



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO DE LA CUMARINA MAMMEA A/AA,  
MODIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y  
DETERMINACION DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN  
LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A**

**KARINA VÁZQUEZ MEDRANO**



**MEXICO, D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

Presidente: María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Homero Hernández Montes

Secretario: José Dolores Solano Becerra

Primer suplente: Raquel Ortega Muñoz

Segundo suplente: María Eva González Trujano

## **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Laboratorio de Biología Molecular

Departamento de Biología

Facultad de Química, U.N.A.M.

**Asesor del tema:** M. en C. José Dolores Solano Becerra

**Sustentante:** Karina Vázquez Medrano

# AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE ESTHELA MEDRANO POR HABERME DADO LA VIDA Y POR APOYARME EN TODO MOMENTO

A MI PADRE SILVINO VAZQUEZ POR REGALARME LA OPORTUNIDAD DE VIVIR Y POR EL SOLO HECHO DE SER MI PADRE.

A MIS HERMANOS: GRISEL, SILVINO, ANGEL, CÉSAR Y LAURA POR SER MIS COMPLICES EN LA VIDA Y POR ESOS MOMENTOS DE ALEGRÍA Y TRISTEZA, DE JUEGOS Y DE PELEAS.

A MIS PROFESORES DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, PARA LOS QUE SIGUEN CON NOSOTROS Y PARA LOS QUE SE HAN ADELANTADO.

UN ESPECIAL AGRADECIMIENTO A LA DRA. ANGELINA QUINTERO, QUE EN PAZ DESCANSE, POR HABERME DADO LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ÉSTE TRABAJO BAJO SU TUTELA.

A JOSÉ SOLANO POR HABERME GUIADO Y DIRIJIDO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL DR. RICARDO REYES POR APOYARME EN LA REALIZACIÓN DE LA PRIMERA PARTE DE ESTE TRABAJO.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SUS CORRECCIONES, SUGERENCIAS Y COMENTARIOS.

A LA FAMILIA VILLANUEVA GARCÍA PORQUE ME OFRECIERON UN HOGAR Y COMPARTIERON CONMIGO UNA PARTE DE SU VIDA. ESPECIALMENTE A LA SRA. ZENAIDA GARCÍA.

A GUSTAVO POR SER MI AMIGO, MI COMPAÑERO Y POR COMPARTIR SU VIDA CONMIGO

A MI HIJO AXEL EMILIANO POR SER EL MOTIVO DE MIS LOGROS Y POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE SER SU MADRE

A MIS AMIGAS: MAYRA, VERO, ESTHER, CARMEN, BERTHA Y ADRIANA POR BRINDARME SU AMISTAD Y CONSEJO EN TODO MOMENTO.

# ÍNDICE

	Pág.
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades del cáncer	2
2.1.1 El cáncer como un problema de salud pública	2
2.1.2 El ciclo celular y cáncer	4
2.1.3 Tratamiento para el cáncer	7
2.1.4 Búsqueda de nuevos fármacos	8
2.1.5 Importancia de los productos naturales como fármacos antineoplásicos	10
2.2 Cumarinas y mammea A/AA	11
2.2.1 Clasificación de las cumarinas	12
2.2.2 Actividad citotóxica de las cumarinas	15
2.2.3 Propiedades antibacterianas de la cumarina mammea A/AA	21
2.3 La Técnica del MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio] como ensayo de viabilidad celular	22
III OBJETIVOS	24
IV MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Parte orgánica	25
4.1.1 Extracción de los principios activos	25
4.1.2 Caracterización de los productos obtenidos	27
4.1.3 Modificación estructural de la mammeisina a ciclomammeisina	28
4.2 Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	29
4.2.1 Líneas celulares empleadas	29
4.2.2 Descongelamiento celular	31

4.2.3	Propagación de líneas celulares	31
4.2.4	Mantenimiento de líneas celulares	32
4.2.5	Cosecha de células	32
4.2.6	Conteo celular	32
4.2.7	Citotoxicidad en cultivos de líneas celulares tratadas con ciclommeisina a diferentes concentraciones	33
4.2.8	Determinación de la viabilidad por MTT en cultivos de líneas celulares tratadas con ciclommeisina	35
4.3	Preparación de soluciones	35
4.3.1	Reactivo de MTT (2.5 mg/mL)	35
4.3.2	Medio de cultivo	35
4.3.3	Solución de PBS-EDTA	36
V	RESULTADOS	37
5.1	Caracterización e identificación de los compuestos aislados	37
5.2	Caracterización y determinación de la estructura del producto obtenido de la reacción de ciclización de la mammeisina	39
5.3	Efecto de la ciclommeisina en la viabilidad en cultivos de líneas celulares	39
VI	DISCUSIÓN	46
VII	CONCLUSIONES	48
VIII	BIBLIOGRAFÍA	49
IX	ABREVIATURAS	54
X	ANEXO 1	56

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente el cáncer afecta a una gran parte de la población mundial, se ha convertido en un problema de salud pública y en México es la segunda causa de muerte.

La búsqueda de nuevos productos químicos de origen vegetal resulta relevante para proponer compuestos candidatos a ser agentes antitumorales. Entre este tipo de compuestos orgánicos se encuentran algunas cumarinas; estudios *in vitro* indican que inducen citotoxicidad en líneas celulares humanas extraídas de tumores.

El objetivo de este trabajo es el de evaluar la actividad citotóxica de la ciclommeisina obtenida a partir de la ciclización de la cumarina mammea A/AA, para lo cual se extrajo, aisló e identificó a la cumarina a partir de la cáscara del fruto del árbol *Mammea americana*. Posteriormente, por medio de una reacción química en medio ácido, se realizó la modificación estructural del compuesto para obtener su isómero ciclizado, la ciclommeisina. A la ciclommeisina se realizaron pruebas de citotoxicidad en líneas celulares utilizando la técnica de MTT, que se basa en la reducción de éste reactivo por deshidrogenadas mitocondriales de la célula. En este ensayo las células se expusieron al compuesto a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  durante 72 h y se observó que la ciclommeisina induce citotoxicidad en las líneas celulares empleadas. Los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos varían entre  $23.4 \pm 1.6 \mu\text{M}$  para la línea celular C33 y  $35.2 \pm 0.8 \mu\text{M}$  para SW620. Por lo anterior, a la ciclommeisina se le puede considerar un candidato para continuar su estudio y proponerlo como un agente antitumoral.



## II. Antecedentes

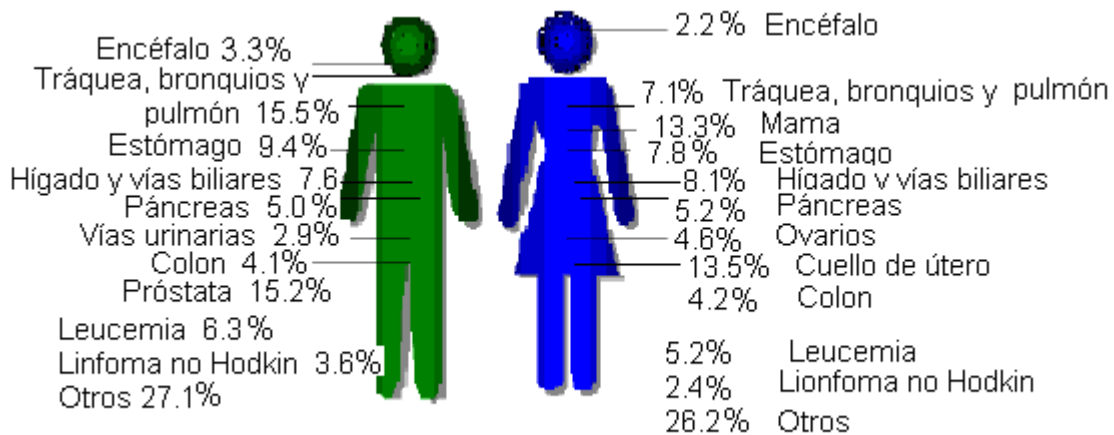
### **2.1. Generalidades del cáncer**

#### **2.1.1 El cáncer como un problema de salud pública**

El cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que a pesar de los avances en investigación y tratamiento, anualmente fallecen más de seis millones de personas en el mundo (American C. S., 2005). Además de afectar a personas de todas las edades, es la segunda causa de defunción en los países en desarrollo (Ochoa-Carrillo, 2006).

De acuerdo a los análisis de la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizados en la población mexicana, una de las principales causas de muerte en hombres y mujeres es el cáncer. El grupo de tumores malignos que afectan a ambos sexos son: cáncer de pulmón, tráquea y bronquios aunque con mayor incidencia en los varones, y los de tipo ginecológico en la población femenina. En el 2002, fallecieron 58 mil 599 personas por este tipo de tumores; lo que representa un 12.7% del total de las muertes registradas. Mientras que en el 2004 se registraron en México 61 mil 248 defunciones, lo que representa un 12.9% del total de las defunciones presentadas en el año. En la figura 1 se muestra la distribución porcentual de las muertes por tumores malignos, de acuerdo al sexo (INEGI, 2005).

La palabra cáncer es un término que se utiliza para designar distintas clases de enfermedades, que manifiestan una proliferación celular anormal. En el cáncer las células proliferan a una tasa inapropiada para formar crecimientos conocidos como tumores (neoplasmas). Existen dos tipos de tumores dentro de la nomenclatura oncológica los benignos y los malignos. Los tumores benignos son formaciones autolimitadas, que no se extienden a otros tejidos (no causan metástasis), crecen en un sitio concreto.



**Figura 1 Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo, 2004. Tomada de INEGI, 2005**

Por el contrario, las células de los tumores malignos continúan con la proliferación e invaden tejidos cercanos o se extienden a distintas partes del cuerpo a través de la sangre o los vasos linfáticos; a este proceso se le llama metástasis que induce la formación de nuevos tumores malignos (Tamarin R, 1996).

Los sitios más comunes para la proliferación de metástasis son en hígado, pulmones, nódulos linfáticos, medula ósea y el cerebro. En general, el sitio inicial de formación de tumores secundarios tiende a ser un órgano que tenga la primera red capilar encontrada por las células después de haber sido liberadas del tumor (Liotta L., 1986). El cáncer se nombra por el sitio de origen primario y se continúa llamando igual, aún cuando ha formado metástasis en otra parte del cuerpo.

El cáncer puede definirse como una pérdida en la regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma que afecten la expresión o función de genes que controlan el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (Rivera L, 1995).

El crecimiento tumoral en general tiene las siguientes características:

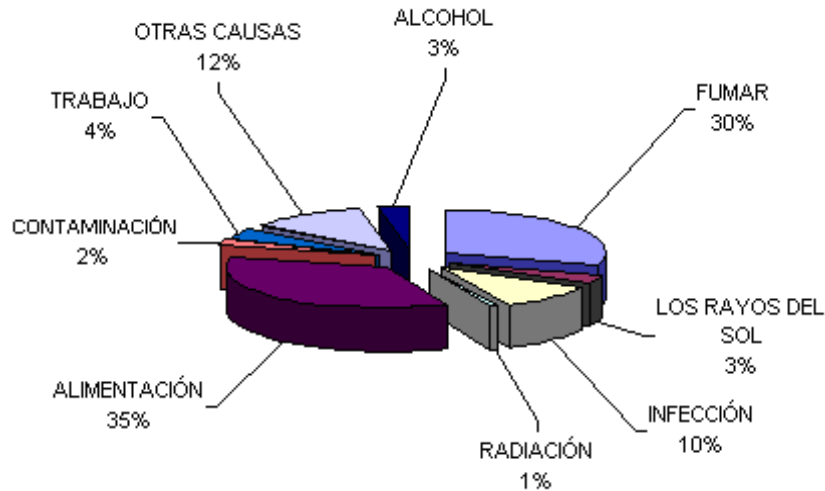
- Crecimiento acelerado, por aumento en la división celular que hace que las células tumorales se encuentran en un continuo ciclo celular.

