actualmente, ayudaran a elucidar el mecanismo preciso por el cual estas xantonas propician la activación del programa de muerte.

#### 4.12 TÉCNICAS PARA MEDIAR VIABILIDAD CELULAR

Los métodos para medir la viabilidad son diversos y pueden ser rápidos, generalmente basados en la integridad de la membrana celular por exclusión o captura de colorantes

(como el caso de la exclusión de azul de tripano o eritrosina, y la captura de diacetilfluoresceína) o por inclusión y retención de iones radiactivos ( $^{51}\text{Cr}^{3+}$ )<sup>(20)</sup>.

Los ensayos que se utilizan para medir la viabilidad después de la exposición de células a un compuesto citotóxico no pueden estar completamente basados en la integridad de la membrana puesto que estos ensayos se realizan a tiempos dónde las células muertas podrían haber desaparecido a causa de una ruptura. En su lugar se utilizan ensayos indirectos los cuales se clasifican en dos tipos, los metabólicos y los de sobrevivencia<sup>(20)</sup>. Para el caso de los ensayos metabólicos, estos miden la capacidad de la célula de seguir realizando síntesis de ADN (que se puede medir utilizando timidina- $^3\text{H}$ ), de proteínas (por el método colorimétrico de la sulforrodamina B, utilizando aminoácidos radiactivos) o midiendo la capacidad de realizar respiración aeróbica (ensayo del MTT). Los ensayos de sobrevivencia miden la capacidad de la célula de seguir proliferando después del tratamiento (ensayo clonogénico)<sup>(20)</sup>.

Estos ensayos *in vitro* presentan limitaciones debido a que la toxicidad que se mide es solo un evento celular además de ser sobrestimada en ocasiones y solo pueden ser extrapolados con precaución a situaciones *in vivo*. De los ensayos clonogénicos se concluyó que estos no son específicos en predecir la utilidad de la radiación en los animales que poseían el tumor y se demostró que estos ensayos no son infalibles, pero eso no significa que el ensayo no es eficaz sino que es útil en ciertas condiciones<sup>(70)</sup> lo cual podría ser el caso para todos los métodos utilizados para medir la viabilidad celular.

#### 4.13 TÉCNICA DEL MTT.

La técnica del MTT es una de las más utilizadas y provee una forma rápida y fácil de medir la viabilidad celular <sup>(11)</sup>, se basa en la capacidad de las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (Figura No. 21) (MTT) soluble en agua y de color amarillo, a un compuesto insoluble en agua y de color púrpura (formazán del MTT) (Figura No. 22), de este modo la reducción del MTT es directamente proporcional a la cantidad de células viables <sup>(2,45)</sup>.

Utilizando homogeneizados de hígado de rata se descubrió que la reducción del MTT se lleva a cabo en la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona en conjunto con los citocromos b y c; a pesar de que no existe suficiente evidencia para afirmar que sea la mitocondria el único sitio donde se efectúa la reducción del MTT, puesto que este compuesto también acepta electrones de substratos reducidos y coenzimas tales como el NADH y NADPH <sup>(68)</sup>.

La técnica se utiliza principalmente para medir la viabilidad celular después de un tiempo de exposición a un compuesto con posible actividad citotóxica, para esto se agrega un número de células apropiado en placas de cultivo y cuando se alcanza la fase de crecimiento exponencial, se agrega el compuesto a las células. Al adicionar el MTT, se deben incubar las placas por lo menos cuatro horas para permitir la reducción del MTT de manera proporcional al número de células viables.

El formazán formado se extrae de las células utilizando DMSO y se lee la absorbancia a 540-570 nm. Aunque los solventes que se utilizan para disolver el formazán son varios (HCl en isopropanol 0.4 N, dimetilformamida, hexano, propilenglicol y DMSO), el DMSO es el más conveniente para este ensayo debido a que la extracción del formazán de las células es rápida y completa, ya que no se necesita un método de lisis, la solución

además es estable por más tiempo y la absorbancia obtenida con este disolvente es adecuada <sup>(2)</sup>.



Figura No. 21 Estructura química del Bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-4-4)-2,5-difeniltetrazolio.

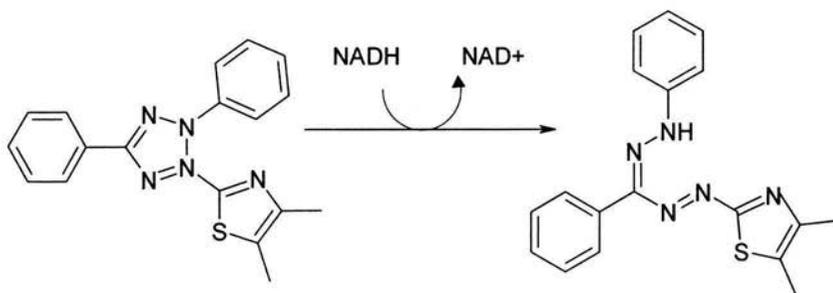


Figura No. 22 Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo tetrazolio el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria <sup>(45)</sup>.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

#### 5.1.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

El extracto metanólico fue obtenido de la madera del duramen de *Calophyllum brasiliense*. La determinación del tipo de compuestos se realizó por comparación en c.c.f. con una muestra auténtica de *C.brasiliense* colectada en la selva Lacandona, Chiapas. Los ejemplares de respaldo están depositados en el herbario del Instituto de Ecología de Xalapa <sup>(63)</sup>.

Se llevaron a cabo además otros 2 extractos en diclorometano-metanol de diferentes partes de *C. brasiliense*, (corteza y hojas del árbol) con la finalidad de observar donde se presenta la mayor cantidad de metabolitos activos. Además se elaboraron dos extractos en dicrometano-metanol de *Garcinia intermedia* (aserrín del tronco y hojas del árbol). Todas estas muestras también fueron proporcionadas por el laboratorio 210 del Instituto de Química <sup>(46)</sup>.

Los extractos fueron identificados como:

Extracto A) corteza del tronco de *Calopyllum brasiliense*.

Extracto B) hojas del árbol de *Calophyllum brasiliense*.

Extracto C) aserrín del tronco *Garcinia intermedia*.

Extracto D) hojas del árbol *Garcinia intermedia*.

Estos extractos a pesar de que no fueron separados por métodos cromatográficos se probaron suponiendo una actividad citotóxica por la variedad de compuestos que presentan estas dos especies.

### 5.1.2. EXTRACTOS A, B, C, D.

Se utilizaron 51.70, 50.89, 51.71 y 53.00 g de las muestras A, B, C, D. Dichas muestras fueron cortadas en pequeñas fracciones con la finalidad de aumentar la superficie de contacto entre el disolvente y la muestra para mejorar la extracción. Se realizaron extracciones a temperatura ambiente durante una semana con la mezcla de disolventes diclorometano- metanol (1:1), posteriormente los extractos fueron concentrados al vacío en un aparato de rotación /evaporación (Büch).

### 5.1.3 INSTRUMENTACIÓN Y CROMATOGRAFÍA.

El extracto metanólico se separó en sus diferentes componentes utilizando cromatografía en columna (c.c.) y cromatografía en capa fina (c.c.f.). En la separación cromatográfica se utilizó como absorbente gel de sílice 60 (Merk) y como eluyentes se emplearon disolventes orgánicos como hexano, acetato de etilo y metanol. Para realizar la cromatografía en capa fina se emplearon cromatofolios de sílica gel de 0.25 mm de espesor (Merck). La pureza de los compuestos así como el curso de las reacciones de acetilación y metilación fueron observadas por c.c.f. Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 1N.

El Rf (frente de referencia) de los compuestos aislados se determinó con la finalidad de identificarlos, donde el Rf se calculó de acuerdo a:

$$R_f = (\text{Distancia recorrida por el compuesto} / \text{Distancia recorrida por el disolvente}).$$

Las constantes físicas y los datos espectrocópicos que sirvieron para la identificación de los compuestos aislados, fueron obtenidos como se indica a continuación:

- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns.
- Los Rf. Se identificaron en cromatofolios de fase normal, gel de sílice (Merck) con ayuda de referencias caracterizadas previamente <sup>(18)</sup>.
- En el caso de los espectros de U.V. se utilizó una lámpara de rayos U.V. marca P. Elmer.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (HRMN) se realizaron en los espectrofotómetros Gemini 200 (200 MHz) y Varian Unity 300 (300 MHz).

#### 5.1.4 AISLAMIENTO DE XANTONAS A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

Para el aislamiento de las xantonas se emplearon básicamente dos técnicas :

- Cromatografía en columna
- Recristalización por disolventes.

En el primer caso, se empleó gel de sílice (1.0 Kg) en una columna de 1.5 m de altura y de 7 cm de diámetro. Para montar la columna con la gel de sílice y adicionar el extracto en la parte superior de la sílice se empleó hexano; de tal forma que la fase móvil primeramente fue hexano.

Se colectaron 560 fracciones de 500 mL por cada una. A estas fracciones se les redujo el volumen en un aparato de rotación/evaporación hasta disminuir la cantidad del disolvente a 5 mL. Una vez que estas fracciones eran etiquetadas e identificadas se llevó

a cabo el monitoreo de los compuestos eluidos a través de cromatografía en capa fina (fase normal) utilizando distintos sistemas de disolventes.

En cada cromatoplaque se empleaban estándares de xantonas previamente identificadas y caracterizadas correspondiendo entonces con los siguientes compuestos:

- a)  $\beta$ -sitosterol
- b) Xantona I
- c) Xantona III
- d) Xantona IV
- e) Xantona V
- f) Xantona VI

#### 5.1.5. EXTRACTO METANÓLICO DE *Calophyllum brasiliense*.

El extracto de *Calophyllum brasiliense* de carácter metanólico del cual se obtuvieron las xantonas, fue previamente preparado del duramen del mismo árbol, su identificación se realizó por comparación en c.c.f. con una muestra auténtica de *C. brasiliense* colectada en la selva Lacandona, Chiapas. Los ejemplares de respaldo están depositados en el Herbario del Instituto de Ecología A.C. de Xalapa <sup>(63)</sup>. Se tomaron 74.1 g del extracto, se preabsorbieron en celita y se colocaron en una columna de vidrio empacada como ya se mencionó.

Las fracciones 1-18 mostraron un  $R_f$  similar, se trataba de un líquido claro, translúcido, viscoso, de olor característico. Estos compuestos corresponden a sustancias altamente apolares que se cree, forman parte de algunos terpenos, sin embargo no han sido identificados plenamente.

En las fracciones 19-35 donde la fase móvil correspondió a una mezcla de Hexano – acetato de etilo (9:1), precipitó un sólido blanquecino el cuál fue identificado como  $\beta$  sitosterol con ayuda de la referencia del mismo compuesto en c.c.f.

En las fracciones 36-137 eluidas con hexano – acetato de etilo (8:2), precipitó un sólido amarillo que fue identificado como mezcla de  $\beta$ -sitosterol y xantona I a través de c.c.f.

En las fracciones 138-227 eluidas con hexano – acetato de etilo (7:3), precipitó un sólido amarillo que fue identificado como una mezcla de las xantonas III, IV y V a través de c.c.f.

En las fracciones 228-341 eluidas con un sistema de hexano – acetato de etilo (1:1), precipitó un sólido amarillo que fue identificado como mezcla de las xantonas V y VI a través de c.c.f.

En las fracciones 342-365 eluidas con un sistema de hexano – acetato de etilo (2:8) precipitó un sólido amarillo oscuro que contenía a la xantona VI, este compuesto fue identificado a través de c.c.f., punto de fusión y HRMN.

Las fracciones 366-452 fueron eluidas con acetato de etilo, precipitó un sólido amarillo oscuro que además de contener a la xantona VI, se demostró en c.c.f. una variedad de otros compuestos que no han sido identificados.

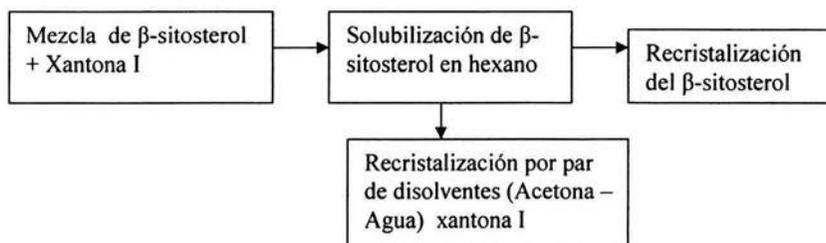
Las fracciones 453-586 fueron eluidas con un sistema de disolventes de acetato de etilo – metanol (1:1), en estas se precipitó un sólido oscuro que contiene a los mismos compuestos que las fracciones anteriores, demostrado a través de c.c.f.

#### 5.1.6. SEPARACIÓN DEL $\beta$ -SITOSTEROL Y XANTONA I

Con la finalidad de llevar a cabo la separación de la xantona I y el  $\beta$ -sitosterol proveniente de las fracciones 36-137 de cromatografía en columna, se decidió llevar a cabo una recrystalización por disolventes de la siguiente manera:

- 1) A la mezcla de la xantona I y del  $\beta$ -sitosterol se le adicionó hexano y parte de esta se disolvió.
- 2) A la fracción disuelta se le evaporó el hexano y se obtuvo el  $\beta$ -sitosterol, identificado por c.c.f.
- 3) La fracción que no se solubilizó en hexano, fue secada y se le adicionaron 2 mL de acetona hasta su disolución.
- 4) A esta fracción se le practicó una recrystalización con agua helada y se identificó la xantona I en c.c.f.

Diagrama 1. Separación del  $\beta$ -sitosterol y xantona I.

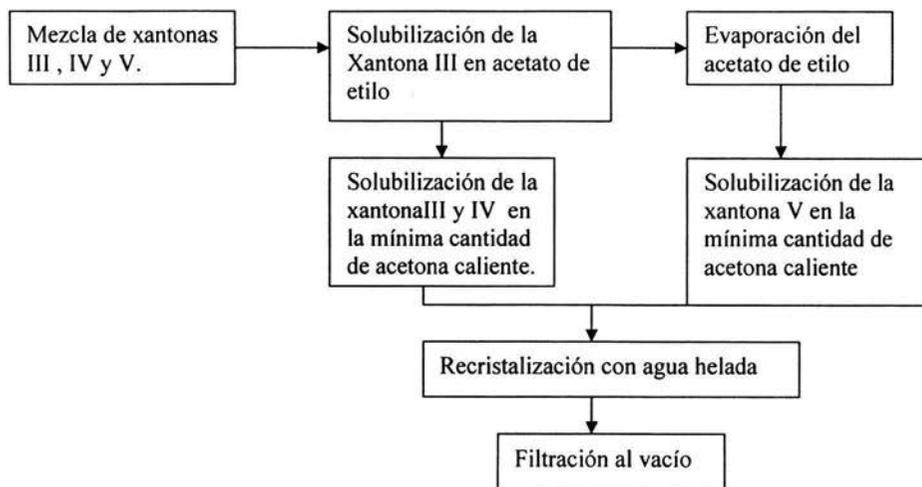


### 5.1.7. SEPARACIÓN DE XANTONA III, IV Y V.

Con el objetivo de separar las xantonas III y IV e identificarlas a través de su punto de fusión y su espectro de resonancia magnética nuclear protónica (HRMN), de las fracciones 138-227 colectadas se decidió llevar a cabo una recristalización por disolventes de la siguiente manera:

- 1) A la mezcla de las xantonas se le adicionó acetato de etilo y una parte se disolvió.
- 2) A la fracción solubilizada se le evaporó el disolvente y se disolvió en 2 mL de acetona caliente, se le practicó una recristalización con agua helada, se filtró al vacío y se identificó a la xantona V por c.c.f.
- 3) El precipitado del punto 1) se disolvió en 2 mL de acetona caliente, se le practicó una recristalización con agua helada, se filtró al vacío y se identificaron a las xantonas III y IV.

Diagrama 2. Separación de las xantonas III y IV.



Nota: La xantona III y V pudieron ser purificadas completamente pero no pudo ser separada plenamente la xantona IV.

## 5.2. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS XANTONAS

Como parte adicional del presente trabajo, se llevó a cabo una modificación y una comparación de la citotoxicidad entre las xantonas aisladas de *Calophyllum brasiliense* con sus homólogos acetilados y metilados. La finalidad de esta comparación fue identificar los sustituyentes que le confieren mayor actividad a este tipo de compuestos.

### 5.2.1. ACETILACIÓN DE LA XANTONA III

De la xantona III se pesaron 240 mg, se disolvieron en 2 mL de piridina y 3 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 24 horas, el progreso de la reacción fue monitoreado por c.c.f. y finalizado el tiempo, la reacción se detuvo adicionando 50 mL de agua destilada, obteniéndose así, un sólido el cual fue filtrado y lavado con HCL al 10%. El rendimiento de la reacción se estableció

en 86.9 % y el sólido recristalizado en una mezcla de diclorometano-metanol formó cristales de color amarillo que fueron identificados como 5,6-diacetil-jacuberina (IIIa) (Figura No. 23).

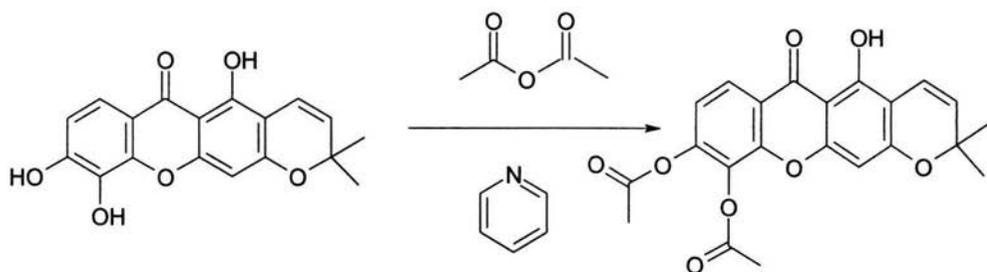


Figura No. 23 Reacción de acetilación para la xantona III

#### 5.2.2. ACETILACIÓN DE LA MEZCLA III Y IV.

Debido a que la xantona IV nunca pudo separarse de la xantona III se decidió llevar a cabo una acetilación de la mezcla que contenía a los dos compuestos, de esta forma una vez modificados se logró la separación dado el cambio de polaridad en los compuestos. Para ello se utilizaron 200 mg de la mezcla de las xantonas III y IV, el procedimiento fue el mismo descrito en la acetilación de la xantona III. Se obtuvo así, un sólido de color amarillo pardo el cual se recristalizó en un sistema de acetona-metanol, parte de esta mezcla fue caracterizada por HRMN como 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa), mientras que la otra parte resultó ser una mezcla de los dos compuestos.

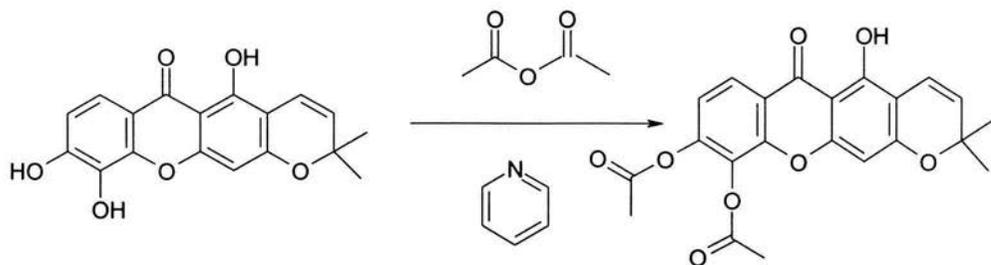


Figura No. 24. Reacción de acetilación para la xantona III.

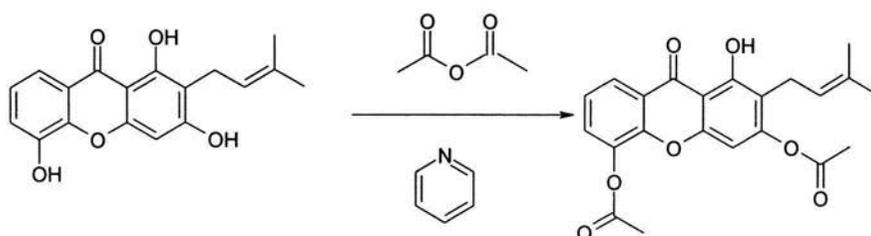


Figura No. 25. Reacción de acetilación para la xantona IV

### 5.2.3. METILACIÓN DE LA XANTONA III.

Para este caso se utilizaron 360 mg de xantona III, se disolvieron en 10 mL de acetona anhidra y se adicionó 1 mL de sulfato de dimetilo junto con 500 mg de carbonato de sodio anhidro; se llevó a cabo un monitoreo por c.c.f. y se dejó en reflujo y agitación constante durante 24 horas. Al término de este tiempo se detuvo la reacción empleando 40 mL de agua destilada. Se practicó una extracción con acetato de etilo, se secó y recristalizó. El rendimiento de la reacción fue estimado en 75.45%. Los cristales obtenidos fueron identificados como xantona III<sub>m</sub> (Figura No. 26).

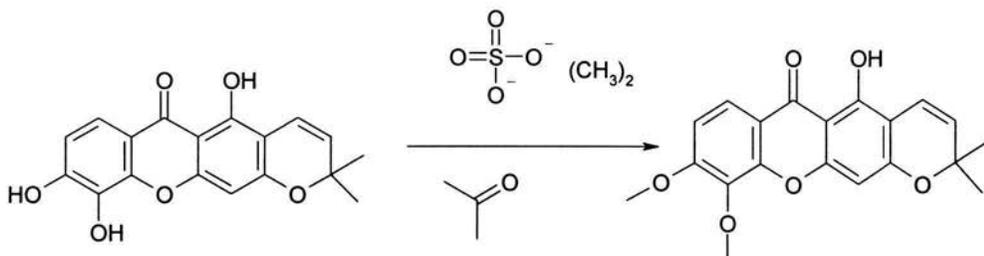


Figura No. 26. Reacción de metilación para la xantona III.

#### 5.2.4. METILACIÓN DE LA XANTONA V

La metilación de la xantona V se efectuó de la siguiente manera. Se pesaron 530 mg de la xantona V se disolvieron en 10 mL de acetona anhidra, se adicionó 1 mL de sulfato de dimetilo y 500 mg de carbonato de sodio anhidro, se llevó a cabo un monitoreo por c.c.f., se dejó en reflujo y agitación constante durante 24 horas. Al término de este tiempo se detuvo la reacción con 40 mL de agua destilada. Se practicó una extracción con acetato de etilo, se seco y recristalizó. El rendimiento de la reacción se estableció en 73.61 % y una vez recristalizado el sólido se identificó a través del punto de fusión y de HRMN como 1-hidroxi-3, 5, 6-trimetoxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (Va).

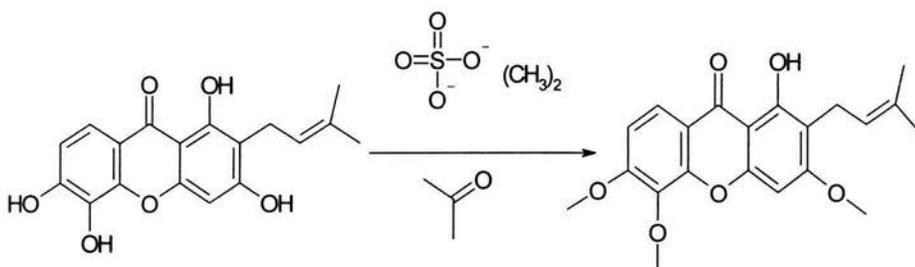


Figura No. 27 Metilación de la xantona V

### 5.3. CITOTOXICIDAD

#### 5.3.1. LÍNEAS CELULARES Y SU MANTENIMIENTO.

Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes:

- HeLa: Esta línea celular proviene del adenocarcinoma de cérvix de una mujer negra de 31 años de edad, crece de forma adherente y posee la secuencia para el virus del papiloma humano 18.
- SW480: Esta línea celular proviene de adenocarcinoma colorrectal, fue aislada por Leibovitz, es tumorigénica en ratones desnudos y produce el antígeno carcinoembrionario. Su morfología es epitelial.
- MCF-7: Esta línea fue aislada de adenocarcinoma de glándula mamaria que expresa el receptor a estrógenos. Proviene de una mujer caucásica de 69 años.
- K562: Esta línea celular de leucemia mielogénica crónica humana fue obtenida de la pleura de una mujer de 59 años en fase terminal.
- HCT-15: Esta línea celular fue aislada de adenocarcinoma de colon humano por Dexter y asociados durante el periodo de 1977-1979.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio D-MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado.

#### 5.3.2. DESCONGELAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

- a) Se preparó el medio de cultivo D-MEM y se atemperó aproximadamente a 37 °C antes de ser usado. Se colocaron 8 mL en una caja Petri de 5 cm de diámetro rotulada.

- b) Se sacó un criotubo del banco de células contenidas en nitrógeno líquido y se descongeló con ayuda de la temperatura corporal.
- c) Se agregó el contenido del criotubo en la caja Petri y se distribuyó el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incubó a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> por dos horas o hasta que las células se adhirieron a la superficie de la caja Petri.

### 5.3.3. PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Se observó el cultivo celular en un microscopio invertido, después de su descongelamiento, con la finalidad de observar el grado de confluencia el cual fue de 80-90%, y no contenía detritus.

Para subcultivar las células:

- a. Se aplicaron movimientos circulares suaves a la caja y el sobrenadante se decantó o se succionó con ayuda de una pipeta Pasteur.
- b. Se llevó a cabo un lavado con PBS-EDTA y se decantó una vez más el sobrenadante. Este procedimiento se repitió cada vez que fue necesario.
- c. Se adicionó PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular formada en el fondo de la caja Petri y se incubó a 37° C por 5 ó 10 minutos.
- d. Concluido el tiempo de incubación se desprendieron las células con ayuda de una pipeta Pasteur y vertiendo el PBS-EDTA hasta observar turbidez en la suspensión celular.
- e. Se disgregaron las células desprendidas succionando y expulsando suavemente la suspensión hasta obtener células individuales, esto se comprobó observando al microscopio.

- f. Se adicionó una alícuota de la suspensión celular en una caja Petri con medio de cultivo fresco y se distribuyó uniformemente por medio de movimientos circulares.
- g. Se dejó que las células sedimentaran aproximadamente 10 minutos en una superficie horizontal y se incubó a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda.

#### 5.3.4. CRIOPRESERVACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

La línea de cultivo que se requirió congelar debió poseer una confluencia alta y se realizaron los pasos a.-f. de la sección anterior, una vez hecho esto se procedió de la siguiente manera:

- a) La suspensión celular se colectó con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de centrifuga. Se centrifugó la suspensión celular a 2000 r.p.m. durante 5 minutos.
- b) Con el botón celular en el fondo del tubo, se decantó el PBS-EDTA y se resuspendió el botón con el PBS-EDTA residual con ayuda de suaves golpes al tubo.
- c) Se adicionaron 4.5 mL de medio de congelamiento por cada caja de cultivo cosechada y se homogenizó con una pipeta Pasteur para lograr así, una suspensión celular uniforme,
- d) Se alícuotó la suspensión en criotubos.
- e) Se congelaron los criotubos en posición vertical a -70 ° C por 2-4 horas.
- f) Se introdujeron los criotubos en nitrógeno líquido.

#### 5.3.5. CONTEO CELULAR EN LA CÁMARA DE NEWBAUER.

- a) La cámara de Newbauer se limpió con etanol al 70 % antes de ser usada, se secó y se colocó en una superficie horizontal.
- b) Se tomó una alícuota de la suspensión celular de 10  $\mu\text{L}$  y se colocó en la cámara de Newbauer.
- c) Se colocó sobre el microscopio la cámara de Newbauer y se contaron las células localizadas en los 8 cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos.
- d) Cuando se obtuvo el promedio de las ocho cuadrículas se aplicó la siguiente fórmula:

$$S = (P) (1 \times 10^4)$$

Donde:

S = células en un mililitro de suspensión

P = Promedio de células encontradas en los 8 cuadrantes de la cámara de Newbauer.

Al obtener el número de células por mL se pudo calcular el volumen de suspensión adecuado para agregar en cada pozo aproximadamente 5000 células y se realizó el ensayo de citotoxicidad.

#### 5.3.6. EXPOSICIÓN AL COMPUESTO DE PRUEBA.

Todos los procedimientos se realizaron dentro de la campana de flujo laminar excepto el conteo celular. Todo el material utilizado fue estéril y limpio. Se contó con un cultivo de confluencia alta (80-90%) y se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Se atempero el medio de cultivo y el PBS-EDTA.
- b) Se decantó el medio de cultivo de la(s) caja(s) Petri que contenía(n) la línea celular.
- c) Se agregó el PBS-EDTA para lavar las células y se decantó. El procedimiento se repitió dos veces más

- d) Se agregó mas PBS-EDTA, suficiente para cubrir las células en la(s) caja(s) Petri y se incubó por un periodo de 10 a 15 minutos a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda.
- e) Con una pipeta Pasteur se resuspendió el PBS-EDTA para desprender las células que se encontraban adheridas. Se resuspendieron de 15 a 20 veces más hasta que, la suspensión fue homogénea y las células se encontraban disgregadas en forma individual.
- f) Se realizaron las diluciones pertinentes con medio de cultivo, homogenizando la suspensión celular y se contaron en la cámara de Newbauer.
- g) Se agregaron aproximadamente 5000 células por cada pozo en una placa de cultivo de 96 pozos utilizando un volumen de suspensión celular menor o igual a 200 µL por cada uno.
- h) Se agregó medio de cultivo c.b.p. 200 µL, se rotuló la placa e incubó a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda por 24 horas.
- i) Al término de la incubación se agregó el compuesto de prueba, el cual se diluyó con medio de cultivo o PBS de tal manera que se agregaron 50 µL más por cada pozo para completar 250 µL por pozo y así obtener la concentración deseada.
- j) Se incubó por 48 horas a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda.
- k) Al finalizar la incubación se midió la viabilidad por la técnica del MTT.