- Crecimiento autónomo, la división celular es independiente y no está coordinada con el resto de células de su entorno.
- Algunas de estas células escapan al sistema inmunitario que reconoce a las células tumorales como propias.

Posteriormente, una célula tumoral se distingue de una célula normal por sus propiedades de inmortalidad, transformación morfológica y algunas veces, por su habilidad para realizar metástasis (Lewin B., 1997). Con el paso del tiempo, los tejidos de células malignas adquieren una mayor agresividad al alterar funcionalmente los tejidos vecinos, comprometiendo la supervivencia del organismo (Segura J., 1999).

Generalmente los tipos de cáncer se dividen en cuatro grupos, dependiendo del tipo de células originalmente implicadas; una de ellas es la leucemia que se caracteriza por una superproducción de glóbulos blancos, otro tipo como los linfomas, son enfermedades de los nódulos linfáticos y del bazo que causan la producción de un número excesivo de linfocitos. Por otra parte, los sarcomas son tumores de los tejidos que derivan del mesodermo embrionario como el músculo, el hueso y el cartílago. Los carcinomas que son tumores que surgen del tejido epitelial como las glándulas, las mamas, la piel y revestimientos de los sistemas respiratorio y urogenital, aproximadamente el 85% de los cánceres son carcinomas (Tamarin R., 1996).

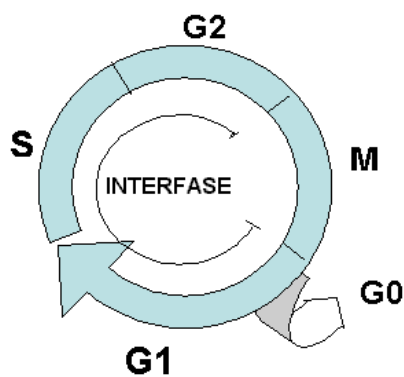
El cáncer es causado tanto por factores externos: tabaco, químicos, radiación e infecciones por organismos; así como internos: mutaciones hereditarias, hormonas, condición inmunitaria y procesos fisiológicos alterados tales como la inflamación (American C. S., 2005). En la figura 2 se muestra un diagrama con una distribución estimada de los factores que influyen en la producción del cáncer; como puede observarse aproximadamente el 90% de las causas son externas ó ambientales y sólo el 10% son hereditarias.



**Figura 2. Principales causas de cáncer, distribución porcentual.**  
Tomado de Wogan G., 2004

### 2.1.2 El ciclo celular y el cáncer

El ciclo celular es la base para la viabilidad de los organismos. Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Un ciclo celular típico se da en dos grandes fases, una de ellas es la interfase que a su vez se divide en tres fases: G1, S y G2; y la otra es la mitosis (M) que se divide en profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis; como se puede observar en la figura 3 (Alberts B. y col., 1996).

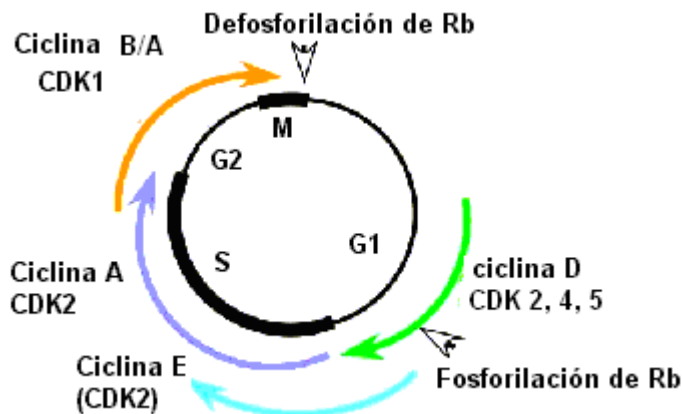


**Figura 3. Las cuatro fases sucesivas del ciclo de una célula eucariota típica. Durante la interfase la célula crece continuamente; durante la fase de mitosis se divide. La replicación del ADN se produce únicamente durante la fase S de la interfase.** Tomado de Alberts B. y col., 1996

En ocasiones, y debido tanto a causas exógenas como endógenas, los controles que regulan la multiplicación celular no funcionan adecuadamente y una célula empieza a proliferar continuamente. Cuando los descendientes de estas células heredan la tendencia a crecer sin responder a regulación alguna, el resultado es un clon celular capaz de expandirse ilimitadamente. Finalmente este clon de células no deseadas puede formar una masa llamada tumor (Lodish H. y col., 2003).

El estudio del ciclo celular y su regulación han permitido conocer cómo la fidelidad y la integridad de la replicación del genoma son mantenidas por las funciones coordinadas de los puntos de control y de los sistemas de reparación del ADN. El funcionamiento adecuado de estos procesos puede ser alterado por mutaciones genéticas. Lo anterior sugiere que los mecanismos moleculares de regulación que participan en la transformación celular pueden ser empleados como sistemas potenciales para instrumentar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer (Fishel R., y col., 1993).

Por otro lado, la replicación y segregación del ADN, de los centriolos y de los polos ecuatoriales están finamente regulados. Defectos en estos mecanismos resultarán en formas de inestabilidad genómica como ablaciones, amplificaciones, translocaciones y no disyunción de los cromosomas. Estas aberraciones se presentan durante la evolución de las células normales hacia células con potencial tumorigénico. Se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G1 y la entrada a la fase S, y el otro, en la transición de la fase G2 a la fase M donde el complejo ciclina/cdk fosforila a pRb (proteína de retinoblastoma) figura 4.



**Figura 4. El ciclo celular y las ciclinas que regulan el paso de una fase a otra. Tomado de Alberts B., 2004**

En la fase S la célula comienza a replicar el ADN y no finaliza hasta que está completamente replicado. La fidelidad del proceso se logra por la actividad correctora (3'-5' exonucleasa) de la enzima ADN polimerasa (enzima que fabrica ADN a partir de nucleótidos libres). Con esta reparación se reduce hasta mil veces el error (Lewin B., y col., 1997).

En la transición de G<sub>2</sub> a M se sabe que participa un factor promotor de mitosis (MPF) o ciclina B que actúa sobre moléculas blanco aún desconocidas, necesaria para que la célula entre en mitosis.

De la etapa de mitosis como tal (M) a la de G<sub>1</sub> se sabe que una vez que MPF realizó su función, ésta se degrada. La célula entra en anafase con sus respectivos procesos necesarios para la citocinesis.

La fase G<sub>1</sub> es la más activa en cuanto a síntesis de proteínas, donde el ADN celular no se transcribe activamente y pocos agentes quimioterapéuticos son activos en esta fase del ciclo celular. Por el contrario, la fase S es la fase de replicación activa del ADN y muchos agentes quimioterapéuticos son más activos en esta fase. Entre los fármacos empleados en la quimioterapia se encuentran los agentes alquilantes como la ciclofosfamida, el clorambucil y la procarbazona entre otros; también los antimetabolitos como los análogos del ácido fólico que interfieren con la síntesis de nucleótidos. Por otro lado los alcaloides de la vinca actúan en la fase de mitosis, se unen a la tubulina interrumpiendo la formación del huso mitótico. Desde años atrás se han hecho estudios de citotoxicidad para determinar la presencia de fármacos que puedan ocasionar muerte o disminución de la proliferación celular, logrando así encontrar y proponer nuevas moléculas como alternativa a la terapia antitumoral (Suffnes M., 1982 y Popoca J., 1998).

### **2.1.3 Tratamiento para el cáncer**

El cáncer puede ser tratado por cirugía, radiación, quimioterapia e inmunoterapia (American C. S., 2005). Para los diversos tipos de cáncer la quimioterapia puede ser curativa, paliativa o beneficiar marginalmente (Nagata S., 1997). La quimioterapia fue el primer tratamiento sistémico para el cáncer, en la mayoría de los casos consiste en la asociación de medicamentos que utilizados por separado no logran todo el potencial terapéutico; sin embargo, combinando los mecanismos de acción de los diferentes medicamentos, se logra impedir la multiplicación celular de forma más o menos selectiva. Las células cancerosas que se están multiplicando

anormalmente son las más afectadas sin embargo, las células normales que hacen crecer el cabello, las uñas y la piel también son dañadas. La toxicidad en las células normales es la causa de los efectos colaterales como náusea, vómito y supresión de la inmunidad por el efecto en la disminución de los glóbulos blancos. La quimioterapia se puede usar como tratamiento principal (en leucemias, linfomas y cáncer de testículo), pero normalmente es adyuvante (después de la cirugía), neoadyuvante (antes de la cirugía) o incluso está asociada a la radioterapia (mds.com.mx).

Los fármacos antitumorales pueden clasificarse como específicos del ciclo celular (ECC) y no específicos del ciclo celular (NECC). Los fármacos ECC han probado ser más eficaces en las neoplasias hematológicas y en los tumores en los cuales una proporción relativamente grande de las células está proliferando. Los medicamentos NECC (muchos de los cuales se fijan al ADN y dañan a ésta macromolécula) son efectivos en los “tumores sólidos” que tienen una tasa baja de crecimiento (Katzung B., 2003). En la tabla 1 se muestran algunos fármacos antineoplásicos y sus efectos sobre las fases del ciclo celular.

FARMACO	SITIO DE ACCIÓN	EFEECTO EN EL CICLO CELULAR	MECANISMO DE ACCIÓN
Cisplatino y análogos (agentes alquilantes)	ADN	Detención G <sub>1</sub> /S Detención en S Detención en G <sub>2</sub> Apoptosis.	Inhibe la replicación de ADN. Se une a bases púricas de ADN a través de enlaces covalentes. Produce daño irreparable al ADN
Fluorouracilo (Antimetabolitos)	Enzimas involucradas en la síntesis de ADN.	Detención en S	Inhibe síntesis de ADN.
Daunorrubicina	ADN	Detención en S y G <sub>2</sub>	Alta afinidad al ADN, bloqueo de la síntesis de ARN y ADN
Taxol (Inhibidores de microtúbulos )	Microtúbulos	Detención en G <sub>2</sub> /M. Detención en G <sub>1</sub> Apoptosis	Promueve la estabilización de microtúbulos.
Vincristina	Citoesqueleto y Microtúbulos	Detención en la fase G <sub>2</sub> +M y mitosis (huso mitótico).	Inhibe la formación de microtúbulos.
Ciclofosfamida	ADN	Detención en S Detención en G <sub>1</sub> /S Detención en G <sub>2</sub>	Intervienen en la síntesis del ADN y la división celular.

**Tabla 1. Fármacos antineoplásicos y sus efectos sobre las fases del ciclo celular. Tomada de Ruíz C., 2005**

Originalmente se buscaban compuestos que inhibían la proliferación celular en forma inespecífica, posteriormente se buscaron agentes que actuaran selectivamente sobre blancos celulares más específicos. En los últimos 50 años, el estudio de las acciones de los agentes

antineoplásicos en el ciclo celular, ha permitido avanzar considerablemente en el conocimiento del funcionamiento celular tumoral (O'Connor P., 1996).

#### **2.1.4 Búsqueda de nuevos fármacos.**

La incidencia del cáncer en la población mundial va en aumento, por lo que es necesaria una búsqueda de medicamentos con actividad citotóxica y con menos reacciones adversas. 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 modelos o “cabeza de serie” supone encontrar una actividad biológica nueva en un compuesto químico. Se trata de encontrar nuevas estructuras que puedan servir como punto de partida para su modificación estructural, ante el hecho de que el nuevo compuesto pueda mejorarse (Avendaño L., 1996).