#### 5.3.7. TÉCNICA DEL MTT.

- a) A la placa de cultivo se le adicionó una alícuota de 30 µL del reactivo de MTT y se homogenizó con una micropipeta.
- b) Se incubaron las células en contacto con la solución de MTT por un mínimo de 4 horas. Al cabo de este tiempo se redujó el MTT.

- c) Se removió el medio con el exceso de MTT decantando la placa, se resuspendieron los cristales de formazán sedimentados en el fondo de la caja con 250  $\mu$ L de DMSO.
- d) Se leyeron las placas con un lector de Elisa con un filtro de 550 nm.

El porcentaje de células vivas se calculó con respecto a un control negativo utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - (x) (100)/\text{CN}$$

Donde:

X = lectura en espectrofotómetro a 550 nm del problema.

CN = lectura en espectrofotómetro a 550 nm del control negativo.

#### 5.4. SOLUCIONES

A continuación se menciona el material, los reactivos y los procedimientos que se siguieron para preparar las soluciones mencionadas anteriormente.

##### 5.4.1. REACTIVO DE MTT

Se preparó la solución del reactivo de MTT (Sigma) en PBS a una concentración de 5 mg/mL utilizando frascos limpios y estériles.

|             |       |
|-------------|-------|
| MTT (Sigma) | 50 mg |
| PBS         | 10 mL |
| MTT (Sigma) | 50 mg |

- Se pesó el MTT.
- Se disolvió en el PBS-EDTA previamente esterilizado.

- Se llevó a volumen de 10 mL.
- Se conservó el reactivo en refrigeración al abrigo de la luz.

#### 5.4.2. MEDIO DE CULTIVO

|  |               |
|--|---------------|
| Medio D-MEM (Gibco)                    | Un sobre      |
| Antibiótico –antimicótico (Gibco)      | 10 mL         |
| HEPES (Sigma)                          | 2.2 g         |
| L -Piruvato (Gibco)                    | 10 mL         |
| NaHCO <sub>3</sub> (Sigma)             | 3.7 g         |
| Agua desionizada                       | c.b.p. 900 mL |
| Suero fetal bovino inactivado (Gibco ) | 100 mL        |

- Se disolvió el contenido de un sobre de medio de cultivo en 700 mL de agua, se agregaron los reactivos complementarios y se mezclaron con un agitador magnético.
- Se agregó agua desionizada para completar 900 mL .
- Se esterilizó el medio por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 mm.
- Se colocó una alícuota del medio de cultivo en una caja Petri estéril y se incubó a 37 °C como control de esterilidad.
- Se alícuotó el medio de cultivo en botellas de vidrio estériles y se refrigeró.
- Antes de usarse el medio se complementó con 10 % de suero fetal bovino inactivado.
- La caducidad del medio se estableció como máximo de 30 días.

#### 5.4.3. PBS-EDTA.

|  |           |
|--|-----------|
| NaCl (J. T. Baker)                       | 8.00 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)  | 0.24 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma) | 1.44 g    |
| KCl (J. T. Baker)                        | 0.20 g    |
| EDTA disodico (Sigma)                    | 0.37 g    |
| Agua desionizada                         | c.b.p. 1L |

- Se disolvieron las sales en el agua desionizada sin orden especial.
- Se llevó a volumen de 1.0 L
- Se ajustó el pH con una solución 0.1 M de NaOH o de HCl hasta 7.4.
- Se esterilizó en autoclave y se mantuvo en refrigeración.

#### 5.4.4. MEDIO DE CONGELAMIENTO

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Medio de cultivo                      | 80 mL   |
| Suero fetal bovino inactivado (Gibco) | 20 mL   |
| Glicerol estéril (Merck)              | 17.5 mL |

- Se mezclaron todos los ingredientes en un matraz estéril hasta homogenizarlos.
- Se alicuotó en recipientes estériles y se conservó en refrigeración.
- Se descongeló cada vez que se tomó una alícuota.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El cáncer es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial y en nuestro país ocupa un lugar importante dentro de las enfermedades de mayor índice de mortalidad. Una de las principales herramientas con las que se cuenta actualmente para su tratamiento es la quimioterapia. Los fármacos que se utilizan poseen efectos adversos que pueden ser severos, costosos y no siempre se obtienen los resultados deseados. Otro de los problemas que se tiene con el tratamiento de quimioterapia, es el hecho de que algunos tumores presentan mecanismos de resistencia a fármacos, por estos motivos la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales es de gran importancia. Dentro de las fuentes para la obtención de nuevos fármacos, se encuentran los productos naturales, los cuales, se han consolidado en un lugar importante para el tratamiento y terapia contra el cáncer.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron 3 xantonas naturales provenientes de un extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense* previamente preparado, estos compuestos se modificaron estructuralmente y se obtuvieron 4 xantonas modificadas a través de reacciones de acetilación y metilación. Adicionalmente se obtuvieron dos extractos en diclorometano-metanol (1:1) provenientes de *C. brasiliense* y 2 extractos de *Garcinia intermedia* en el mismo sistema de disolventes. A las xantonas y a los extractos se les determinó la actividad citotóxica en las líneas celulares MCF-7, K-562, SW-480, HCT-15, HeLa después de un periodo de exposición de 48 horas.

### 6.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN.

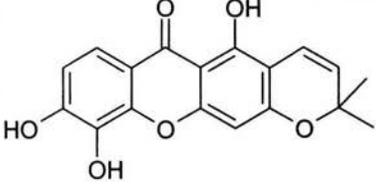
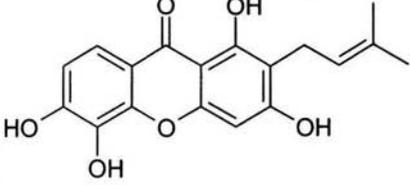
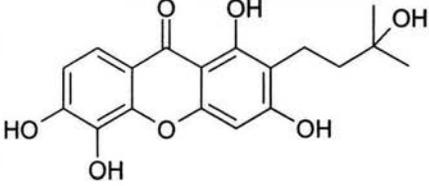
De la madera del duramen de *Calophyllum brasiliense* se obtuvieron cinco xantonas preniladas cuatro en forma pura y una de ellas en mezcla con la xantona III. De estos compuestos la xantona III y V fueron los compuestos mayoritarios con un rendimiento de 7.4 y 5.2 % respectivamente (Tabla No. 1).

Tabla No.1 Rendimiento de las xantonas en el extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*.

| Xantona | Peso (g) | Rendimiento (%) |
|---------|----------|-----------------|
| III     | 5.4835   | 7.4             |
| V       | 3.8532   | 5.2             |
| VI      | 0.5187   | 0.7             |

El análisis espectroscópico así como la comparación con muestras auténticas por cromatografía en capa fina, indican que las xantonas aisladas son de tipo preniladas en la posición 3, donde las xantonas IV, V y VI presentan el sustituyente isoprenilo en forma libre mientras que, en la xantona III se encuentra formando un ciclo con el hidroxilo en posición 3 (Tabla No. 1.1).

Tabla No 1.1 Estructuras y nombres de las xantonas aisladas del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*.

| Estructura  | Nombre  |
|---|---|
|  | Jacaurebina (xantona III)   |
|  | 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona V).         |
|  | 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona (xantona VI). |

Nota: Los datos espectroscópicos se encuentran en el apéndice del presente trabajo.

Por otra parte se utilizaron extractos de las especies *Calophyllum brasiliense* y *Garcinia intermedia* en diclorometano-metanol (1:1) y se determinó que el extracto con mayor rendimiento, bajo las mismas condiciones fue aquel proveniente de la corteza de *Calophyllum brasiliense* (Tabla No. 2).

Tabla No. 2 Rendimiento de los extractos de *Calophyllum brasiliense* y *Garcinia intermedia*.

| Extracto   | Peso (g) | Rendimiento (%) |
|--|----------|-----------------|
| A) corteza de <i>Calophyllum brasiliense</i> .           | 0.5330   | 0.9             |
| B) hojas de <i>Calophyllum brasiliense</i>               | 0.2150   | 0.7             |
| C) aserrín de de la madera de <i>Garcinia intermedia</i> | 0.1205   | 0.5             |
| D) hojas de <i>Garcinia intermedia</i> .                 | 0.0950   | 0.44            |

## 6.2. MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL

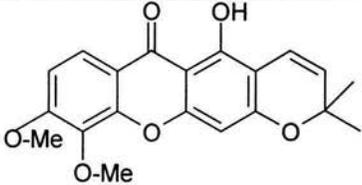
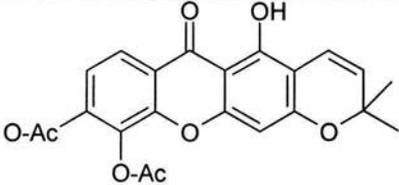
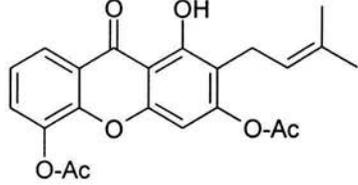
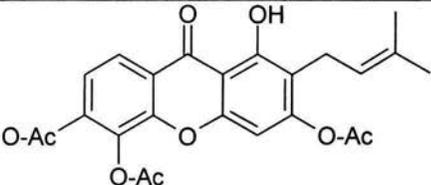
De las reacciones de acetilación y metilación en las xantonas III, IV y V se caracterizaron las xantonas III acetilada, III metilada, IV acetilada y V metilada, por su punto de fusión y su espectro de HRMN; siendo la xantona III acetilada la de mayor rendimiento con un 86.9 % y la xantona IV acetilada la de menor rendimiento con un 44.3 % (Tabla No. 3).

Tabla No. 3 Rendimiento de las reacciones de acetilación y metilación.

| Xantona | Tipo de modificación | Cantidad obtenida (mg) | Rendimiento (%) |
|---------|----------------------|------------------------|-----------------|
| III     | Acetilación          | 208.5                  | 86.9            |
| III     | Metilación           | 271.6                  | 75.45           |
| IV      | Acetilación          | 88.6                   | 44.3            |
| V       | Metilación           | 390.1                  | 73.61           |

La xantona III acetilada muestra un patrón de acetilación en las posiciones 5 y 6 mientras que, la xantona III metilada muestra un patrón de metilación en las mismas posiciones. Por otro lado de una mezcla de xantona III y IV se aisló y caracterizó la xantona IV acetilada, la cual presentó un patrón de acetilación en las posiciones 3 y 5. La xantona V presentó un patrón de hidroxilación en las posiciones 1, 3, 5 y 6 y su producto de metilación demostró tener sustituciones de grupos metilo en las posiciones 3,5 y 6 (Tabla 3.1).

Tabla No. 3.1 Estructuras y nombres de los compuestos modificados estructuralmente.

| Estructura  | Nombre  |
|---|---|
|    | 5,6- dimetil jacuberina (xantona III metilada).                               |
|   | 5,6-diacetyljacauerbina (xantona III acetilada).                              |
|  | 1-hidroxi-3,5-diacetil-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona IV acetilada).    |
|  | 1-hidroxi,3,5,6-trimetoxi-2-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona V metilada). |

Se ha comprobado en muchas ocasiones que la introducción y sustitución de grupos en una molécula además de modificar sus características fisicoquímicas es capaz de provocar un aumento en la actividad biológica, dicho aumento depende del número de átomos de carbono y tipo de sustituyentes, este efecto es provocado por un aumento en la liposolubilidad y por ende en su penetrabilidad a través de la membrana celular o bien por la afinidad del fármaco con su receptor <sup>(4)</sup>, es por ello que se decidió estudiar el cambio en la respuesta citotóxica de las xantonas a través de sustituciones de grupos acetilo y metilo por sus grupos hidroxilo en diferentes posiciones.

### 6.3. CITOTOXICIDAD

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se contó con tres xantonas naturales aisladas y caracterizadas de *Calophyllum brasiliense* xantona III, V y VI. Cuatro xantonas modificadas Xantona III acetilada, III metilada, IV acetilada y V acetilada. Dos extractos en diclorometano-metanol de A) corteza del tronco de *Calophyllum brasiliense* y B) hojas del árbol de *Calophyllum brasiliense*. Dos extractos en diclorometano-metanol de C) aserrín del tronco de *Garcinia intermedia* y D) hojas del árbol *Garcinia intermedia*.

Estos compuestos se probaron en las líneas celulares tumorales de mamífero MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), K-562 (Leucemia mielogénica), SW-480 (adenocarcinoma colorrectal), HCT-15 (adenocarcinoma de colon) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix).

En los experimentos llevados a cabo se utilizaron placas de 96 pozos a las cuales se les agregó el inóculo de células y se incubaron a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda por

24 horas, tiempo suficiente para alcanzar la fase exponencial del crecimiento. Después de este tiempo de incubación se agregaron los compuestos y se incubaron las células por 48 horas, se eliminó el medio con el compuesto y se determinó la viabilidad celular por la técnica de MTT. Como control positivo se utilizó taxol a una concentración de 0.25  $\mu\text{M}$  y como control negativo se usaron células incubadas en ausencia de fármacos.

Las soluciones de las xantonas y sus derivados acetilados y metilados, se disolvieron en DMSO como vehículo. Resultados previos de laboratorio demuestran que el DMSO tiene un efecto inhibitorio sobre las líneas celulares usadas, por lo que la cantidad máxima del DMSO por pozo era menor o igual a 0.2 %. El control disolvente se realizó utilizando una concentración de DMSO = 0.2 %. Las xantonas y sus derivados se probaron a cinco diferentes concentraciones (Tabla No. 4).

Tabla No. 4 Concentraciones de las xantonas y sus derivados.

| Xantona          | C 1 ( $\mu\text{M}$ ) | C 2 ( $\mu\text{M}$ ) | C 3 ( $\mu\text{M}$ ) | C 4 ( $\mu\text{M}$ ) | C 5 ( $\mu\text{M}$ ) |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| III              | 8.7                   | 17.5                  | 34.9                  | 69.9                  | 139.7                 |
| IIIa             | 15.1                  | 30.2                  | 60.3                  | 120.6                 | 241.2                 |
| III <sub>m</sub> | 38.6                  | 77.2                  | 154.4                 | 385.9                 | 482.4                 |
| I <sub>va</sub>  | 26.3                  | 52.2                  | 105.1                 | 210.1                 | 328.2                 |
| V                | 5.77                  | 11.54                 | 23.09                 | 46.18                 | 92.36                 |
| Va               | 16.2                  | 32.4                  | 64.8                  | 129.5                 | 202.4                 |
| VI               | 29.4                  | 58.8                  | 117.6                 | 235.3                 | 367.6                 |

Los extractos fueron probados en las mismas cinco líneas celulares tumorales, usando solamente una concentración 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con la finalidad de llevar a cabo un crecimiento biológico y así poder diferenciar cuales extractos presentaban mayor actividad.

#### 6.4. RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD PARA LAS XANTONAS.

*Calophyllum brasiliense* es una especie que se encuentra difundida en el continente americano, desde el sur de México y a lo largo de América latina, además de que existen reportes que indican a esta especie como una fuente rica en flavonoides, coumarinas, benzopiranos y xantonas <sup>(46)</sup>. Las xantonas aisladas y modificadas provenientes del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*, se obtuvieron basándose en estudios previos que han demostrado que dichos compuestos presentan una actividad citotóxica en diferentes líneas celulares, los cuales pueden ser candidatos para ser empleados en terapias contra diferentes tipos de cáncer.

La xantona III presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales evaluadas, presentando un efecto citotóxico a diferentes concentraciones, después de un periodo de tratamiento de 48 horas (Figura No. 28). De las líneas empleadas MCF-7 resultó ser la más afectada con un  $88.8 \pm 0.2$  % de inhibición a una concentración de  $45.9 \mu\text{M}$ , en tanto que la línea menos sensible fue SW-480 con un porcentaje de inhibición del  $48.9 \pm 0.2$  % a la misma concentración.

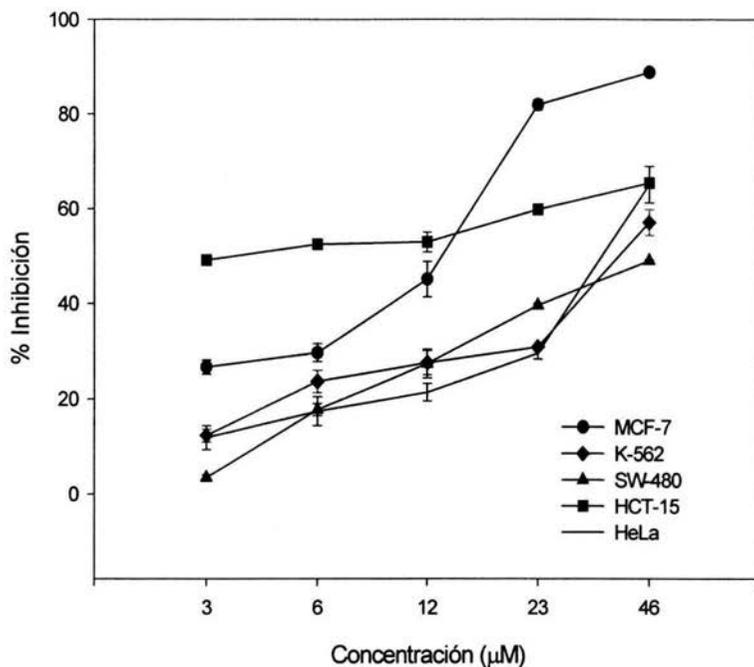


Figura No.28 Actividad citotóxica de la Xantona III aislada de *C. brasiliense*. Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

Mientras tanto, el derivado acetilado disminuyó drásticamente su actividad en todas las líneas celulares y solo el caso de la línea celular MCF-7 resultó inhibida en un  $83.7 \pm 2.1$  % (Figura No. 29) cuando la concentración se aumentó hasta  $241.2 \mu\text{M}$ ; es decir más de cinco veces que el compuesto original (Figura No. 28). Resultados similares se obtuvieron con el derivado metilado, su efecto citotóxico se redujo notablemente, aún cuando las concentraciones aumentaron en más de 4 veces (Figura No. 30). Estos resultados muestran que la sustitución de los hidroxilos en las posiciones 5 y 6 por grupos acetilo o metilo disminuyen el efecto citotóxico alrededor de 10 veces y sugieren que el hidroxilo que se encuentra en posición 1 formando un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo adyacente, no es fundamental para ejercer el efecto buscado.

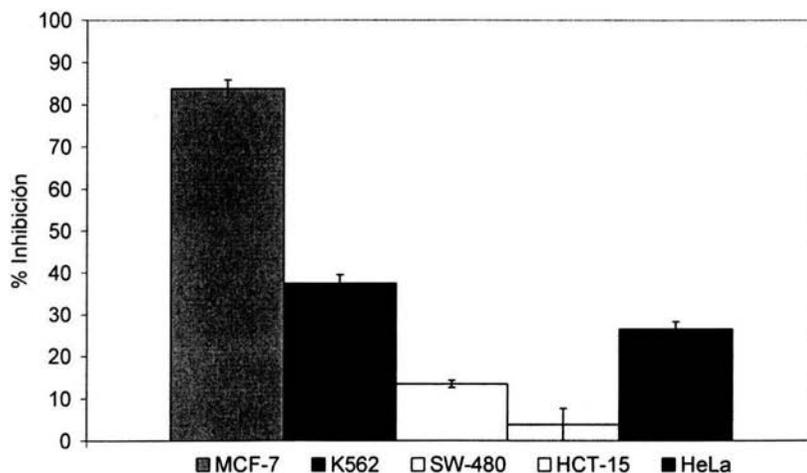


Figura No. 29 Actividad citotóxica de la Xantona III acetilada, ensayo realizado a  $241.2 \mu\text{M}$ . Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

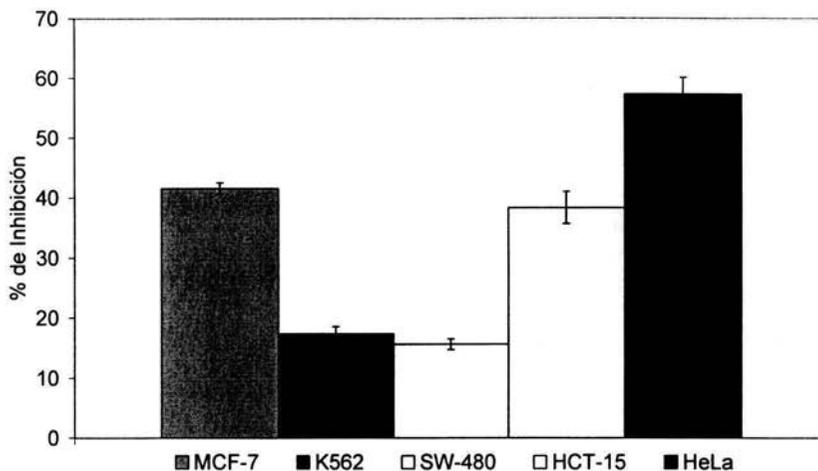


Figura No. 30 Actividad citotóxica de la Xantona III metilada, ensayo realizado a 385.96  $\mu$ M. Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

A pesar de que la xantona IV no pudo ser purificada, durante el proceso de la acetilación de la mezcla de III y IV se pudo aislar y caracterizar a la xantona IV acetilada. Este compuesto prácticamente no presentó actividad inhibitoria del crecimiento celular en las líneas celulares y sólo en el caso de la línea HCT-15 pudo observarse un  $58.93 \pm 1.6$  % de inhibición a 328  $\mu$ M (Figura No. 31).

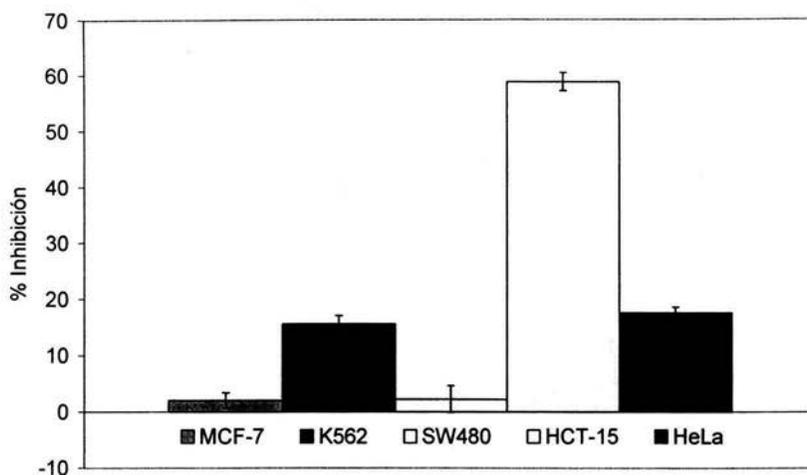


Figura No. 31 Actividad citotóxica de la Xantona IV acetilada el ensayo se realizó a una concentración de 328  $\mu\text{M}$ . Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

La xantona V presentó un patrón similar, todas las líneas celulares fueron sensibles al tratamiento con este compuesto siendo la línea celular K-562 la más afectada con un porcentaje de inhibición del  $87.4 \pm 4.6 \%$  a una concentración de 92.3  $\mu\text{M}$  (Figura No. 32) y las menos afectadas HeLa y HCT-15. Su derivado metilado mostró un patrón de inhibición celular muy disminuido inclusive a dosis elevadas ( $>130 \mu\text{M}$ ) en todas las líneas celulares utilizadas (Figura No.33). El análisis estructural entre la xantonas III y la xantona V indica que la principal diferencia es la presencia del grupo isoprenilo en la posición 2, el cual se encuentra en forma libre para el caso de la xantona V y formando un ciclo con el hidroxilo en posición 3; para el caso de la xantona III, estos resultados sugieren que la actividad citotóxica aumenta cuando se cicla este anillo.

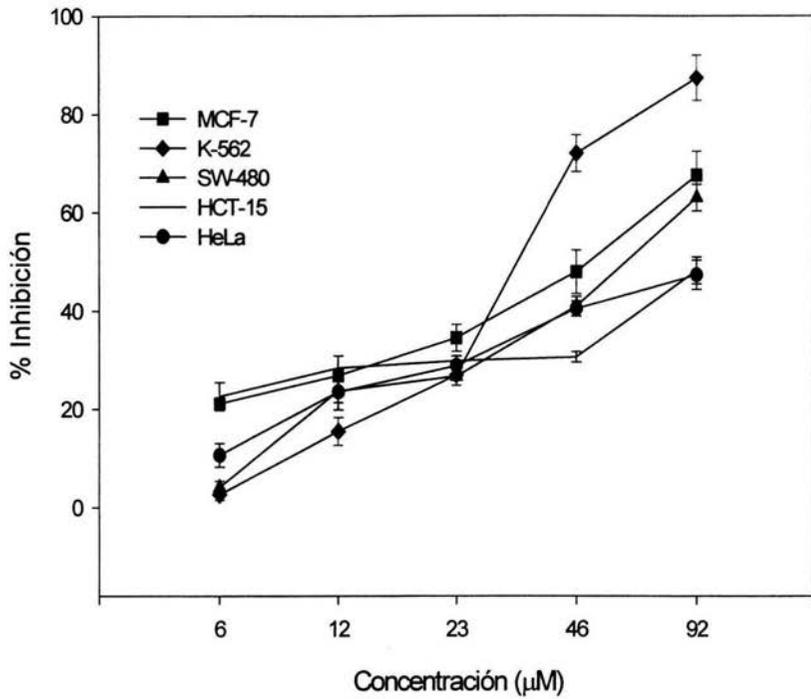


Figura No. 32 Actividad citotóxica de la Xantona V que fue aislada de *C. brasiliense*. Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

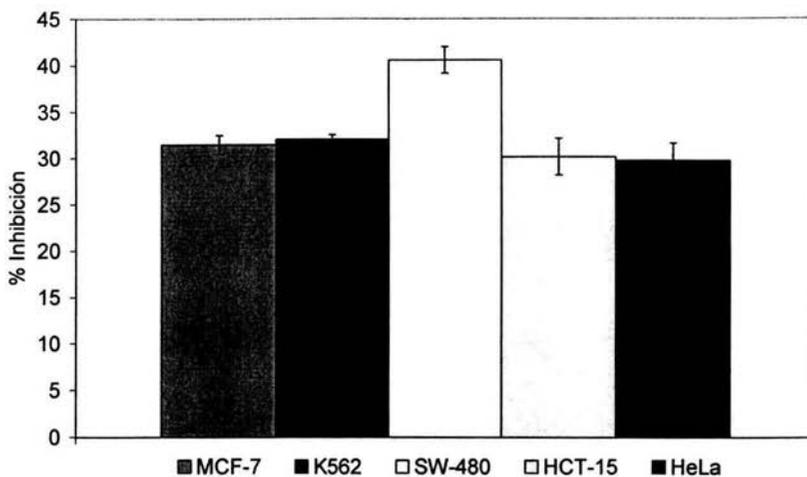


Figura No. 33 Actividad citotóxica de la Xantona V metilada este ensayo se efectuó utilizando una concentración de 129.5  $\mu\text{M}$ . Este compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

En cuanto a la xantona VI, podemos señalar que fue el compuesto más polar eluido en la cromatografía en columna, además de ser una xantona con un patrón de hidroxilación en las posiciones 1, 3, 5, 6 y 3' y a la cual no se llevaron a cabo sustituciones de ningún tipo, este compuesto no presentó actividad citotóxica tan acentuada en comparación con las xantonas III y V puesto que los porcentajes de inhibición no rebasan el 60 % aún a concentraciones elevadas mayores de 235  $\mu\text{M}$  (Figura No. 34). Estructuralmente la xantona VI difiere de la xantona V por la presencia de un hidroxilo en el carbono de la posición 3' del grupo isoprenilo y por ende en su cadena alifática insaturada. Estos resultados indican que es necesario el grupo isoprenilo en posición 2 con un doble enlace ubicado entre el carbono 2' y 3' de la cadena del isoprenilo para presentar una actividad citotóxica. Estos resultados sugieren que las xantonas III y V fueron los

compuestos con mayor actividad citotóxica dada la inhibición celular en las líneas utilizadas. Estos resultados se correlacionan con los encontrados por Estrada <sup>(17)</sup> con la técnica de SRB.

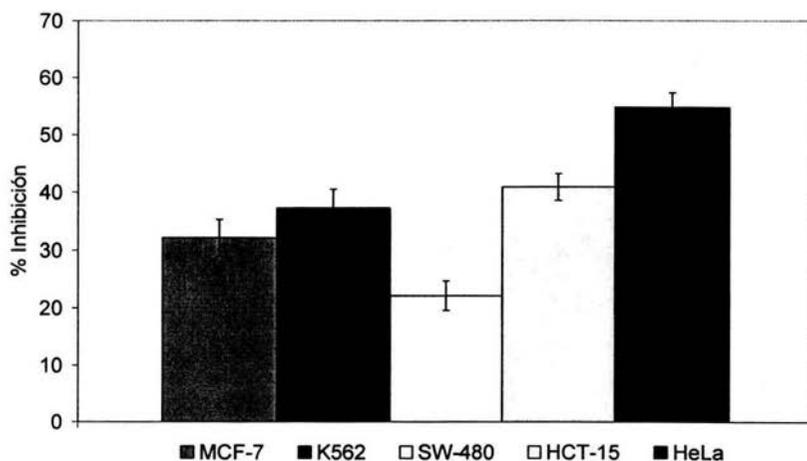


Figura No. 34 Actividad citotóxica de la Xantona VI aislada de *C. brasiliense* este ensayo se realizó a una concentración de 235.3  $\mu\text{M}$ . Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de la metodología. Los resultados son obtenidos a las 48 horas de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado.