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 los análisis de compuestos naturales ó de síntesis seleccionados al azar. La modificación estructural presenta ventajas de tipo económico, ya que tanto los métodos de síntesis como los de ensayos farmacológicos de los análogos serán similares a los compuestos de referencia.

Algunos de los criterios para la selección de los compuestos 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 semirígidos de los mismos (Avendaño L., 1996).
- b. Introducción de enlaces múltiples. La introducción de un enlace doble o triple puede alterar tanto la forma de una molécula como sus propiedades fisicoquímicas; por ello es frecuente que esta clase de modificaciones produzca variaciones en el tipo de actividad farmacológica (Avendaño L., 1996).



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. Una modificación de este tipo suele ir acompañado por un incremento de lipofilia (Avendaño L., 1996).

Actualmente los productos naturales de origen vegetal son una excelente opción para satisfacer la demanda de fármacos en el mercado mundial (Mc Murry J., 1992); prueba de ello es el taxol (paclitaxel). El taxol es un diterpeno aislado originalmente del árbol *Taxus brevifolia* con un rendimiento del 0.007%, por ese motivo se requirió la semisíntesis a partir de metabolitos secundarios de *Taxus baccata* Unnaeus y de *Taxus walfichanai* Zucarini (Perera F., 1996). La primera muestra pura de este compuesto se obtuvo en 1966 y la estructura se reportó en 1971 (Suffnes M., 1995). El taxol está indicado en el cáncer de ovario, de mama, de células no pequeñas de pulmón, esófago, de vejiga, de endometrio, de cérvix de linfoma y de sarcoma de Kaposi (Crown J. y col., 2000; Pezzuto J., 1996). Este fármaco es un inhibidor de la mitosis y causa la estabilización de los microtúbulos. Los efectos celulares del paclitaxel son dosis y tiempo dependientes y estos 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 (Shiff P. y col., 1999).

Los efectos adversos del taxol incluyen mielosupresión, neuropatía, fatiga, alopecia, diarrea y toxicidad en mucosas, piel y uñas (Crown J. y O'Leary M, 2000). El paclitaxel, además, tiene propiedades similares a las endotoxinas que estimulan la síntesis de citocinas proinflamatorias y del radical óxido nítrico en macrófagos.

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 de un compuesto biológicamente activo, se genera una variación de las características fisicoquímicas del mismo compuesto, como un incremento en la lipofilia, lo cual resulta de especial interés si este compuesto presenta una baja absorción. Sin embargo dependiendo del tipo de sustituyentes y de su posición en la estructura de la molécula la actividad biológica también se modifica (Avendaño L., 1996).

### **2.1.5 Importancia de los productos naturales como fármacos antineoplásicos.**

La base de datos, internacional, Napralert (napralert.org) establecida en la Universidad de Illinois, contiene más de 80 mil artículos de investigación que reportan información química o farmacológica sobre unas 25 mil especies de plantas. Incluso, aunque el *cribado* de plantas silvestres con fines medicinales no es un área importante en la investigación farmacológica del mundo industrializado, tan solo en el período de 1950 a 1980 se desarrollaron: anticonceptivos derivados de la diosgenina del barbasco mexicano *Dioscorea mexicana*, antihipertensivos y tranquilizantes como la reserpina, la deseripina y la rescinamina, derivados de *Rauwolfia sp.*, aunque estas drogas ya han sido sustituidas por sintéticos, los anticancerígenos leucocristina y vincalécoblastina derivados de *Cataranthus roseus* y el etoposidum derivado de *Podophyllum peltatum*, laxantes derivados de *Cassia spp* y antileucémicos derivados de *Taxus*.

Desde hace mucho tiempo las plantas han jugado un papel importante en el tratamiento de las enfermedades humanas. En la actualidad, aproximadamente 120 fármacos son obtenidos de las plantas. Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar esteroides, glucósidos cardiotónicos (glucósidos *Digitalis*), anticolinérgicos (alcaloides tipo tropano aislado de la belladona), analgésicos y antitusivos (alcaloides del opio), antihipertensivos (reserpina), colinérgicos (*fisotigmina*, *pilocarpina*), antimaláricos (alcaloides aislados de *Cinchona*), antimitóticos (colchicina), anestésicos (cocaína), relajantes del músculo esquelético (tubocurarina), y agentes anticancerígenos como el taxol (*Taxus brevifolia*), *vincristina*, *vinblastina* (*Catharanthus roseus*), podofilotoxina (*Podophyllum peltatum* L.) y camptotecina (*Camptotheca acuminata*; Pezzuto P., 1997).

Aún cuando es evidente el predominio de los fármacos sintéticos, se ha estimado que los fármacos obtenidos de fuentes naturales representan actualmente alrededor del 25% de las prescripciones médicas realizadas en EUA. Es claro que las plantas siguen teniendo un papel importante en el tratamiento y cura de enfermedades en la vida moderna (Pezzuto P., 1997). En el 2003 se hizo un análisis basado sobre un gran número de medicamentos nuevos derivados de productos naturales, el cual fue avalado por agencias regulatorias como la FDA y es reportado en el *Annual Reports of Medical Chemistry* en una revisión que abarca desde 1981 al 2002. En este análisis se encontró que hay 79 fármacos en el área del cáncer, lo cual representa el 62%

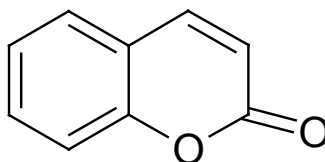
del total, en donde 9 fármacos (11%) son productos naturales y 21 (27%) son derivados de productos naturales, el resto proviene de agentes biológicos como organismos microbianos ó de modificaciones estructurales mediante síntesis (Newman D. y col., 2003).

## 2.2 Cumarinas y mammea A/AA

El árbol de *Mammea americana* pertenece al género *Clusiaceae*, conocido comúnmente como mamey; mismo que está compuesto de cerca de 200 especies, se encuentran distribuidas en las costas del océano indo-pacífico, en el continente americano se puede encontrar en las costas del Golfo de México, así como en países de Centroamérica (Arriaga-Maldonado, 1976).

En la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antineoplásica en derivados de productos naturales se han identificado algunas moléculas como las cumarinas con actividad biológica. Las cumarinas se encuentran libres en la naturaleza como metabolitos secundarios de algunas plantas superiores y microorganismos, están presentes en el té verde, la soya y la canela, principalmente en aceites esenciales como la lavanda y la acacia (Newman D. y col., 2003; Nair R. y col., 1991). Hasta la fecha se han encontrado más de 800 especies de plantas y microorganismos que producen cumarinas y se han descrito más de 100 derivados cumarínicos diferentes (National Toxicology Program, 1993). En las plantas las cumarinas se encuentran principalmente en las hojas y follaje actuando como repelentes a insectos y a algunos otros invertebrados terrestres (Mahecha V. y col., 1983). Estos compuestos comenzaron a utilizarse por el hombre más por sus cualidades aromatizantes que por sus actividades biológicas Finnegan R. y col., 1972).

La base estructural de las cumarinas (1,2 benzopirona) está formada por un anillo bencénico y un anillo heterocíclico tipo  $\delta$ -lactona (Figura 5). Este tipo de compuestos se encuentran principalmente en plantas pertenecientes a las familias *Clusiaceae*, *Leguminosae*, *Rubiaceae*, *Passifloraceae*, *Polypodiaceae* y *Compositae*.



**Figura 5. Estructura química del núcleo cumarínico**

En 1820 Vogel aisló la cumarina (1,2H benzopirona, figura 5) por primera vez del haba Tonka (*Coumarona odorata*) de la Guayana. En 1868 W.H. Perkin la obtuvo por síntesis química

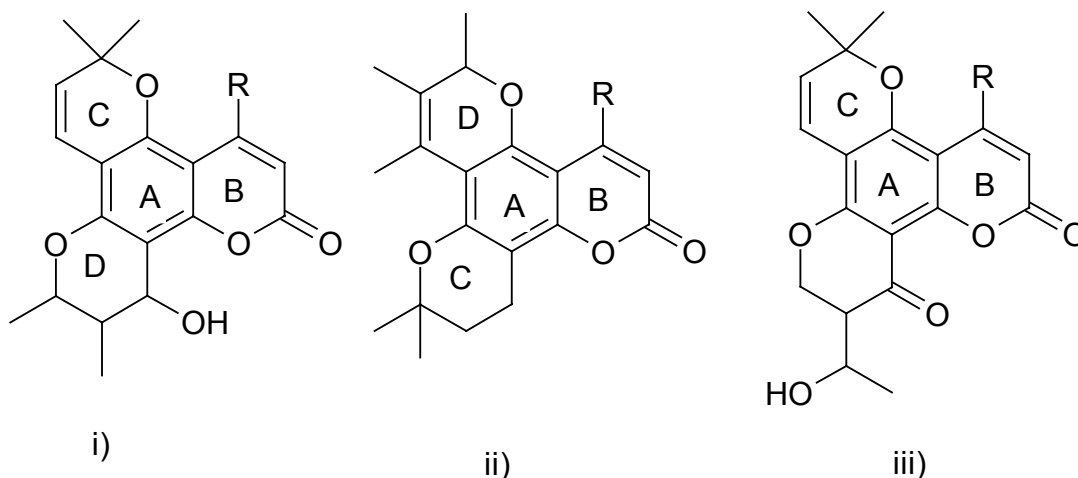
(Murray J, 1992). Estos productos han despertado gran interés debido al amplio rango de actividad biológica que presentan (Matern U., 1999). La cumarina, conocida por sus propiedades antiedematosas, se ha utilizado en estudios clínicos en pacientes con cánceres avanzados: es inmunoestimulante y posee actividad citotóxica (Bruneton J., 2001).

## 2.2.1 Clasificación de las cumarinas

Dentro de las cumarinas aisladas de *Calophyllum* spp, los calanólidos son los compuestos más conocidos, sin embargo se han obtenido otras cumarinas de éste género, las cuales están estructuralmente relacionadas. Las cumarinas de *Callophyllum* actualmente se clasifican en 3 grupos (Mc Kee T. y col., 1998; Ishikawa y col., 1997; figura 6).

- Dipiranocumarinas tetracíclicas: cumarina (anillos A y B), 2,2-dimetilcromeno (anillos A y C) y 2,3-dimetilcroman-4-ol (anillos A y D). Se distinguen por que el anillo C posee un grupo *gem*-dimetilo, por ejemplo: (+)-calanólido A y (-)-calanólido B.
- Dipiranocumarinas tetracíclicas donde los anillos de pirano C y D están invertidos, esto es, el grupo *gem*-dimetilo se encuentra en el anillo D, por ejemplo: pseudocalanólidos.
- Piranocumarinas tricíclicas, las cuales contienen un sustituyente no ciclizado equivalente al anillo D.

Los compuestos pertenecientes a cualesquiera de los grupos anteriores, pueden además variar con respecto al sustituyente (R) en C-4, el cual puede ser: metil, *n*-propil o fenil



**Figura 6. Tipos de cumarinas aisladas en diferentes especies de *Calophyllum* spp. R= propil, fenil ó metil. Tomado de Crombie L y col., 1966)**

Adicionalmente a la clasificación de las cumarinas aisladas del género *Calophyllum*, existe otra clasificación para las cumarinas aisladas del género *Mammea*, el cual al igual que el género

*Calophyllum* es miembro de la familia *Guttiferae*. Dicha clasificación fue propuesta por Crombie y colaboradores en 1966; e incluye un sistema de nomenclatura con letras, donde a todos los compuestos se les antepone la palabra “mammea” seguido por una clave compuesta por 3 letras alusivo a la posición y tipo de sustituyente (figura 7). Las cumarinas tipo mammea no solo se han aislado de especies de *Mammea*, sino también de especies relacionadas como *Calophyllum* y *Mesua*.