Las xantonas son compuestos con una cabeza de serie que les permite presentar diversos sustituyentes en su estructura permitiendo así, una variedad de compuestos con distintas actividades farmacológicas entre estas, como la actividad citotóxica en distintas líneas celulares humanas <sup>(42)</sup>. Estos compuestos están ampliamente difundidos en la naturaleza, en plantas como la magniferina extraída de *Canscora decusata* <sup>(5)</sup>, la 1,8-dihidroxi-3-(3,7-dimetil-7-metoxi-octa-2-enil)-6-metoxixantona proveniente de *Vismia guineensis* <sup>(6)</sup>, Guadichaudiona A aislada de *Garcinia gaudichaudii* <sup>(74)</sup>, la 4-(3',7'-dimetil-octa-2',6'-dienil)-1,3,5-trihidroxi-9H-xanton-9-ona aislada de *Garcinia*

*livingstonei* <sup>(58)</sup>, Garcinona E aislada de *Garcinia mangostana L* <sup>(25)</sup>, Allanxantona A extraída de *Allanblackia floribunda* <sup>(39)</sup>, Cratoxiarborona B proveniente de *Cratoxylum sumatranum* <sup>(55)</sup> y algunas otras especies de hongos marinos como la Varixantona proveniente de *Emericella varicolor* <sup>(33)</sup>.

La característica de inhibir el crecimiento celular e inducir la muerte celular en líneas celulares tumorales a relativas bajas dosis es un criterio importante para considerar el compuesto para estudios posteriores antitumorales y ser considerado como un fármaco anticancerígeno <sup>(25)</sup>. En el presente estudio se observó que las xantonas III y V resultaron tener mayor actividad citotóxica en un rango de concentraciones de 6 a 90  $\mu\text{M}$  para la xantona V donde la  $\text{IC}_{50}$  para la línea celular MCF-7 resultó ser de  $11.99 \pm 2.06$  y, entre 3 – 50  $\mu\text{M}$  para la xantona III donde la  $\text{IC}_{50}$  para la línea celular K-562 fue de  $40.40 \pm 4.9$  (Tabla No. 5). Resultados similares se han encontrado para la guadichaudiona A donde su  $\text{IC}_{50}$  oscila entre 5-50  $\mu\text{M}$  para líneas celulares de leucemia como P388 <sup>(74)</sup>, , la 4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dienil)-1,3,5-trihidroxi-9H-xanton-9-ona con una  $\text{IC}_{50}$  de 1.5  $\mu\text{M}$  en SW-480 <sup>(58)</sup>, Garcinona E con una  $\text{IC}_{50}$  entre (0.4-5.4  $\mu\text{M}$ ) en líneas celulares hepáticas <sup>(25)</sup>, Allanxantona A con una  $\text{IC}_{50}$  de 41.5 $\mu\text{M}$  en la línea KB <sup>(39)</sup>, y la Cratoxiarborona B con una  $\text{IC}_{50}$  de 2.5  $\mu\text{M}$  en la línea KB <sup>(55)</sup>.

Tabla No. 5 Determinación de la IC<sub>50</sub> (μM) para las xantonas y sus derivados en diferentes líneas celulares tumorales.

| Línea Celular | Xantona III     | Xantona III acetilada | Xantona III metilada | Xantona IV acetilada | Xantona V     | Xantona V acetilada | Xantona VI |
|---------------|-----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------|---------------------|------------|
| MCF-7         | 11.99<br>+ 2.06 | >241.2                | > 385.96             | > 328.2              | >92.36        | > 129.5             | > 235.3    |
| K-562         | > 45.9          | > 241.2               | > 385.96             | > 328.2              | 40.4<br>+4.93 | > 129.5             | > 235.3    |
| SW-480        | > 45.9          | > 241.2               | > 385.96             | > 328.2              | >92.36        | > 129.5             | > 235.3    |
| HCT-15        | > 45.9          | > 241.2               | > 385.96             | >328.2               | >92.36        | > 129.5             | > 235.3    |
| HeLa          | > 45.9          | > 241.2               | >385.96              | > 235.3              | >92.36        | > 129.5             | >235.3     |

Se han encontrado reportes en la literatura que indican cómo la naturaleza de los sustituyentes alrededor del núcleo de las xantonas influye la actividad citotóxica, por ejemplo Pedro y col <sup>(42)</sup> demostraron que la introducción de grupos oxigenados en posiciones 1, 3, 5 y 6 al núcleo de las xantonas permite apreciar un aumento significativo en sus actividad citotóxica en función de la dosis. Con la finalidad de observar como se modificaba la actividad citotóxica, en el presente trabajo se encontró que la presencia de grupos metoxilo y acelilo disminuye la actividad citotóxica de manera significativa.

Muchos agentes citotóxicos que se encuentran en estudio han sido reportados por exhibir sus efectos antitumorales induciendo una respuesta apoptótica <sup>(74)</sup>, bajo este contexto en este trabajo se demostró que las xantonas poseen una alta actividad citotóxica Estudios previos de la literatura indican que algunas xantonas de tipo preniladas ejercen su efecto citotóxico a través de la inducción de una respuesta apoptótica; por ejemplo la Guadichaudiona A <sup>(74)</sup>, la cual presenta grupos isoprenilos en las posiciones 2 y 4 similar al isoprenilo de la posición 2 de la xantona V, provoca fragmentación del DNA, condensación de la cromatina en el núcleo, activación de la

caspa 3, pérdida del potencial de membrana mitocondrial por apertura de canales iónicos y externalización de la fosfatidilserina mientras que la de la  $\alpha$ -mangostina una xantona prenilada en posiciones 2 y 8 que exhibe un patrón de hidroxilación en posiciones 1,3 y 6<sup>(35)</sup>, adicionalmente a estos efectos típicos de una respuesta apoptótica reporta algunos otros efectos inhibitorios en la topoisomerasa I, la esfingomielinasa ácida y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. Con base a lo anterior se puede sugerir que uno de los mecanismos probables que media la actividad citotóxica de las xantonas III y V, sea a través de una inducción en la respuesta apoptótica.

#### 6.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA PARA LOS EXTRACTOS.

Los extractos A y B obtenidos de *Calophyllum brasiliense* y los extractos C y D obtenidos de *Garcinia intermedia* fueron evaluados y probados a una concentración de 50 mg/mL todos los extractos resultaron poseer actividad citotóxica en mayor o menor medida. Para el caso de las líneas celulares K-562 (Figura No. 39), SW-480 (Figura No. 40) y HCT-15 (Figura No. 37), se encontró que los porcentajes más altos de inhibición fueron causados por los extractos provenientes del *Garcinia intermedia*, siendo la línea celular HCT-15 la más afectada con un porcentaje de viabilidad del  $10.6 \pm 6.1$  % para el extracto D (Figura No.37). En el caso de la línea celular MCF-7 se observó que el extracto más activo fue el C, también proveniente de *Garcinia intermedia*, con un  $40.2 \pm 2.4$  % de viabilidad (Figura No. 36); solo en el caso de la línea celular HeLa todos los extractos produjeron una inhibición cercana al 40 % (Tabla No. 6).

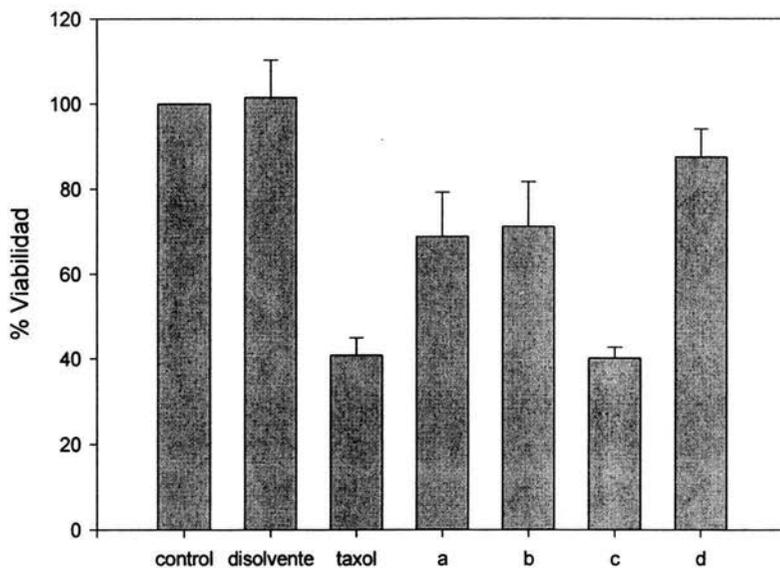


Figura No. 36 Actividad citotóxica de los extractos y sus controles respectivos en la línea celular MCF-7. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología. Los resultados se obtuvieron después de una exposición de 48 horas y son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno elaborado por cuadruplicado.

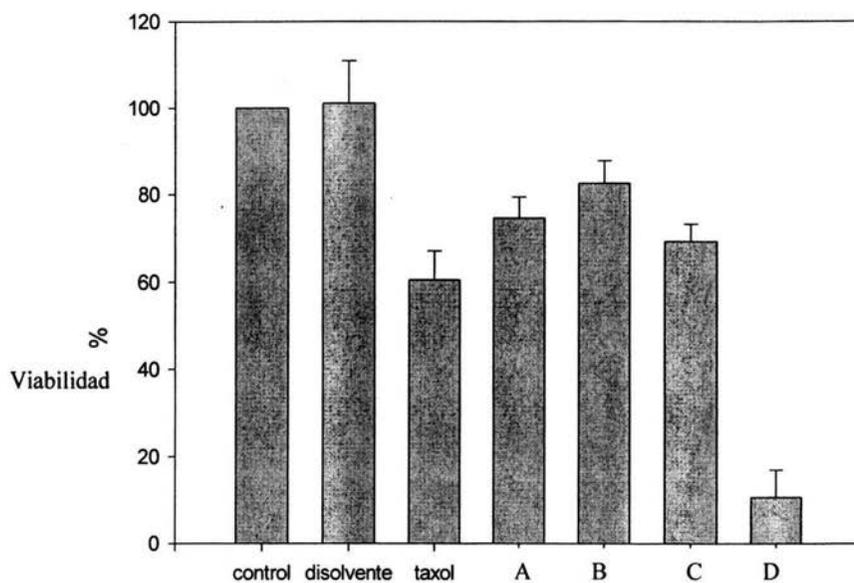


Figura No. 37 Actividad citotóxica de los extractos y sus controles respectivos en la línea celular HCT-15. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología. Los resultados se obtuvieron después de una exposición de 48 horas y son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno elaborado por cuadruplicado.

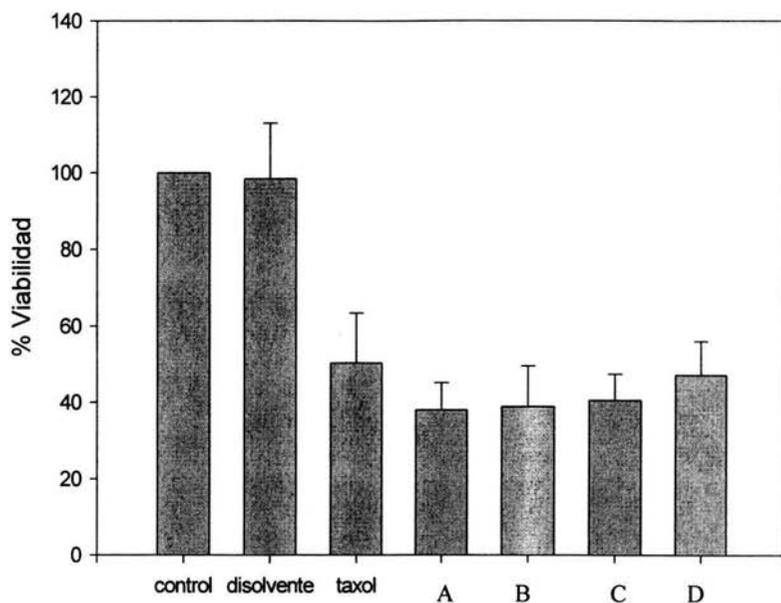


Figura No. 38 Actividad citotóxica de los extractos y sus controles respectivos en la línea celular HeLa. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología. Los resultados se obtuvieron después de una exposición de 48 horas y son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno elaborado por cuadruplicado.

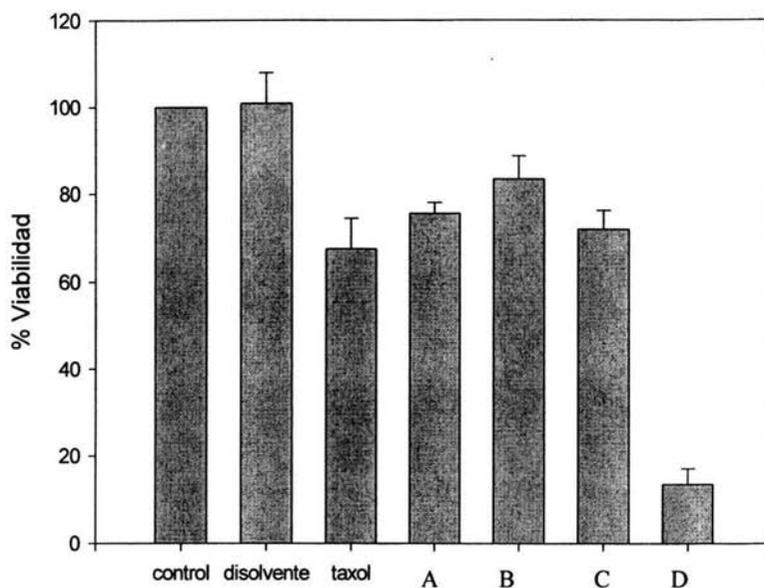


Figura No. 39 Actividad citotóxica de los extractos y sus controles respectivos en la línea celular K-562. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología. Los resultados se obtuvieron después de una exposición de 48 horas y son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno elaborado por cuadruplicado.

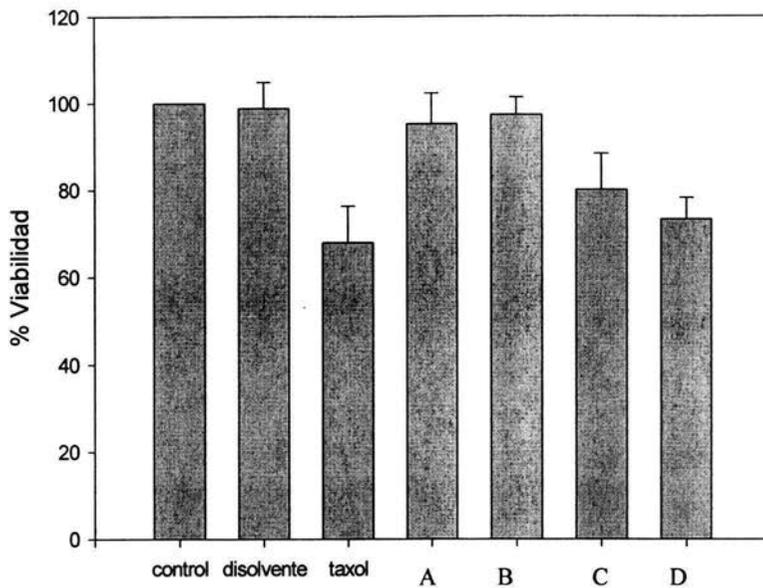


Figura No. 40 Actividad citotóxica de los extractos y sus controles respectivos en la línea celular SW-480. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología. Los resultados se obtuvieron después de una exposición de 48 horas y son el promedio de tres experimentos independientes, cada uno elaborado por cuadruplicado.

Los resultados de los anteriores gráficos arrojan información puntual del efecto citotóxico de los extractos a la concentración de 50 µg/mL en las cinco líneas celulares tumorales empleadas.

Tabla No. 6 Efecto citotóxico de los extractos en diferentes líneas celulares tumorales, los resultados se reportan en porcentaje de viabilidad.

| Línea celular | Extracto A    | Extracto B    | Extracto C   | Extracto D   |
|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| MCF-7         | 68.90 ± 10.34 | 71.25 ± 10.47 | 40.20 ± 2.56 | 87.50 ± 6.57 |
| K-562         | 75.60 ± 2.50  | 83.42 ± 5.33  | 71.96 ± 4.28 | 13.51 ± 3.61 |
| SW-480        | 95.34 ± 6.97  | 97.36 ± 4.02  | 80.12 ± 8.28 | 73.33 ± 4.92 |
| HCT-15        | 74.70 ± 4.76  | 82.63 ± 5.16  | 69.26 ± 4.04 | 10.25 ± 6.34 |
| HeLa          | 37.96 ± 7.10  | 38.91 ± 10.56 | 40.49 ± 6.86 | 47.06 ± 8.91 |

Extracto A) corteza de *Calophyllum brasiliense*.

Extracto B) hojas de *Calophyllum brasiliense*

Extracto C) aserrín de de la madera de *Garcinia intermedia*

Extracto D) hojas de *Garcinia intermedia*

El extracto A proveniente de las hojas y el extracto B proveniente de la madera de *C.brasiliense* fueron obtenidos en una mezcla de disolventes de diclorometano-metanol (1:1) de *C.brasiliense* ya que esta especie presenta en su madera como componentes de sus metabolitos secundarios a flavonoides, cumarinas, benzopiranos y xantonas <sup>(46)</sup>, además estudios fitoquímicos llevados a cabo con las hojas del mismo árbol así como de otras especies, han indicado que son una fuente importante de 4-alquil y 4-aril-cumarinas. Estudios preliminares, utilizando la técnica de SRB , indicaron que las cumarinas aisladas de *C.brasiliense* , presentan actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales HeLa, Hep-2,PC3, K-562 y U-251 <sup>(17)</sup>. Es así que se sigue entonces que la actividad citotóxica del extracto A proveniente de las hojas de

*C. brasiliense* sea debida a la presencia de cumarinas en especial de las 4-alquil y las 4-aril-cumarinas y la actividad citotóxica del extracto B sea debida a la presencia de xantonas como la xantona III y V.

Los extractos C y D fueron obtenidos del mismo sistema de disolventes pero de la especie *Garcinia intermedia*, esta especie tambien ha reportado compuestos biológicamente activos y forma parte de la familia *Guttiferae* donde se han encontrado numerosos compuestos citotóxicos. Su actividad biológica tan pronunciada es un indicador de la amplia variedad de compuestos citotóxicos que podrían ser aislados y caracterizados como nuevos compuestos de actividad citotóxica.

## 7. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización de las Xantonas III, V y VI provenientes del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense*.
- Las reacciones de síntesis permitieron obtener las xantonas III acetilada, III metilada, IV acetilada y V metilada.
- Se determinó que los compuestos con mayor actividad citotóxica fueron las Xantonas III y V en comparación con sus derivados acetilados y metilados, así como las xantonas VI y IV acetilada en las líneas celulares de prueba.
- Las acetilaciones y metilaciones de las xantonas III y V además de disminuir su polaridad, disminuyen significativamente la actividad citotóxica de estos compuestos, por lo tanto su actividad citotóxica es mayor cuando se exhibe el patrón de hidroxilación en las posiciones 1,3,5 y 6 del núcleo base de las xantonas y, preferentemente cuando el grupo isoprenilo en la posición 2 se encuentra ciclado con el hidroxilo en la posición 3 para formar un anillo adicional.
- Los extractos más activos correspondieron a los provenientes de *Garcinia intermedia*, especialmente las hojas de esta especie para la línea celular HCT-15, lo cual es un reflejo de la cantidad de metabolitos citotóxicos y una posible fuente de extracción.

## 8. PERSPECTIVAS

- Una vez demostrada la actividad citotóxica de las xantonas, resulta de gran importancia elucidar el mecanismo molecular por el cual dichos compuestos ejercen su efecto citotóxico.
- Determinar cuales son las causas por las que las xantonas modificadas con grupos acetilo y metilo reducen significativamente su efecto citotóxico.
- Llevar a cabo otras sustituciones con diferentes grupos y determinar el efecto citotóxico que estas modificaciones conllevan.
- Aislar y caracterizar otros compuestos provenientes de *Calophyllum brasiliense* así como de *Garcinia intermedia*.

## 9. BIBLIOGRAFIA.

1. Abe F, Nagafuji, Okabe H, Akahane H, Estrada-Muñiz E, Huerta-Reyes M, Reyes-Chilpa R. *Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of Garcinia intermedia and heartwood of Calophyllum brasiliense*. Phytochemistry 2004, 65(4); 393-398.
2. Alley M.C., Scudeiro D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinishi M.J., Fine D.L., Abbot B.J. Shoemaker R.H. and Boyd M.R. *Feasibility of Drug Screening whit panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay*. Cancer Res. 1988, 48: 589-601.
3. ATCC. *Catalogue of cell lines and hybridomas*. 7a ed. Rockville, Meryland, 1992.
4. Avedaño López M. C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 1ª edición. Editorial Iberoamericana. Madrid España. pp: 33,47-54,63. 1996.
5. Bhattacharya S.K., Ghosal S., Chauchuri R.K. and Sanyal A.K. *Canscora decussate (Gentianaceae) xanthonas III: pharmacological studies*. Journal of pharmaceutical sciences. 1972, April 24, 1838-1841.
6. Bilia A.R., Warsame A, Braca A, Keita A and Morelli I. *New prenylated anthraquinones and xanthonas from Vismia guineensis*. J.Nat. Prod. 2000, 63, 16-21.
7. Brown J.M. and Giaccia A.J. *The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems)of cancer therapy*. Cancer Res. 1995, 55:2325-2333.
8. Bruneton Jean. *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Editorial ACRIBIA. Zaragoza España, pp: 101-103, 1991.
9. Bruneton Jean. *FARMACOGNOSIA fitoquímica plantas medicinales*. 2a Edición .Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza España.2002. pp: 293-294, 1991.
10. Caballero Benitez y Julio Moran Andrade. *Mecanismos moleculares de la regulación de la muerte apoptótica*. Revista de educación bioquímica, 2002, 21(4); 235-244.
11. Carmichael J., De Graff W.G., Gaxdar A.F., Minna J.D. and Mitchell J.B. *Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity*. Cancer Res. 1987, 47: 943-946.

12. Chabner B.A., Allegra C.J., Curt G.A. y Calebresi P, *Fármacos antineoplásicos* pp. 1309-1367. en Goodman y Gilman *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Mc Graw Hill Interamericana 9ª edición. México 1996.
13. Chanmahasathien W, Li Y, Satake M, Oshima Y, Ishibashi M, Ruangrunsi N, Ohizumi Y. *Prenylated xanthones from garcinia xanthochymus*. Chem. Pharm. Bull. 2003, 51(11):1332-4.
14. Chiang Y., Yueh-Hsiung H., Shyuzo O., and Yoshiyasu F. *Xanthones and benzophenones from the stems of Garcinia multiflora*. J. Nat. Prod. 2003, 66, 1070-1073.
15. Crown J. and O'Leary m. *The Taxanes: An Update*. Labcet, 2000, 355: 1176-1178.
16. Estrada Muñiz Elizabet. *Coumarinas y xantonas de Calophyllum brasiliense : evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 2001.
17. Estrada Muñiz Elizabet. *Estudio químico y actividad biológica de las xantonas aisladas del duramen de Calophyllum brasiliense*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1998.
18. Fisher D.E. *Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold*. Cell, 1994, 78: 539-542.
19. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique*, Cap. 19. Measurement of Viability and Citotoxicicity, pp: 287-308., 5a ed. Wiley-Liss Edison N.J. 1994.
20. Goodman y Gilman. *Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas, Introducción Sección X en Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Vol 2, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, 9ª edición. México. Pp: 1301-1308, 1996.
21. Griffiths L.A., *Metabolism of xanthone in the rat*. Xenobiotica 1974, 4, No 6, 375-382.
22. Gringauz A. *Anticancer Drugs and their Mechanism of Action*. En *Introducción to medicinal chem: how drugs acts and why*, Cap 4. pp: 93-139, Wiley-VHC Inc, Brooklyn, N.Y. 1997.
23. Harris C. D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª Edición. Editorial Iberoamérica. México D.F. pp. 693. 1998.

24. Ho C, Huang Y, Chen C. *Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines*. *Planta Med.* 2002; 68, 975-979.
25. Ito C, Itoigawa I, Takakura T, Ruangrunsi N, Enjo F, Tokuda H, Nishino H., Furukawa H. *Chemical constituents of Garcinia fusca: structure elucidation of eight new xanthenes and their chemopreventive activity*. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 200-205.
26. Ito C., Itoigawa M., Miyamoto Y., Onoda A., Rao S.K., Mukainaka T., Tozuda H., Nishino H. and Furukawa H. *Poliprenylated benzophenones from Garcinia assigu and their potential cancer chemopreventive activities*. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 206-209.
27. Kerbel R, S. *Tumor Angiogenesis: Past, Present and the Near Future*. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (3): 505-515.
28. Kolenko V.M., Uzzo R.G., Bukowsky R., and Finke J.H. *Caspase-dependent and independent death pathways in cancer therapy*. *Apoptosis* 2000, 5:17-20.
29. Lewin B., *Oncogenes and Cancer*, en *Genes VI*, cap. 37. pp: 1131-1172. Oxford University Press, Oxford 1997.
30. Loeb K.R. and Loeb L.A, *Significance of Multiple Mutations in Cancer*. *Carcinogenesis*. 2000, 21 (3): 485-495.
31. Lowe S.W. and Lin A.W. *Apoptosis in cancer*. *Carcinogenesis*, 2000, 21(3): 485-495.
32. Malmstrom J., Chistophersen C., Barrero A., Oltra E., Justicia J. y Rosales A. *Bioactive metabolites from a marine derived strain of the fungus Emericella varicolor*. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 364-367.
33. Matsumoto K., Akao Y., Kobayashi E., Ito T., Ohguchi K., Tanaka T., Iinuma M. and Nozawa Y. *Cytotoxic benzophenone derivatives from Garcinia species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukemia cell lines*. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26 (4), 569-571.
34. Matsumoto K., Akao Y., Kobayashi E., Ohguchi K., Ito T., Tanaka T., Iinuma M., y Nozawa Y. *Induction of apoptosis by xanthenes from Mangosteen in human leukemias cell lines*. *J. Nat. Prod.*, 2003, 66, 1124-1127.
35. Mc Murry John. *Química Orgánica*. 3ª edición. Editorial Iberoamérica. México pp. 390-391, 1992.

36. Moongkarndi P., Kosem N., Kaslungka S., Luanratana O., Pongpan N., Neungton N. *Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by Garcinia mangostana (mangosteen) on skbr3 human breast cancer cell line*. J. Nat. Prod. 2003, 66 (12) 1531-5.
37. Moosa A. R., Schimpff C., Stephen A., Robsson C. M. *Principle of Cancer Chemotherapy en Comprehensive textbook of Oncology*. Volume one, Chapter 55, ed. Williams and Wilkins, 2a edición, U.S.A., pp: 527, 1991.
38. Nkengfack A.E., Azebacz G.A., Verdames J.C., Fomum Z.T., Van Heerden F.R. *A prenylated xanthone from Allanblakia floribunda*. Phytochemistry, 2002, 60,381-384.
39. Odile Thoison, Jacques Fahy, Vincent Dumontet, Angèle Chiaroni, Claude Riche, Mai Van Tri and Thierry Sévenet . *Cytotoxic prenilxanthenes from Garcinia bracteata*. J. Nat.Prod., 2000, 63, 441-446.
40. Paskasari A., Permana D.K., Ho, Cassady J.M. and Snapka R.M.. *Mechanism of action of the antileukemic xanthone psorospermin: DNA strand breaks, abasic sites, and protein DNA cross links*. Cancer Res., 1994, 54, 3191-3195.
41. Pedro M., Cerqueira F, Sausa M.E., Nascimento M.S.J., Pinto M. *Xanthenes as inhibitors of grow of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes in vitro*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 16, 3725-37-30.
42. Perera F. P. *Uncovering New Clues to Cancer Risk*. Sci Am., 1996, 9: 40-46.
43. Pezzuto J. *Taxol production in Plant Cell Culture Comes of Ages*. Nat. Biotech., 1996, 14:1083.
44. Plumb J.A., Milroy R., and Kaye S.B. *Effects of the ph Dependence of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absortion on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay*. Cancer Res., 1989, 49:4435-4440.
45. Reyes C.R., Jimenez E.M., Estrada M.E.. *Antifungal xanthenes from Calophyllum brasiliense heartwood*. Journal of Chemical Ecology. 1997, 23, 7, 1901-1911.
46. Rukachaisirikul V., Kamkaew M., Sukavisit D., Phongpaichit S., Sawangchote P., Taylor W.C. *Antibacterial xanthenes from the leaves of Garcinia nigrolineata*. Mol Cell Biochem., 2003, 254(1-2): 339-46.

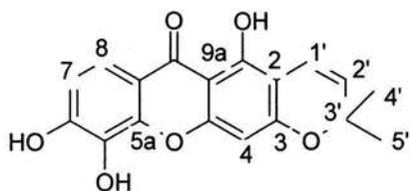
47. Rukachaisirikul V., Pailee P., Hiranrat A., Tuchinda P., Yoosook C., Kasisit J., Taylor W.C., Reutrakul V. *Anti hiv-1 protostanetripenes and digeranylbenzophenone from trunk bark and stems of Garcinia speciosa*. Bioorg Med Chem., 2004. 15; 12(2): 309-17.
48. Rukachaisirikul V., Rittwigrom T., Pinsa A., Sawangchote P., Taylor W.C. *Xanthones from the Garcinia nigrolineata*. Phytochemistry, 2003, 64, 1149-1156.
49. Ruoslahti E. *How Cancer Spreads*. Sci Am. 1996, 9:72-77.
50. Schmitt E., Cimoli G., Steyaert A. and Bertrand R. *Bcl-xL Modulate apoptosis Induced by Anticancer Drugs and Deleys DEDVase and DNA Fragmentation Promoting Activities*. Exp Cell. Res., 1998, 240:107-121.
51. Sen S., and D'Inncaci M. *Apoptosis, biochemical events and relevance to cancer chemotherapy*. FEBS Lett., 1992, 307(1):122-127.
52. Seo E.K, Nam-Cheol K., Mansukh C.W., Monroe E.W., Navarro H.A., Burgess J.P., Kawanishi K., Kardono L.B.S., Riswan S., Rose W.C., Craig R., Fair C., Farnsworth N.R. and Douglas Kinghorn. *Cytotoxic prenylated xanthones and the unusual compound anthraquinobenzophenones from Cratoxylum sumatranum*. J. Nat. Prod., 2002, 65, 299-305.
53. Seo E.K., Wall M.E., Mansukh C.W., Navarro H., Mukherjee F., Kinghorn D. *Cytotoxic constituents from the roots of Tovomita brevistaminea*. Phytochemistry, 1999, 52, 669-674.
54. Shiff P.B., Fant J., and Horwitz S.B. *Promotion of Microtubule assembly in vitro by taxol*. Nature, 1999, 277:665-667.
55. Solis-Lopez A. *Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos por un compuesto derivado de quinolinas*. Tesis profesional. Facultad de Química UNAM. 2001.
56. Sordat-Diserens I., Rogers C., Sordat B. and Hostettmann K. *Prenylated xanthones from Garcinia Livingstonei*. Phytochemistry, 1992, 31, 1, 3313-316.
57. Sporn M.B. *Cracinogenesis and cancer: Diferent perspectives on the same disease*. Cancer Res., 1999, 51: 6215-6157.
58. Suffnes M. and Wall M.E. *Discovery and Development of Taxol*, pp: 1-25. Science and Applicatons. Suffness M CRC Press, Boca Raton Florida 1995.
59. Temin H.M. *Evaluation of cancer as a mutation driven process*. Cancer Res., 1988, 48:1697-1701.