A continuación se describe la forma en que se da el nombre a las cumarinas tipo mammea:

1. El nombre mammea es seguido por una letra que designa el tipo de sustituyente localizado en el C-4:

A = fenilo

B = propilo

C = pentilo

D = 1-metilpropilo

E = 1-acetoxipropilo

2. Una diagonal separa a esta letra de la segunda letra, la cual indica si el sustituyente acilo está presente, así como la posición de éste con respecto al sustituyente prenilo:

A = 6-acilo

B = 8-acilo

3. Una tercera letra define el tipo de sustituyente acilo:

A = 3-metilbutiril

B = 2-metilbutiril

C = butiril

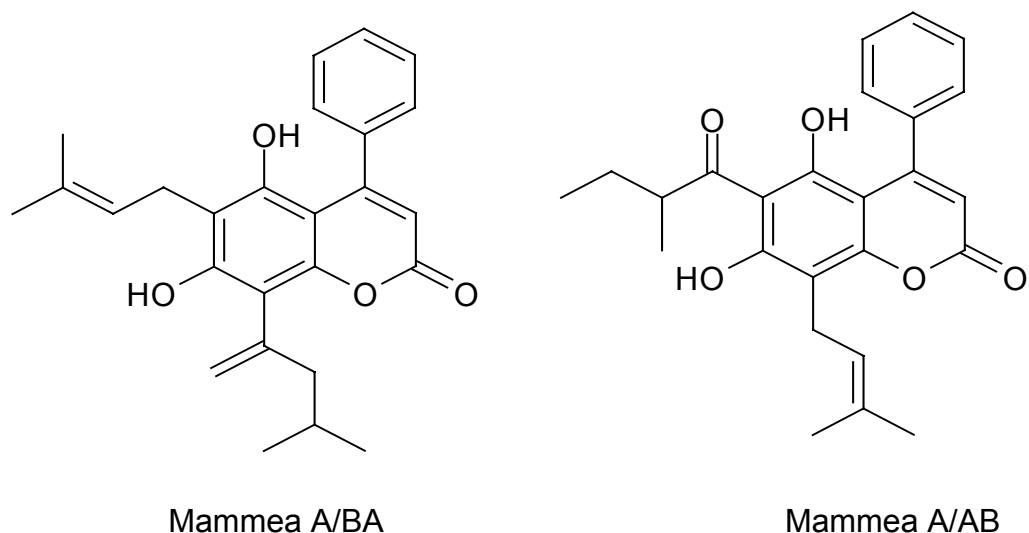
D = 2-metilpropionil

4. En los casos en donde el sustituyente prenilo se ha modificado por ciclización, la tercera letra es seguida por el prefijo ciclo y una cuarta letra indica el tipo de heterociclización:

Ciclo D = 2,2-dimetilcromeno

Ciclo E = 3-hidroxi-2,2-dimetildihidropirano

Ciclo F = 2-(1-hidroxi-1-metiletil)dihidrofurano



**Figura 7. Estructura química de cumarinas aisladas de las especies de mammea. Tomado de Crombie L. y col., 1967**

### 2.2.2 Actividad citotóxica de las cumarinas

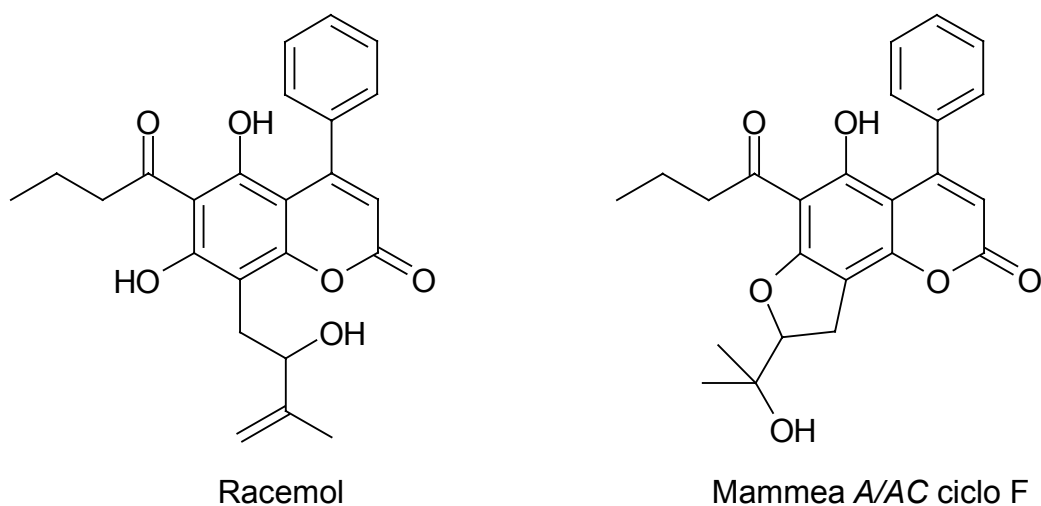
Varios autores han reportado el uso de cumarinas (1,2-benzopironas) o su metabolito 7-hidroxycumarina, para el tratamiento de algunos carcinomas humanos, por ejemplo Thormes y su grupo de trabajo en 1994, al utilizar una dosis de 50 mg diarios durante 2 años de cumarina (1,2-benzopirona) y warfarina (4-hidroxycumarina) en el tratamiento de melanoma maligno observó que se podía prevenir y disminuir la expresión de éste tipo de cáncer. Este fue un estudio multicéntrico, prospectivo, doble ciego y aleatorio; se realizó después de una cirugía donde sólo 4 de los 13 pacientes tratados con las cumarinas fueron reincidentes al cáncer, en contraste con los tratados con placebo donde 10 de 14 pacientes fueron reincidentes (Thormes R. y col., 1994).

El grupo de investigación de Kahn y colaboradores en el mismo año indujeron la expresión del oncogen *ras* en células MTV-EJras, tratadas con dexametasona, este fármaco incrementó el porcentaje de células en fase S (del 21% al 31%) comparado con células tratadas con buffer de fosfatos. La cumarina (1,2-benzopirona) redujo el porcentaje de células en fase S, previamente tratadas con dexametasona, del 31% al 19%, con un incremento concomitante del porcentaje en células en fase G1/G0 comparado con los niveles del control. De éste experimento se concluyó que la cumarina disminuye significativamente la progresión del ciclo celular de las células MTV-

EJras y disminuye la expresión del gen *ras* tanto en fase G1 como en fase S (Kahn J. y col., 1994).

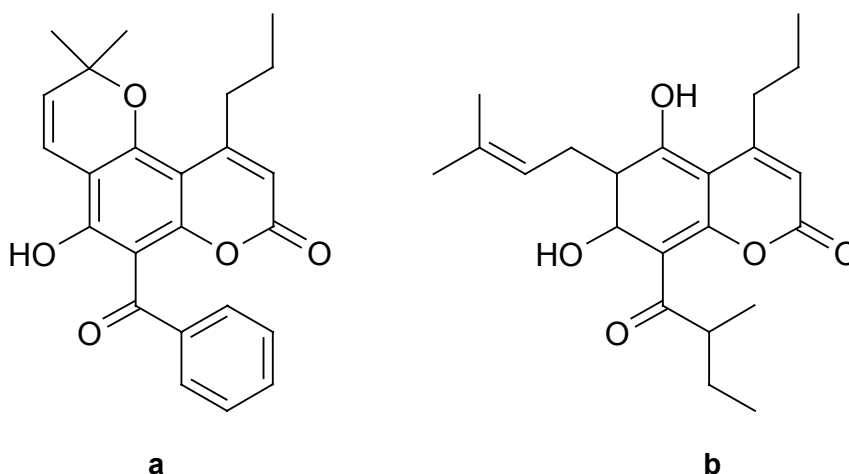
Estudios realizados por varios investigadores han señalado que las cumarinas tiene efectos citotóxicos sobre diversas líneas celulares humanas cancerosas; por ejemplo, Morel y colaboradores en 1999 reportaron el efecto citotóxico de dos cumarinas, aisladas de *Mesua racemosa* (*Clusiaceae*), en la línea celular KB (células de carcinoma epidermoide oral humano), ambos compuestos fueron ligeramente citotóxicos con un 49% de inhibición del crecimiento celular (10 µg/mL= 24 µM) en el caso el racemol y para la mammea A/CA ciclo F con un 32% (10 µg/mL=24 µM) (Morel C. y col., 1999, Figura 8).

Kawaii y colaboradores en el 2001 examinaron los efectos antiproliferativos de un gran número de cumarinas, algunas de las cuales son cumarinas simples, cumarinas mono, dihidroxiladas ó metoxiladas, cumarinas isopenteniladas, pirano o furanocumarinas, tanto de origen natural como sintéticas, en 4 líneas celulares tumorales y 2 líneas celulares de origen no tumoral (Kawaii S. y col., 2001-3B). El mismo grupo de investigación examinó el efecto antiproliferativo de 21 cumarinas usaron líneas celulares de carcinoma de pulmón A549, de leucemia humana CCRF-HSB-2 y de cáncer gástrico humano resultado de una metástasis de nódulo linfático TGBC11TKB (Kawaii S. y col., 2001-2A). Encontraron que los sustituyente hidroxilos en las posiciones 6 y 7 del núcleo cumarínico son importantes en la actividad antiproliferativa, entre los compuestos analizados se encuentra la esculetina. Las células tratadas con esculetina presentaron un arresto en la fase G1 a 400 µM.



**Figura 8. Cumarinas con efectos citotóxicos en la línea celular KB. Tomado de Morel C. y col., 1999**

En el 2003, Ito y colaboradores encontraron 3 nuevas cumarinas en la corteza de *Calophyllum brasiliense* colectado en Brasil a las cuales les dieron el nombre de brasimarinas A, B, y C; dos de estas nuevas cumarinas son del tipo mammea. Analizaron la actividad quimiopreventiva de dichas cumarinas, donde se observaron los efectos inhibitorios de estos compuestos sobre tumores inducidos en células Raji, por el virus Epstein-Barr, estimulados por TPA (12-O-tetradecanoilprobol-13-acetato). La brasimarina A (figura 9a) presentó una  $IC_{50}$  de 349  $\mu$ M siendo menos potente que la cumarina mammea B/BB (figura 9b) con una  $IC_{50}$  de 170  $\mu$ M (Ito C. y col., 2003).