60. Thompson C.B. *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases*. Science, 1995, 267:1456-1461.
61. Torres Sosa C.A. *Evaluación in vitro de xantonas y sesquiterpenoides de origen vegetal como agentes hipoglucémicos en aorta de rata*. Tesis Profesional Facultad de Ciencias. UNAM. México.2001.
62. Valencia Ortiz C. *Fundamentos de Fitoquímica*. 1ª edición. Editorial Trillas. Mexico DF, 1995.pp: 115 117.
63. Valle R.B. *The Use os Taxol in Cell Biology*, pp: 259-273 en Taxol: Science and Appl., Suffness M . CRC Press, Boca Raton Florida 1995.
64. Ventura Gallegos J.L., Gómez E.O., Zentella Dehesa A. *Caspasas: una cascada de proteasas implicadas en la muerte celular por apoptosis*. BEB, 1998 18(4):153-165.
65. Vieira L.M., Kijjoa A., Silva A.M., Mondranondra I.O., Kengthong S., Gales L., Damas A.M., Herz W. *Lanostanes and fredelanostanes from the bark of Garcinia speciosa*. Planta Med., 2003, 69(12); 1141-6.
66. Vistica D.T., Skehan P., Scuderi D., Monks A., Piiman A., Boyd M.R., *Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameter affecting formazan production*. Cancer Res., 1991, 15;51 (10): 2515-20.
67. Vogelstein B. and Knizler K.W. *The Multistep Nature of Cancer*. Trend gent., 1993, 9 (4): 138-141.
68. Waldman J. *Cell Cycle Arrest versus Cell Death in cancer Therapy*. Nat. Med., 1997, 3:1034-1036.
69. Weinberg R.A. *How cancer arises*, Sci Am. 1996, 273 (3):62-70.
70. Williams R.B., Hoch J., Glass T.E., Evans R., Miller J.S., Wisse J.H., Kingston D.G. *A novel cytotoxic guttiferone analogue from Garcinia macrophylla from the Suriname rainforest*. J. Nat, Prod., 2000, 45, 299-305
71. Wu X., Cao S., Goh S., Hsu A., Tan B. *Mitochondrial destabilisation and caspase-3 activation are involved in the apoptosis of jurkat cells induced by gaudichaudione A, a cytotoxic xanthone*. Planta Med., 2002, 68,198-203.
72. Yokota J. *Tumor Progression and Metastasis*. Carcinogenesis, 2000, 21 (3): 497-503.

73. Zhang H.Z., Kasibhatla S., Wang Y., Herich J., Guastella J., Tseng B., Drewe J., Cai S.X. *Discovery, characterization and SAR of gamboic acid as a potent apoptosis inducer by HTS assay*. J. Ethnopharmacol. 2004, 90(1): 161-6.

## 10. APÉNDICE

### Jacaurebina (xantona III)

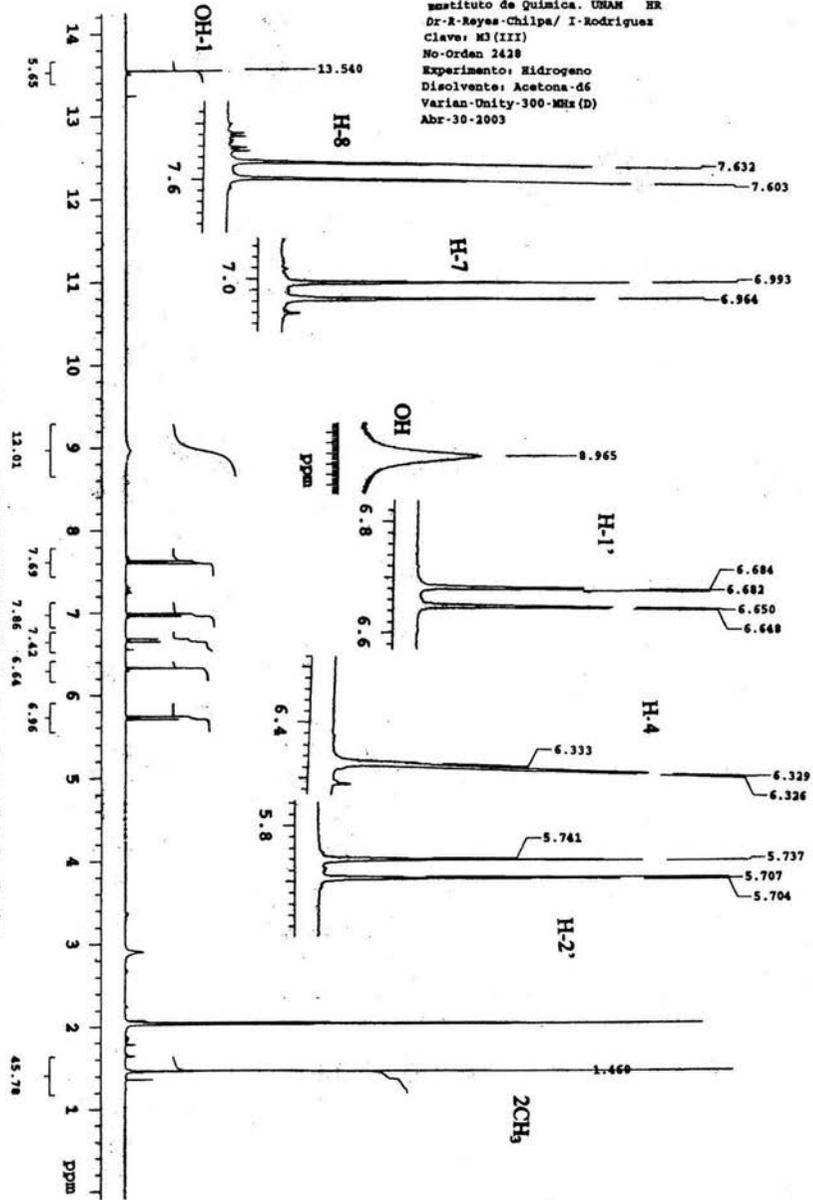


C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> cristales amarillos, p.f. (252-256)° C .

Datos de HRMN (300 MHz, acetona deuterada), Jacaurebina (xantona III).

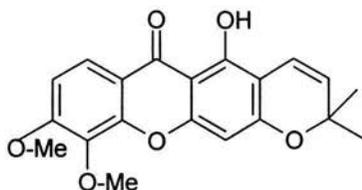
| Protón  | δ (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | # de protones |
|---------|---------|---------------|--------|---------------|
| 2- Me   | 1.46    | S             | -      | 6             |
| H-2'    | 5.72    | D             | 10.05  | 1             |
| H-1'    | 6.66    | D             | 10.20  | 1             |
| H-4     | 6.32    | S             | -      | 1             |
| H-7     | 6.97    | D             | 8.7    | 1             |
| H-8     | 7.61    | D             | 8.7    | 1             |
| OH-1    | 13.54   | S             | -      | 1             |
| 2OH-5,6 | 8.965   | S             | -      | 2             |

Instituto de Química, UNAM HR  
 Dr. R. Reyes-Chilpa/ I. Rodríguez  
 Clave: M3 (III)  
 No. Orden 2428  
 Experimento: Hidrogeno  
 Disolvente: Acetona-d6  
 Varian-Unity-300-MHz (D)  
 Abr-30-2003



Espectro No 1 Espectro de HRMN (300 MHz, Acetona deuterada); Jacuberina  
 Xantona III

5,6- dimetil jacaurebina (xantona III metilada).

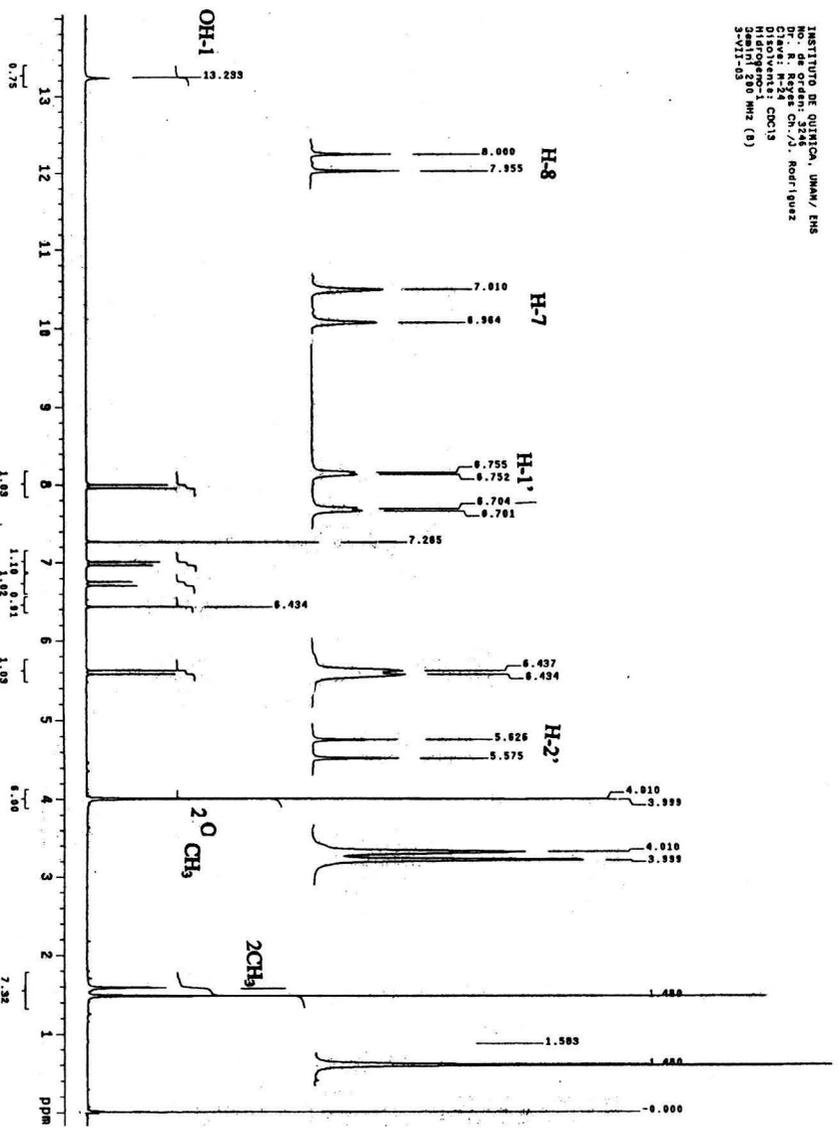


$C_{18}H_{18}O_6$  cristales amarillos, p.f. (176-178)° C.

Datos de HRMN (200 MHz, Cloroformo deuterado) de la 5,6-dimetil jacaurebina.

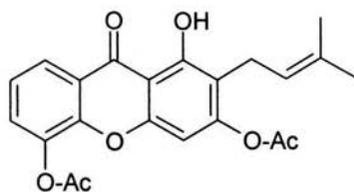
| Protón       | $\delta$ (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | # de protones |
|--------------|----------------|---------------|--------|---------------|
| 2-Me-4' y 5' | 1.48           | S             | -      | 6             |
| H-2'         | 5.6            | D             | 10.2   | 1             |
| H-1'         | 6.73           | D             | 10.2   | 1             |
| H-4          | 6.44           | S             | -      | 1             |
| H-7          | 6.987          | D             | 9.2    | 1             |
| H-8          | 7.98           | D             | 9.0    | 1             |
| 2 OMe-6 y 7  | 4.0            | S             | -      | 6             |
| OH-1         | 13.23          | S             | -      | 1             |

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM/ENS  
 No. de Orden: 2248  
 Dr. R. Reyes Ch./J. Rodríguez  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Hidrógeno-1  
 300 MHz (3)  
 3-VII-83



Espectro No 2 Espectro de HRMN (200 MHz, Cloroformo deuterado), 5,6-dimetilacberma, Xantona III metilada

1-hidroxi-3,5-diacetil-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona IV acetilada).

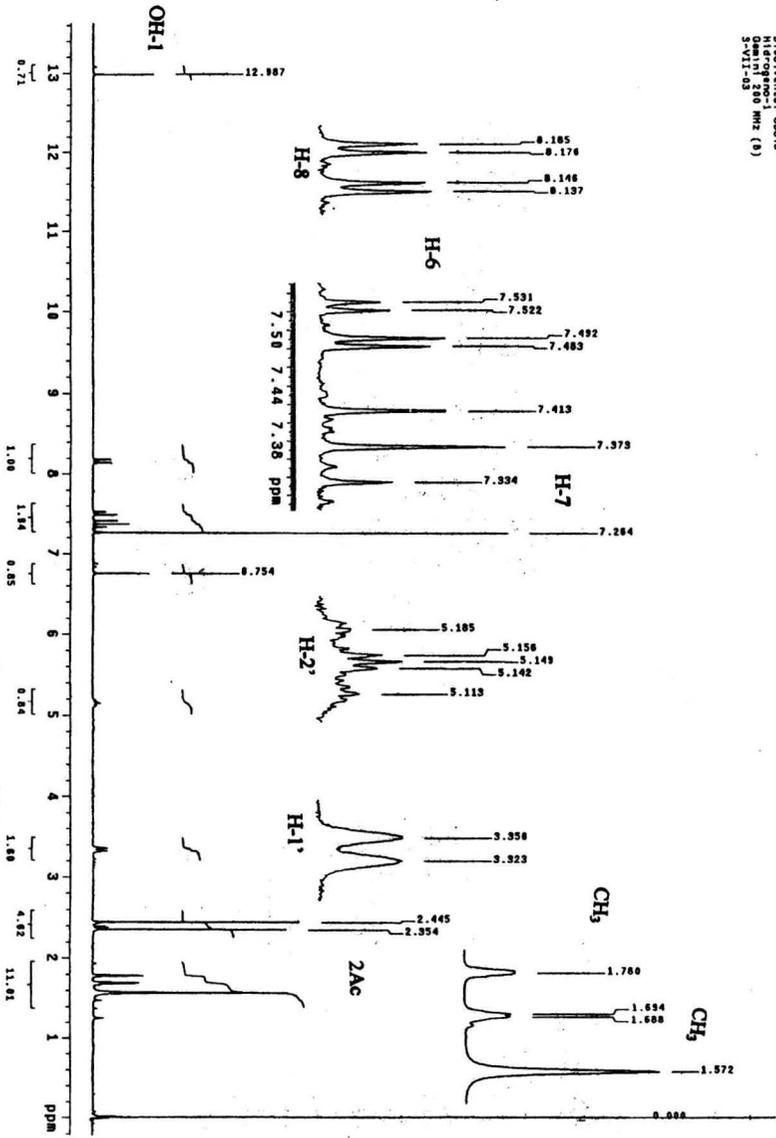


Cristales amarillos  $C_{22}H_{21}O_7$ , p.f. (130-138) $^{\circ}$  C.