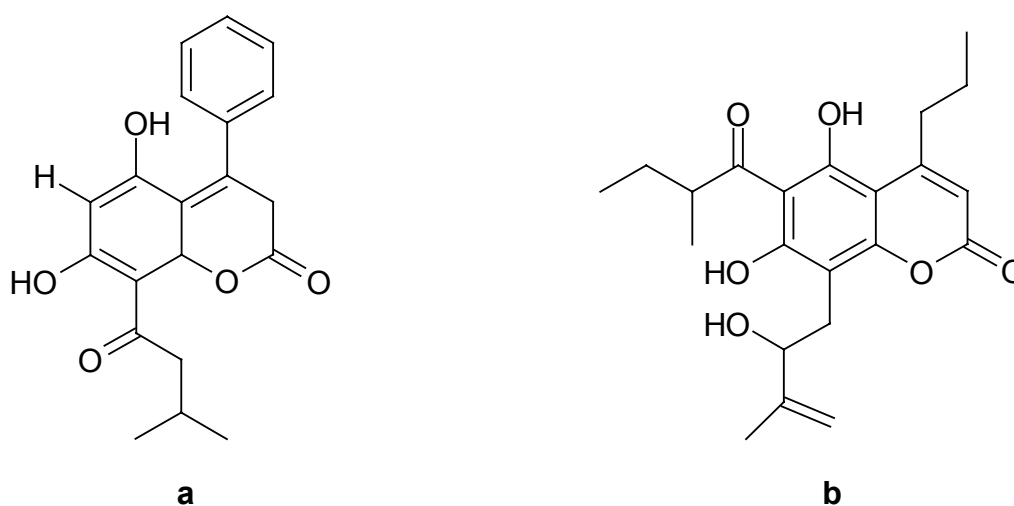


**Figura 9 Estructura química de (a) Brasimarina A y (b) mammea B/BB. Tomado de Ito C. y col., 2003**

Estudios realizados por Guilet y colaboradores en el 2001 sobre las cumarinas aisladas de *Calophyllum dispar* han demostrado que este tipo de compuestos tienen efectos citotóxicos en células KB donde las cumarinas presentaron un significativo efecto inhibitorio del 50% en el crecimiento celular a una concentración de 4 a 8  $\mu$ g/mL. Entre los compuestos analizados está el isodispar B (figura 10a), una cumarina 5,7-dihidroxilada que presenta un sustituyente 3-metil-1-oxobutilo en C-8 y un grupo fenilo en C-3 ( $IC_{50}$  8  $\mu$ g/mL). Otro de los compuestos estudiados es el disparpropylinol B (figura 10b), que es también una cumarina 5,7-dihidroxilada, con una  $IC_{50}$  de 4  $\mu$ g/mL que presenta como sustituyente en C-3 un grupo propilo, en C-6 un sustituyente 2-metil-1-oxobutil y en C-8 un sustituyente 3-metil-2-hidroxil-3-buteno, de este estudio se concluyó que aunque las estructuras químicas de los compuestos estudiados están poco relacionadas, ambos compuestos se pueden considerar como agentes citotóxicos potentes (Guilet y col., 2001).



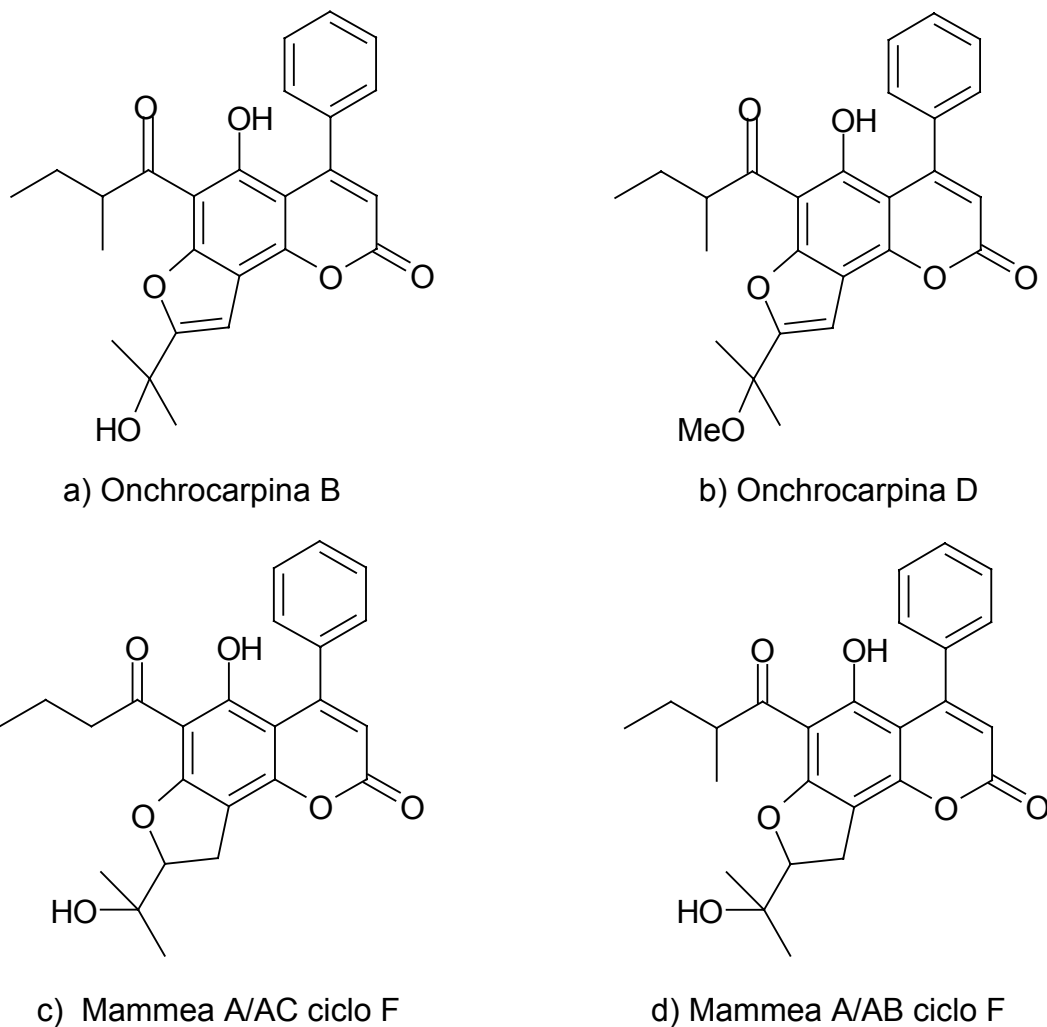
En el 2002, Chaturvedula y col., obtuvieron un extracto con actividad citotóxica de la planta *Onchocarpus punctatus* de donde aislaron nuevas cumarinas a las que llamaron onchrocarpinas A-G, en la figura 11a y 11b se muestran las estructuras químicas de las onchrocarpinas A y D, para estos compuestos se reportaron  $IC_{50}$  de  $3.8 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  (onchrocarpinas B) y  $6.3 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$  (onchrocarpina D), como puede observarse la estructura química se encuentra muy relacionada y al parecer la variación en el sustituyente 1-metoxi-1-metil-etil en C-8 de la onchrocarpina D hace que la actividad se disminuya en comparación con las otras onchrocarpinas que presentan un sustituyente 1-hidroxí-1-metil-etil en la misma posición. En cuanto a las cumarinas tipo mammea se reportaron  $IC_{50}$  de  $4.4 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$  para la mammea A/AC ciclo F (figura 11c) y de  $8.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  para la mammea A/AB ciclo F (figura 11d), tal efecto puede atribuirse al impedimento estérico que ejerce el grupo metilo adicional en éste último compuesto. Las células usadas en el ensayo de citotoxicidad fueron A2780 de cáncer de ovario.



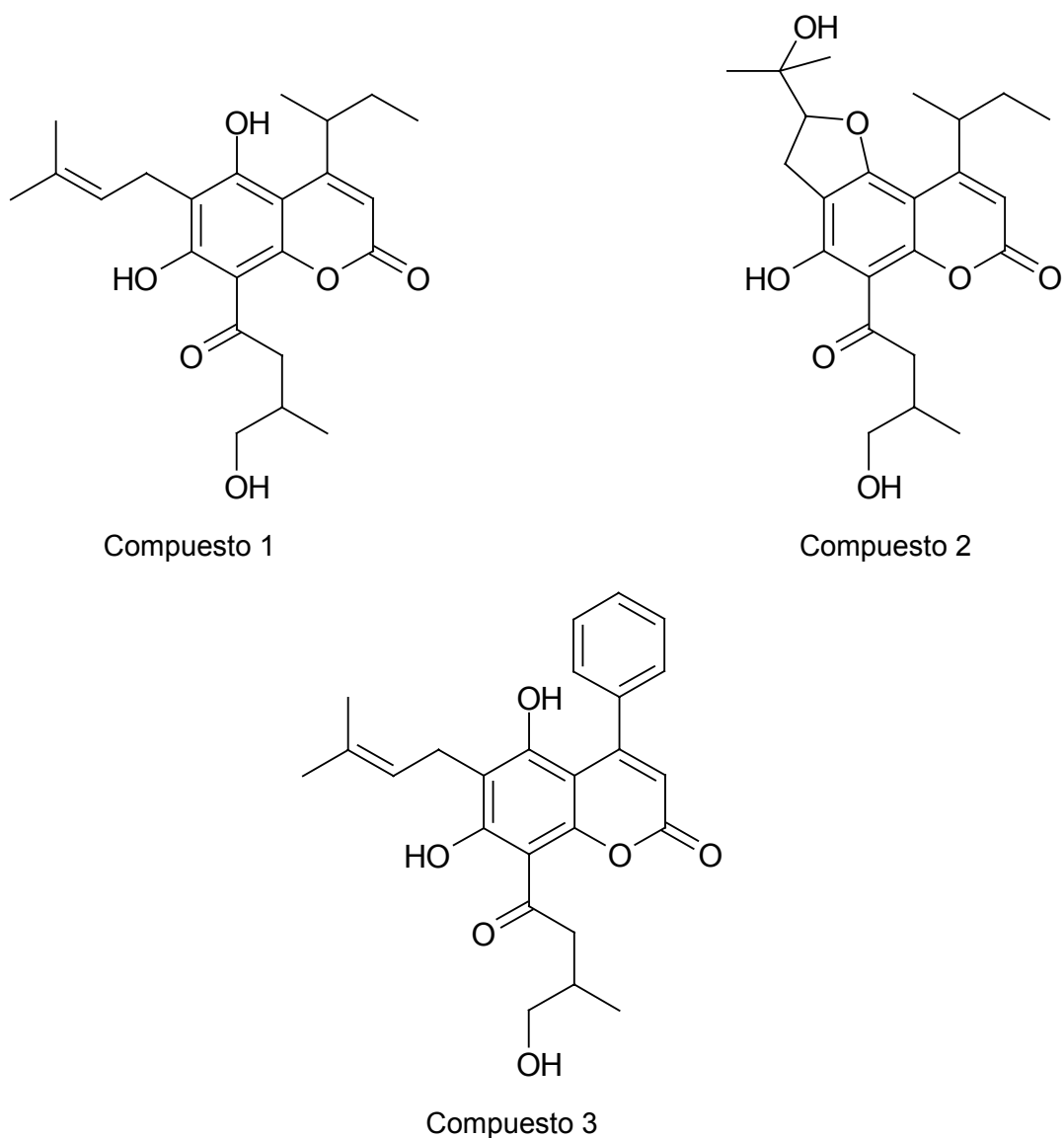
**Figura 10. Estructuras químicas de los compuestos a) Isodispar B ( $IC_{50}$  8  $\mu\text{g/mL}$ ) y b) disparpropylinol B ( $IC_{50}$  de 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Tomado de Guilet y col., 2001.**

En un programa de búsqueda continua de nuevos agentes anticancerígenos, Elita y colaboradores en el 2003, reportaron que el extracto de la corteza de *Kielmeyera albopunctata* presentaba una actividad citotóxica moderada ( $IC_{50}$  de 11.1 a 20  $\mu\text{g/mL}$ ), posteriormente purificaron los compuestos que estaban presentes en este extracto y aislaron los compuestos 1, 2 y 3 (figura 12), en el estudio de citotoxicidad realizado se observó que el que presentó la menor actividad citotóxica (mayor a 20  $\mu\text{g/mL}$ ) fue el compuesto 2 que tiene un heterociclo en la posición 5 y 6 del núcleo cumarínico, otra de las observaciones que se hizo fue que, en éstos compuestos, el sustituyente en la posición 4 no interfiere con la actividad ya que el compuesto 1

presenta un sustituyente metilpropil en C-4 ( $IC_{50}$  de 16.25  $\mu\text{g/mL}$ ) y el compuesto 3 un sustituyente fenilo en la misma posición ( $IC_{50}$  17.85  $\mu\text{g/mL}$ ). En este ensayo se empleó un panel de células que incluyen células KB, Lu1 (de cáncer de pulmón humano), Col2 (de cáncer de colon humano) y LNCaP (de cáncer de próstata humana).



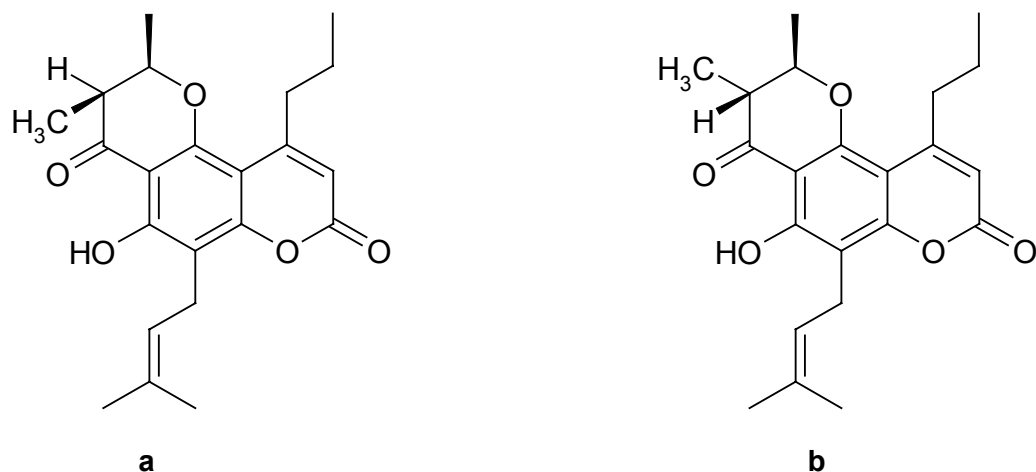
**Figura 11. Estructura química de las onchrocarpinas B y D, y de los compuestos tipo mammea A/AC ciclo F y A/AB ciclo F. Tomado de Chaturvedula y col., 2002.**



**Figura 12. Estructuras químicas de los compuestos 1, 2 y 3. Tomado de Elita S. y col., 2003)**

Por otra parte, entre los compuestos aislados por Ya-Ching Shen y col., en el 2004 se encontraron dos nuevos derivados dihidrocumarínicos a los que dieron el nombre de isorecedensolide (figura 13 a) y su isómero recedensolide (figura 13 b) estos compuestos presentan un heterociclo en la posición 5 y 6, y una masa molecular de 372; la única diferencia en las estructuras químicas es la orientación de los sustituyentes del C-7. A estos compuestos se les realizó un ensayo de citotoxicidad usando células KB, células HeLa (de carcinoma epiteloides cervical humano) y células Med (de meduloblastoma humano), el panel de células fue expuesto a los compuestos durante 72 h. Se obtuvo la  $IC_{50}$  para cada una de las líneas celulares para el compuesto isorecedensolide (9.89  $\mu\text{g/mL}$  en HeLa y 11.79  $\mu\text{g/mL}$  en Med) y para el compuesto recedensolide (6.27  $\mu\text{g/mL}$  en HeLa y 12.49  $\mu\text{g/mL}$  en Med), lo que nos permite

visualizar que la orientación de los sustituyentes en la posición del carbono 7 tiene un efecto poco variable en estos los estudios de citotóxicidad, ya que los compuestos analizados son isómeros y en una purificación de los mismos no se puede asegurar que se tenga sólo uno de los isómeros.

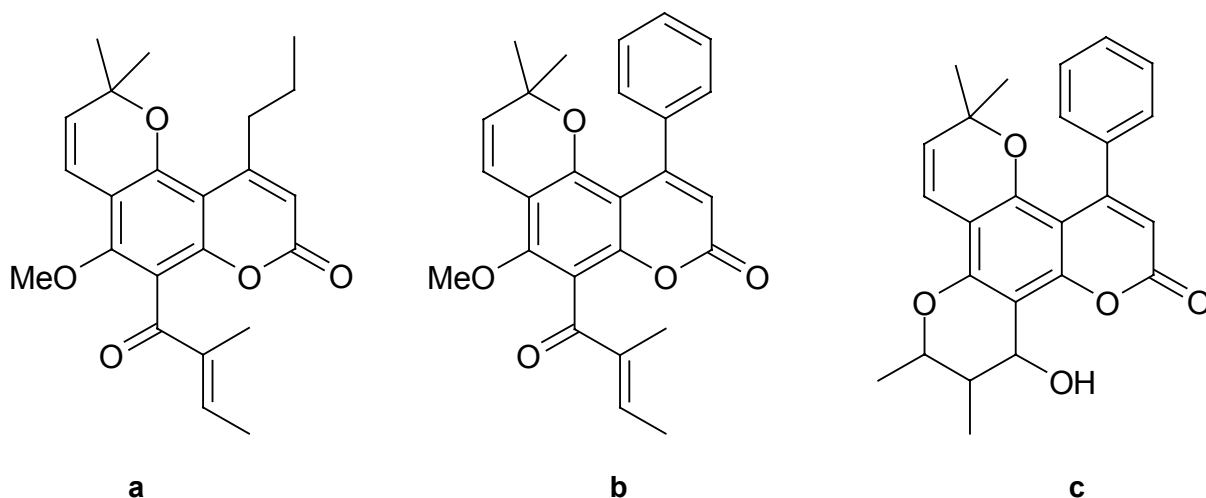


**Figura 13. Isómeros dihidrocumarínicos obtenidos a partir del extracto de *Calophyllum blancoi*. a) isorecedensolide y b) recedensolide). Tomado de Ya-Ching S. y col., 2004.**

Estudios realizados por Reyes-Chilpa y colaboradores en el 2004, con las cumarinas de tipo mammeas A/BA, A/BB, C/OB, B/BB ciclo F, B/BB ciclo F e isomammeigina aisladas de *Calophyllum brasiliense*, probados en un estudio *in vitro* con líneas celulares tumorales como K562, U251 y PC3, mostraron que la mezcla de mammeas A/BA+A/BB presentaron un efecto citotóxico en las líneas celulares con una  $IC_{50}$ , de 0.34 a 4.05  $\mu$ M, mayor que los otros tipos de mammea como C/OA + C/OB los cuales mostraron una  $IC_{50}$  de 1.59 a 1.91  $\mu$ M en estas mismas líneas celulares (Reyes-Chilpa y col., 2004).

En el 2005 Shinya K. y col., aislaron varios compuestos de la corteza de *Calophyllum brasiliense*, dos de ellos son cumarinas tricíclicas, uno es el compuesto GUT-70 (figura 14a) y el otro es el calophyllolide (figura 14b) ambos presentaron actividad citotóxica de manera dependiente a la concentración (0 a 30  $\mu$ M) donde se emplearon células BV173 (células de leucemia); se determinó la  $IC_{50}$  para cada uno de los compuestos: de 3  $\mu$ M para GUT-70 y 9  $\mu$ M para el calophyllolide. El compuesto GUT-70 resultó ser más potente que el compuesto calophyllolide, en cuanto a la inhibición del crecimiento celular, lo que puede atribuirse a que en su estructura química tiene un sustituyente propilo en C-4 del núcleo cumarínico y el compuesto calophyllolide tiene un sustituyente fenilo en la misma posición. También se encontraron cumarinas

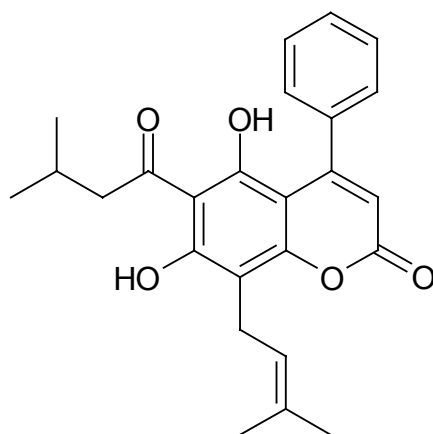
tetracíclicas (figura 14c) pero no mostraron inhibición en el crecimiento celular (Shinya K. y col., 2005).



**Figura 14. Estructuras químicas de las cumarinas tricíclicas a) GUT-70, b) Calophyllolide y c) cumarina tetracíclica. Tomado de Shinya K. y col., 2005**

### 2.2.3 Propiedades antibacterianas de la cumarina mammea A/AA

En el 2004, el grupo de Yasunaka K., aisló las cumarinas mammea A/AA y A/BA de las cáscaras del fruto de la *Mammea americana* y evaluó su potencial como agentes antibacteriales, en la figura 15 se muestra la estructura de la mammea A/AA previamente aislada y caracterizada (Yasunaka K y col., 2004).



**Figura 15. Estructura de la mammea A/AA. Tomado de Yasunaka K. y col., 2005**

En el análisis realizado por el grupo de Kakuko Yasunaka el compuesto mammea A/AA tuvo actividad contra *Staphylococcus aureus*, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 8

$\mu\text{g/mL}$  mucho menor que la que se reportó para la oxacilina ( $512 \mu\text{g/mL}$ ) (Yasunaka y col., 2005).

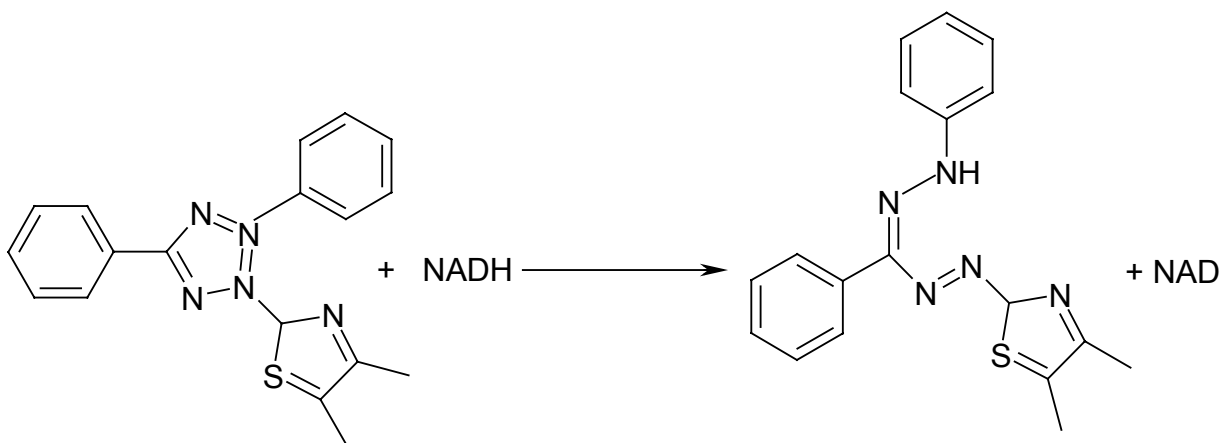
Previamente, en 1998 Frame y colaboradores determinaron su actividad antibacteriana y reportaron que el extracto etanólico de las hojas de *Mammea americana* tuvo alta actividad antimicrobiana ( $50 \mu\text{g/disco}$ ) contra *Mycobacterium smegmatis* y *M. tuberculosis* (Frame A. y col., 1998).

## **2.7 La técnica del MTT como ensayo de viabilidad**

La técnica del MTT es una de las más utilizadas y provee una forma rápida y fácil de medir la viabilidad celular, se basa en la capacidad de las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua y de color amarillo, a un compuesto insoluble en agua y de color púrpura (formazán del MTT, figura 16), la reducción del MTT es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Mossmann T., 1983; Alley M. y col., 1988; Plumb. J. y col., 1989).

En 1991 Vistica y colaboradores descubrieron 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; sin embargo, no existen datos certeros para afirmar que la mitocondria sea el único sitio donde se lleva a cabo la reducción del MTT, puesto que este compuesto también acepta electrones de sustratos reducidos y coenzimas tales como el NADH y NADPH (Vistica D. y col. 1991).