Datos de HRMN (200 MHz, Cloroformo deuterado) de la 1-hidroxi-3,5-diacetil-2-(3,3-dimetilalil)-xantona .

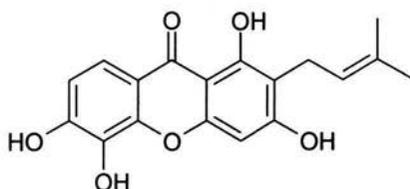
| Protón              | $\delta$ (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | # de protones |
|---------------------|----------------|---------------|--------|---------------|
| CH <sub>3</sub> -4' | 1.691          | S             | -      | 3             |
| CH <sub>3</sub> -5' | 1.78           | S             | -      | 3             |
| H-2'                | 5.15           | Tt            | 6.8    | 1             |
| H-1'                | 3.34           | D             | 6.7    | 2             |
| H-4                 | 6.75           | S             | -      | 1             |
| H-6                 | 8.16           | dd            | 7.8    | 1             |
| H-7                 | 7.37           | T             | 7.9    | 1             |
| H-8                 | 7.51           | dd            | 7.8    | 1             |
| OH-1                | 12.98          | S             | -      | 1             |
| OAc-3               | 2.36           | S             | -      | 1             |
| OAc-6               | 2.44           | S             | -      | 1             |

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ENS  
 No. de orden: 3247  
 Cliente: Sr./Sra. Rodriguez  
 Cliente: N-50  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Temperatura: 200 MHz (8)  
 5-VI-03



Espectro No 3 Espectro de HRMAM (200 MHz, Cloroformo deuterado), 1-  
 hidroxil-3,5-diacetil-2-(3-dimetilamini)-xantona; Xantona IV acetiada.

1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona V).

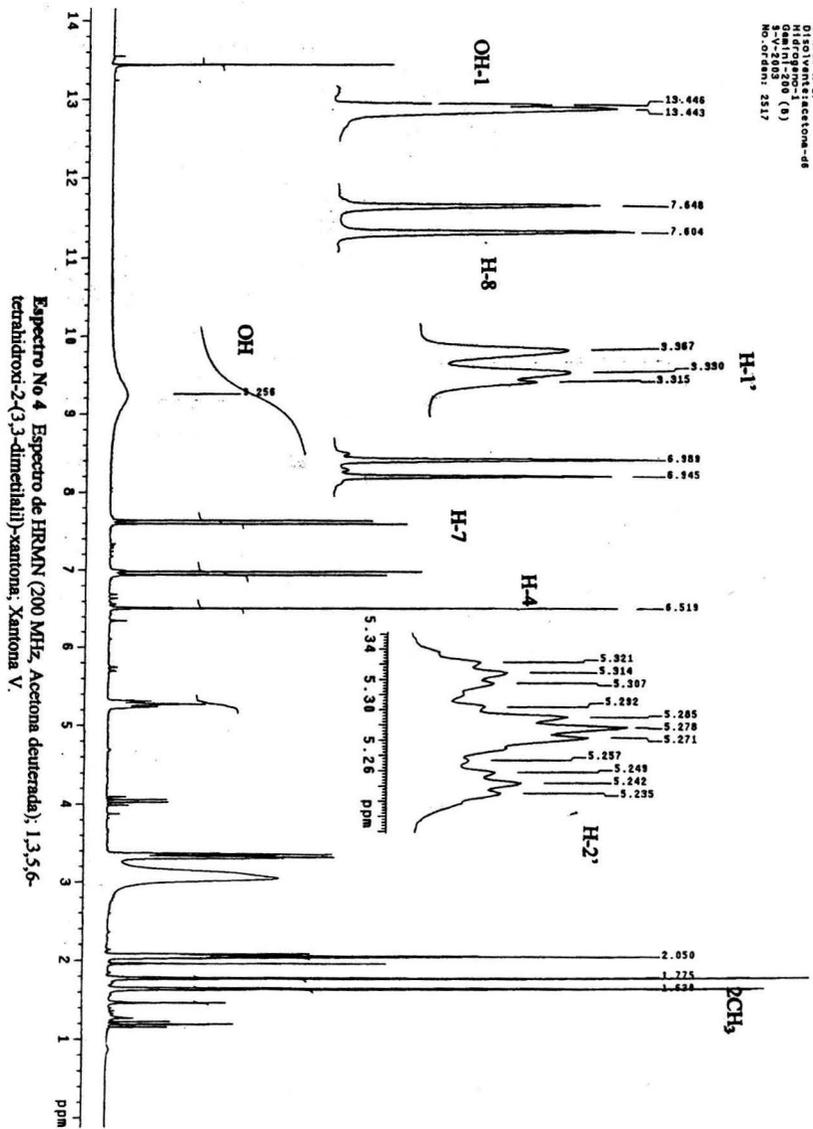


Cristales amarillos,  $C_{18}H_{16}O_6$ , p.f. (240-245)° C.

Datos de HRMN (200 MHz, Acetona deuterada) de la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona.

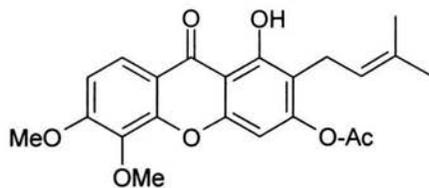
| Protón              | $\delta$ (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | # de protones |
|---------------------|----------------|---------------|--------|---------------|
| CH <sub>3</sub> -3' | 1.775          | S             | -      | 3             |
| CH <sub>3</sub> -3' | 1.639          | S             | -      | 3             |
| H-1'                | 3.337          | D             | 8.9    | 2             |
| H-2'                | 5.278          | T             | 7.2    | 1             |
| H-4                 | 6.519          | S             | -      | 1             |
| H-7                 | 6.967          | D             | 8.8    | 1             |
| H-8                 | 7.626          | D             | 8.8    | 1             |
| OH-1                | 13.444         | S             | -      | 1             |
| Ar-OH               | 9.256          | S             | -      | 3             |

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, ANG  
 Dr. Ricardo Reyes / J. Rodríguez  
 División de Químicas  
 Hidroquímica (B)  
 Laboratorio 108 (B)  
 S-V-2005  
 No. orden: 2517



Espectro No 4 Espectro de HRMAN (200 MHz, Acetona deuterada), 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilil)-xantona, Xantona V.

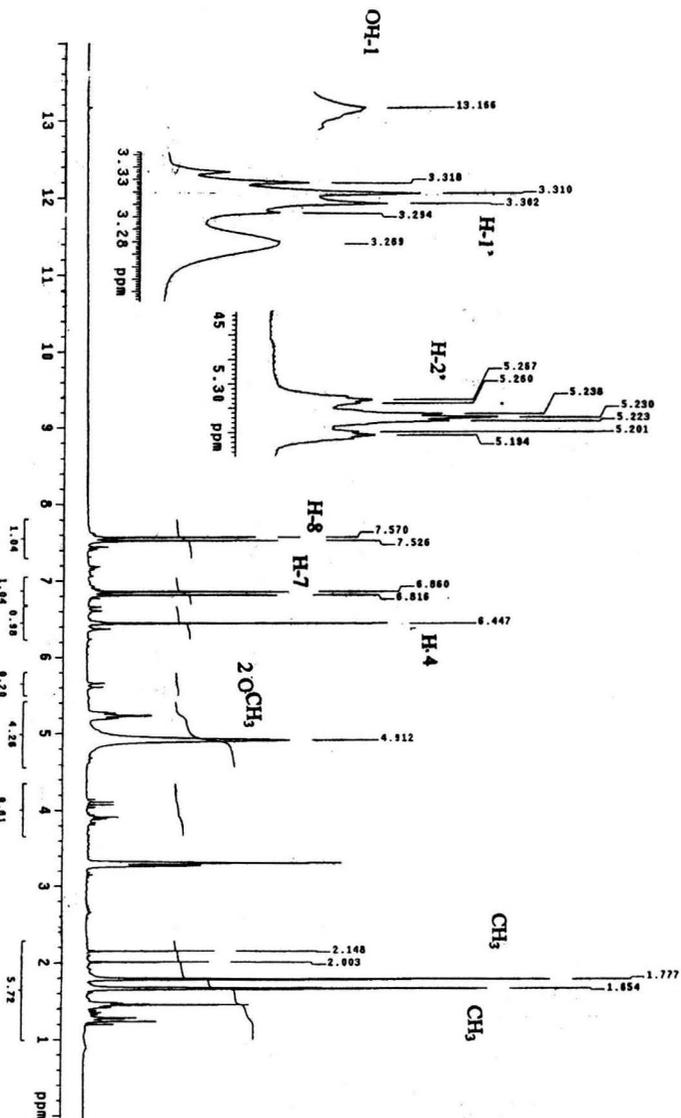
1-hidroxi,3,5,6-trimetoxi-2-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (xantona V metilada).



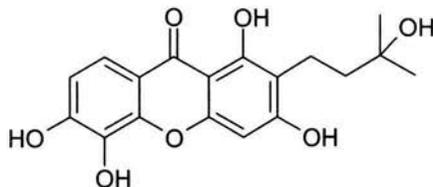
Cristales amarillos,  $C_{24}H_{22}O_6$ , p.f. (180-184)° C.

Datos de HRMN (200 MHz, Cloroformo deuterado), para la 1-hidroxi,3,5,6-trimetoxi-2-2-(3,3-dimetilalil)-xantona.

| Protón              | $\delta$ (ppm) | Multiplidad | J (Hz) | # de protones |
|---------------------|----------------|-------------|--------|---------------|
| CH <sub>3</sub> -3' | 1.654          | S           | -      | 3             |
| CH <sub>3</sub> -3' | 1.777          | S           | -      | 3             |
| H-2'                | 5.23           | T           | 6.6    | 1             |
| H-1'                | 3.291          | D           | 9.0    | 2             |
| H-4                 | 6.447          | S           | -      | 1             |
| H-7                 | 6.838          | D           | 8.8    | 1             |
| H-8                 | 7.548          | D           | 8.8    | 1             |
| OH-1                | 13.166         | S           | -      | 1             |
| O-Me                | 4.912          | S           | -      | 3             |



**1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona (xantona VI).**

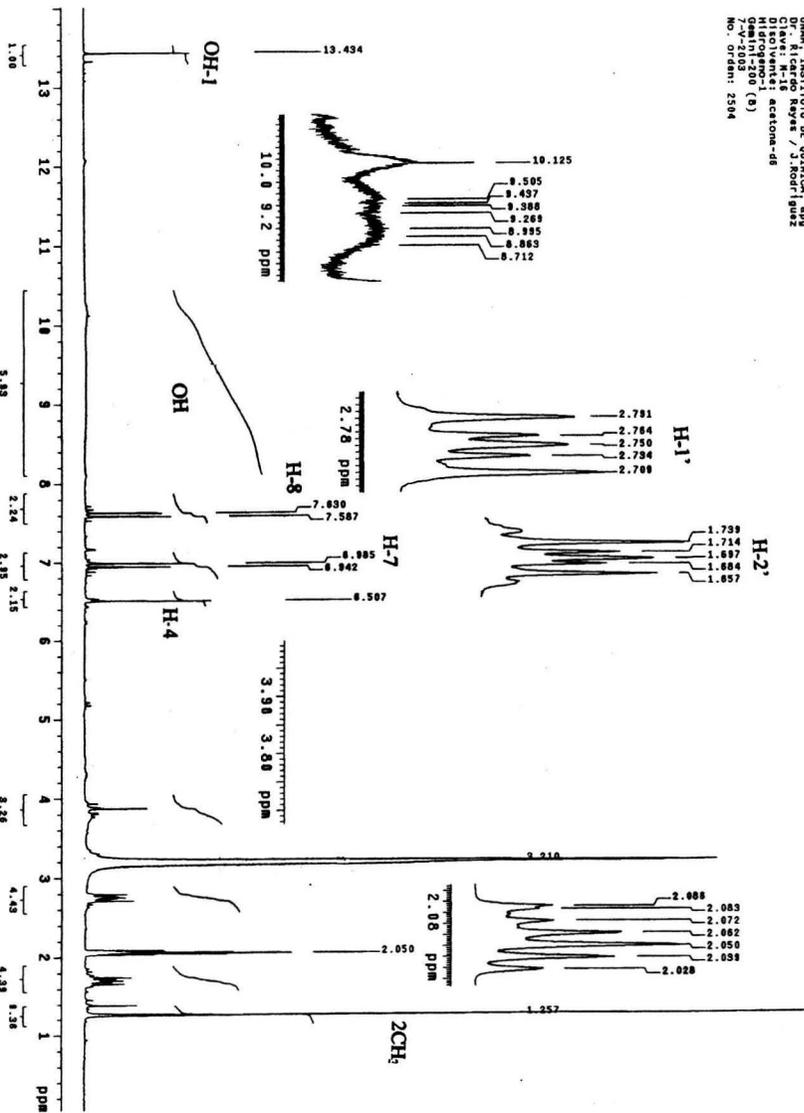


Cristales café,  $C_{18}H_{18}O_7$ , p.f. (270-274)° C.

Datos de HRMN (200 MHz, Acetona deuterada) para la 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona.

| Protón   | $\delta$ (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | # de protones |
|----------|----------------|---------------|--------|---------------|
| 2Me-3'   | 1.257          | s             | -      | 6             |
| H-2'     | 1.698          | c             | 5.4    | 2             |
| H-1'     | 2.750          | c             | 5.4    | 2             |
| H-4      | 6.507          | s             | -      | 1             |
| H-7      | 6.96           | d             | 8.6    | 1             |
| H-8      | 7.61           | d             | 8.6    | 1             |
| OH-1     | 13.43          | s             | -      | 1             |
| OH-6 y 7 | 9.167          | s             | -      | 2             |
| OH-3'    | 10.125         | s             | -      | 1             |

UNAM INSTITUTO DE QUÍMICA  
 Av. Instituto de Química, 4892  
 Clave: M-18  
 Dirección: acatona-48  
 Grama: 200 (g)  
 No. orden: 2584



Espectro No 6 Espectro de HRMN (200 MHz, Acetona deuterada), 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3-hidroxil-3-metilbutil)-xantona Xantona VI