Este ensayo se usa como un indicador de la función mitocondrial en células vivas y sirve como herramienta para medir indirectamente la viabilidad. Se ha reportado que los resultados de esta prueba son comparables en sensibilidad con aquellos obtenidos usando la incorporación de [ $^3\text{H}$ ] timidina (Mossmann T. 1983).



**Figura 16 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. Tomado de Plumb J. y col., 1989.**

### III. OBJETIVOS

#### **Objetivo general**

- Evaluar la actividad citotóxica de la ciclommeisina obtenida a partir de la ciclización de la mamma A/AA

#### **Objetivos específicos**

- Aislar la cumarina mamma A/AA de la cáscara del fruto del árbol *Mammea americana* e identificarla por métodos espectroscópicos.
- Modificar estructuralmente a la cumarina mamma A/AA a partir de una reacción de ciclización en medio ácido para obtener como producto el compuesto ciclommeisina.
- Caracterizar por métodos espectroscópicos (IR, <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN) a la ciclommeisina.
- Determinar la IC<sub>50</sub> de la ciclommeisina, por medio de ensayos *in vitro*, en líneas celulares humanas: colon (SW620, SW480); cérvix (HeLa, C33), MCF7 (mama) y K562 (eritroleucemia) empleando la técnica de MTT.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Parte orgánica

#### 4.1.1 Extracción de los principios activos

Originalmente se partió de extractos obtenidos previamente de la cáscara de la semilla del fruto que produce el árbol de *Mammea americana*. Estos extractos fueron obtenidos exponiendo 53.9 g del material orgánico en un litro de cada uno de los disolventes de diferente polaridad: hexano, acetona y metanol, a temperatura ambiente. Para identificar los constituyentes químicos presentes en los extractos se realizaron cromatografías de capa fina (CCF), misma que se llevó a cabo en placas de gel de sílice de fase normal de 0.25 mm de espesor (Merck). Se realizaron ensayos para determinar el ó la mezcla de disolventes que formarían la fase móvil que permitiera una buena separación de los componentes de cada uno de los extractos. Las placas de CCF fueron reveladas con luz ultravioleta (UV) y sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 1 N.

A los extractos se les asignó una clave para facilitar la identificación de las muestras.

Extracto hexánico	Extracto 1
Extracto acetónico	Extracto 2
Extracto metanólico	Extracto 3

Se utilizaron 4.9 g de extracto 1, 25.2 g del extracto 2 y 7.5 g del extracto 3. Se procedió a realizar la separación de los componentes de cada uno de los extractos, por medio de la comparación de las manchas obtenidas en las placas de CCF.

Se observó que los extractos hexánico y acetónico contenían compuestos de características semejantes, dado que las manchas que se observaron presentaron un valor de factor de retención ( $R_f$ ) similar; para la separación de los compuestos se usó como fase móvil diclorometano. El factor de referencia se determinó para los compuestos aislados de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$R_f = \frac{\textit{Distancia recorrida por el compuesto}}{\textit{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Debido a lo anterior se decidió unificar las fracciones mencionadas para trabajarlas como una sola y poder realizar una separación de sus componentes por medio de una cromatografía en columna (CC) acoplada al vacío, usando gel de sílice 60 (Merk). En esta modalidad de cromatografía la columna se adapta al vacío lo que permite que la separación de los compuestos sea más rápida. Los extractos 1 y 2 se disolvieron completamente en la menor cantidad posible de acetona y se adicionaron a 150 g de celita. La celita se usa para adsorber el extracto y facilitar la separación del mismo. Se deja evaporar a temperatura ambiente todo el disolvente empleado.

Posteriormente la columna fue empacada con gel de sílice 60 (Merk) previamente hidratada con hexano, tratando que el empacamiento fuese lo más uniforme posible; se adicionó el extracto adsorbido en celita y se empezó a eluir con la fase móvil.

La fase móvil que se utilizó fue una mezcla de disolventes en la que se incrementó de polaridad empezando por hexano, luego mezclas de hexano con acetato de etilo y finalmente metanol.

De la separación por CC se obtuvieron diferentes fracciones (de aproximadamente 1000 ml cada una), el criterio que se tomó en cuenta para determinar el cambio de polaridad del eluyente fue la intensidad del cambio de color de las fracciones recolectadas, ya que se asumió que la cantidad de compuestos presentes (de polaridad similar) ya se estaban agotando; lo que era evidente en la disminución de la intensidad de color observado.

Considerando el volumen de las fracciones colectadas se procedió a concentrarlas por medio de un equipo de rotación/evaporación (Buchi). Se les realizó una CCF para observar la pureza de las mismas debido a que la muestra proviene de un producto natural y puede tener una gran cantidad de constituyentes que tengan polaridad similar.

Se colectaron 20 fracciones, a continuación las fracciones que presentaron una composición homogénea se procedió unificarlas y a purificarlas por medio de una recristalización debido a que en la placa de CCF se observaron manchas con el mismo R<sub>f</sub>, usando como control una muestra de mammea A/AA pura (mammeisina) como referencia en la búsqueda de este compuesto en la cáscara del fruto de *Mammea americana*.

De estos ensayos se observó que las primeras fracciones (de la 1 a la 5) obtenidas a partir de la elución con una mezcla de hexano:acetato de etilo (80:20) tenían composición similar entre ellas, de donde se obtuvo un precipitado de color amarillo, este producto se obtuvo por precipitación espontánea. Además se indujo la recristalización de las aguas madres usando como disolvente acetona y como inductor de la cristalización hexano frío, esto se llevó a cabo en un baño de hielo; de donde se obtuvieron cristales amarillos. Mismos que se secaron al vacío, y se le realizaron las pruebas necesarias para su caracterización. La parte del compuesto remanente soluble en hexano se dejó que precipitara en forma de polvo amarillo que se procedió a caracterizar. Este producto se identificó como AAA3K. Respecto a las fracciones de mayor polaridad, no se obtuvieron compuestos homogéneos.

Al extracto 3 se le realizaron pruebas de solubilidad para obtener por precipitación espontánea, algún compuesto presente en cantidades saturables que al disolverse se formaran agregados homogéneos y precipitaran finalmente. De las pruebas de solubilidad se obtuvo que este extracto se disolvía bien en metanol por lo que se solubilizó y se dejó reposar durante una semana, manteniendo tapado el matraz que lo contenía con papel aluminio, para evitar la evaporación excesiva del disolvente; finalmente precipitó un polvo de color blanco al cual se procedió a caracterizar. Este producto fue rotulado con el nombre de K-02.

#### **4.1.2 Caracterización de los productos obtenidos.**

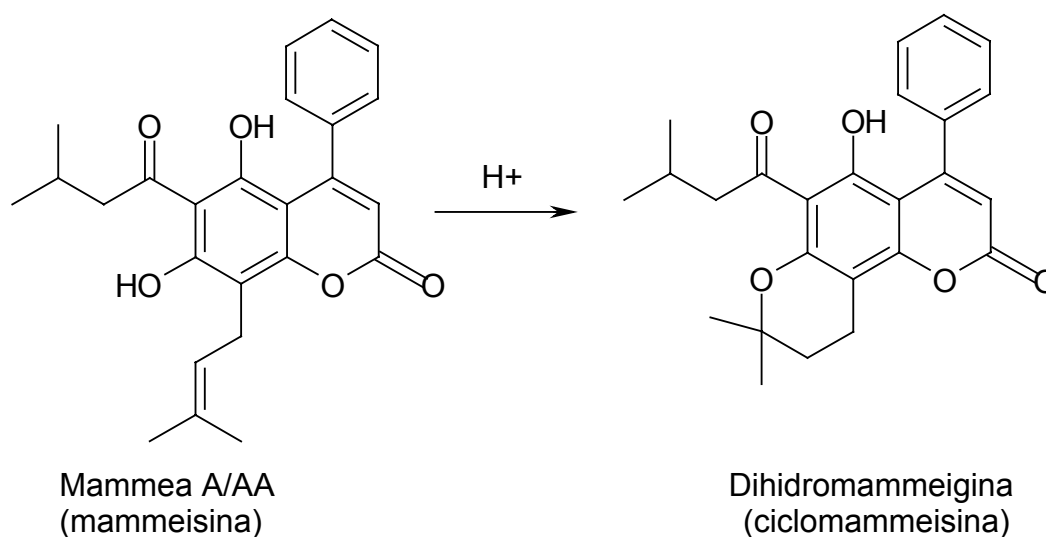
Por medio de la CCF se pudo comprobar que los compuestos que se encontraban en los extractos tenían estructuras aromáticas o instauraciones en su estructura molecular al observar las placas de CCF bajo luz ultravioleta (lámpara de rayos UV marca P. Elmer 552) y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 1N.

Para realizar la identificación de los productos obtenidos también se determinó el punto de fusión usando un aparato Fisher Johns, con una velocidad de calentamiento de 40 °C/min.

Se obtuvieron datos espectroscópicos de los compuestos obtenidos: espectroscopía de infrarrojo (espectrofotómetro Nicolet FT-JR 5 SX [IR]), resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (espectrómetro Gemini 200 MHz) y de  $^{13}\text{C}$  (Eclipse 300 MHz jeol (E)). Para obtener la espectrometría de masas de impacto electrónico (EMIE) se utilizó un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B

### 4.1.3 Modificación estructural de la mammeisina a ciclomammeisina

El compuesto identificado con la clave AAA3K es la mammea A/AA ó mammeisina, por lo que se procedió a realizar una ciclización en su estructura molecular, esto con la finalidad de obtener el compuesto ciclomammeisina. En la figura 17 se muestra la reacción que permite la obtención de la ciclomammeisina a partir de la mammeisina, ésta reacción se lleva a cabo en condiciones ácidas (Finnegan, 1965).



**Figura 17. Reacción de ciclización de la mammeisina para obtener ciclomammeisina. Tomado de Finnegan, 1965**

Para la obtención de la ciclomammeisina, se adicionaron 253 mg de mammeisina (clave AAA3K) en un matraz de fondo plano, 5 mL de ácido acético glacial y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, y con agitación constante se dejó reaccionar a temperatura ambiente (Finnegan R., 1965).

Se realizaron placas de CCF para monitorear el progreso de la reacción. El plaqueo se llevó a cabo al inicio de la reacción, para esto se hizo un ensayo con el fin de elegir la fase móvil ideal. Siendo la mezcla de hexano:acetato de etilo (1:1) la que proporcionó una mejor separación de las manchas mostradas. En esta placa se observaron manchas con el mismo Rf, tanto de la sustancia de referencia (mammea A/AA) como del producto de la reacción.

A las cuatro horas de iniciada la reacción se realizó un muestreo de la mezcla de reacción usando como fase móvil hexano:acetato de etilo (8:2). En la muestra se observó una sola mancha para la referencia y dos manchas no definidas en el carril de la mezcla de reacción.

Concluido el tiempo de la reacción (5 horas), según indica la bibliografía, se realizó una CCF de donde se observó la presencia de tres manchas, se trató de recrystalizar para obtener el producto mayoritario puro, sin embargo no se tuvo éxito. Debido a esto se optó por realizar la separación de los productos obtenidos por medio de una CC usando como fase móvil mezclas de hexano:acetato de etilo en aumento de polaridad. Se colectaron 12 fracciones de aproximadamente 100 mL, mismas que fueron monitoreadas por CCF. De las fracciones 6 a 9 se obtuvieron cristales amarillos que se evidenciaron en una sola mancha de las placas de CCF, por lo que se reunieron en una sola fracción, posteriormente por medio del rotavapor se extrajo la mayor cantidad de disolvente, lo que permitió una precipitación de manera espontánea de unos cristales en forma de aguja de color amarillo (clave MIM), a los cristales se les determinó el punto de fusión y se realizó  $H^1$ RMN, los espectros obtenidos se incluyen en el anexo A. Una vez obtenida la ciclomameisina se procedió al análisis de su actividad biológica en líneas celulares humanas.

## **4.2 Ensayos biológicos *in vitro***

### **4.2.1 Líneas celulares empleadas**

Entre las líneas celulares empleadas para el análisis del efecto biológico se encuentran algunas que tienen alto índice de prevalencia en los tipos de cáncer presentes en la población mexicana. De acuerdo al reporte del INEGI en el 2004, los tipos de cáncer más comunes entre las mujeres que causaron la muerte fueron el cérvico-uterino, en un 13.5% de los casos, y el 13.3% por cáncer maligno de mama; entre los varones, la mortalidad se debió al cáncer de tráquea, bronquios y pulmón que representa un 15.5%. Por otra parte entre la población infantil los tumores malignos son la quinta causa de muerte (6.1 por ciento del total de defunciones); la leucemia representa 54 de cada 100 defunciones por cáncer, en este grupo (INEGI, 2004)

A pesar de que los países industrializados presentan una mayor incidencia de casos de cáncer colorrectal, actualmente existe un aumento en la incidencia de este padecimiento en los

llamados países en vías de desarrollo. Tal es el caso de nuestro país, en donde la incidencia de cáncer de colon y recto ha aumentado en los últimos años (Mendoza-Rodríguez, 1996).

Debido a lo anteriormente mencionado se emplearon las siguientes líneas celulares, las cuales se obtuvieron de la colección del ATCC (American Type Culture Collection):

**HeLa:** Células de adenocarcinoma de cérvix que fueron aisladas de una paciente de raza negra de 31 años de edad. Es la línea celular más ampliamente estudiada de esta índole, tiene una forma de crecimiento adherente y posee la secuencia para el virus del papiloma humano<sup>18</sup>

**C33:** Células de adenocarcinoma de cérvix humano, derivada por Auersperg de una biopsia de cáncer cervical

**SW480:** Células de carcinoma de colon humano.

**SW620:** Células de adenocarcinoma colorrectal que provienen de una metástasis a partir de un nódulo linfático; aisladas de un hombre de raza caucásica de 51 años de edad (grupo sanguíneo A Rh +)

**K562:** Línea celular de leucemia mielógena humana, aisladas de una efusión pleural de una mujer de 53 años de edad.

**MCF7** Células aisladas de adenocarcinoma mamario humano, presenta ciertas características diferenciales de las células epiteliales de mamíferos, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógenos citoplasmáticos. Esta línea celular puede contener la información del virus de hepatitis tipo B o C.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas rutinariamente en medio D-MEM (Invitrogen®) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor. Además se complementó con aminoácidos no esenciales 10 mM de cada uno de ellos, penicilina G sódica 10000 µg/mL, sulfato de estreptomina 25 µg/mL, anfotericina B al 0.85% y piruvato de sodio 100 µM, todos de Invitrogen®. Los cultivos se mantuvieron incubados en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a una temperatura constante de 37°C y humedad relativa del 95%. La manipulación de las líneas celulares se realizó en una campana de flujo laminar y el material utilizado estaba en

condiciones estériles. Para su uso las soluciones y medios de cultivo estériles utilizados durante la manipulación de las líneas celulares fueron previamente atemperados a 37°C.

#### **4.2.2 Descongelamiento celular**

Para la preservación de las líneas celulares se mantienen en congelación en un contenedor de nitrógeno líquido y para reestablecer el cultivo celular se requiere del descongelamiento de cada una de las líneas celulares.

1. Se preparó el medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (ver la sección 5.3.2) y se colocaron 5 ml de medio D-MEM en una placa de cultivo celular de 5 cm de diámetro, previamente rotulada.
2. Cada una de las líneas celulares, contenidas en un criotubo, se descongelaron manualmente con la ayuda de temperatura corporal, hasta que se logró verter una pastilla de hielo con células en suspensión en la placa antes mencionada.
3. Las placas de cultivo se homogenizaron con movimientos circulares de manera uniforme.
4. Se incubaron entre 1.5 y 2 h monitoreando la adherencia de las células al fondo de la caja de cultivo con la observación bajo un microscopio invertido marca Olympus.
5. Al término de la incubación se eliminó el medio de cultivo, se adicionaron 4 ml de medio D-MEM fresco y se incubó por 24 h. Cuando se alcanzó una proliferación celular que cubría entre el 80 y el 90% del área del fondo de la placa de cultivo (confluencia del 80 al 90%), proceso que dura entre 2 y 3 días se procedió a la propagación o cosecha de las células.

#### **4.2.3 Propagación de líneas celulares**

Para obtener un cultivo celular plenamente establecido se procedió a propagar cada una de las líneas celulares de la siguiente manera:

1. Cuando se observó una confluencia entre el 80 y 90% se procedió a decantar el medio de cultivo.
2. Se lavó con 4 ml de PBS-EDTA y posteriormente se adicionó 1 ml de PBS-EDTA e incubó durante 5 a 7 min.

3. En seguida se resuspendió el contenido celular con la ayuda de una pipeta Pasteur.
4. Se alicuoto equitativamente la suspensión obtenida y se colocó en placas de cultivo. A cada caja se les adicionó 7 ml de medio
5. Se homogeneizó e incubó durante 24 h.
6. Fue necesario cambiar el medio de cultivo cuando se observó detritus en el medio de cultivo.

#### **4.2.4 Mantenimiento de líneas celulares *in vitro***

1. Se decantó el medio contenido en la placa de cultivo, posteriormente se adicionaron 4 ml de PBS pH 7.4 para enjuagar, el cual fue descartado y se adicionaron 7 mL de medio D-MEM
2. Se incubó a 37°C durante 24 h.
3. Transcurrido éste tiempo se observó al microscopio el crecimiento y aumento de la población celular.

#### **4.2.5 Cosecha de células**

Cuando se observó que la superficie del cultivo celular se encontraba entre el 80% y el 90% de confluencia se procedió a la cosecha de células.

1. Se decantó el medio D-MEM contenido en la caja de cultivo, posteriormente se enjuagó con 1 ml de PBS-EDTA.
2. En seguida se adicionaron 1.5 ml de PBS-EDTA e incubó de 7 a 10 minutos y se realizó un desprendimiento de las células con una pipeta Pasteur.
3. La suspensión celular se recolectó en un tubo falcon estéril
4. Se procedió a realizar una dilución de la suspensión celular, esto para facilitar el conteo. Generalmente se hace una dilución 1:5 ó 1:10, dependiendo de la densidad celular, usando medio D-MEM

#### **4.2.6 Conteo celular**

Se determinó el número de células una vez que se cosecho el cultivo de cada una de las líneas celulares en un hemocitómetro de la siguiente manera:

1. Se homogeneizó la suspensión celular diluida que se había cosechado
2. Previa limpieza del hemocitómetro (cámara de Neubauer), se adicionó una gota de suspensión celular entre la superficie de la cámara y el cubreobjetos y dicha cámara se llenó por capilaridad.



3. Se dejó reposar la cámara aproximadamente durante 2 minutos para favorecer el asentamiento celular.
4. Se realizó un conteo de las células en los cuatro cuadrantes mayores (ver figura 17).
5. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el número de células por mililitro, usando la siguiente expresión matemática:

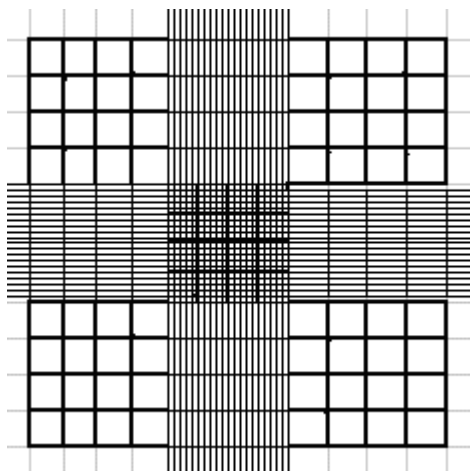
$$N = \frac{(C)(1 \times 10^4)}{4}$$

Donde:

**N** = densidad celular (células/mililitro)

**C** = Número de células contadas en cuatro cuadrantes

**1x10<sup>4</sup>** = Factor de relación de número de células encontradas por mililitro (determinada de acuerdo a las dimensiones del área en la cual se contaron las células, se dividió por cuatro para obtener el promedio de células contadas).



**Figura 17** Esquema del hemocitómetro, el conteo se realiza en los cuadrantes mayores los cuales son aquellos que están en las esquinas del hemocímetro y a su vez tienen 16 subdivisiones.

#### **4.2.7 Citotoxicidad en cultivos de líneas celulares tratadas con ciclomameisina a diferentes concentraciones**

Para éste ensayo se emplearon los siguientes controles:

Control: Se usó una suspensión celular en medio de cultivo.

Control disolvente: como límite máximo 0.7 µL de DMSO por cada 250 µL de medio de cultivo (0.28%)

Control positivo: Taxol a una concentración de 0.25  $\mu\text{M}$  que proporciona una inhibición celular entre 30 al 60% en las líneas celulares C33, HeLa, SW480, SW620, K562 y MCF7

Teniendo una suspensión de cada una de las líneas celulares con una confluencia de entre el 80 y 90% se procedió a cosechar y posteriormente a contar el número de células presentes en cada una de las suspensiones celulares. Y, se procedió de la siguiente manera.

1. En cada pozo de la caja con 96 pozos se colocó la cantidad suficiente de la suspensión celular, para tener aproximadamente 6500 células por pozo (entre 20 y 50  $\mu\text{L}$  aproximadamente).
2. Se completó con medio D-MEM hasta un volumen de 200  $\mu\text{L}$ .
3. Se procedió a incubar durante 24 h, en éste tiempo el inóculo inicial de la población de células empezó a crecer en forma exponencial lo cual es recomendable para que inicie la exposición de las células con el compuesto a probar.
4. Transcurridas las 24 h el compuesto ciclomameisina se disolvió en DMSO , y a partir de una solución de trabajo, que se diluyó en medio D-MEM, se prepararon las concentraciones de 5, 10 , 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  de manera que la cantidad a adicionar fuese de 50  $\mu\text{L}$  a cada pozo; teniendo 6 pozos para cada una de las concentraciones
5. Después de adicionar el compuesto ciclomameisina se incubó durante 72 h, transcurrido este tiempo se realizó el ensayo de viabilidad celular.

#### **4.2.8 Determinación de la viabilidad por MTT en cultivos de líneas celulares tratadas con ciclomameisina**

Al término del tiempo de exposición al compuesto de prueba se realiza el siguiente procedimiento:

1. A las microplacas de 96 pozos adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de solución de MTT (2.5 mg/mL), se incubaron durante 4 h. En este tiempo se lleva a cabo la reducción del MTT.
2. Se decantó el medio de cultivo contenido de las microplacas y se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de DMSO para solubilizar los cristales de formazán precipitados.
3. Se leyeron las microplacas con un lector de microplacas con un filtro de 540 nm y se realizaron los cálculos empleando la siguiente expresión matemática.

$$\% \text{ Inh} = 100 - \frac{(LP)(100)}{LC}$$

Donde:

% Inh= Porcentaje de inhibición de viabilidad

LP= Densidad óptica del problema

LC= Densidad óptica del control

Para la obtención de la IC<sub>50</sub> del compuesto, en cada una de las líneas celulares, se realizó un análisis de regresión no lineal a partir de los datos del % de inhibición en función de la concentración de la ciclomammeisina, usando el programa de computo Origin 5.0 (Lab Pro®, Los Angeles USA).

### 4.3 Preparación de soluciones

En seguida se menciona la forma de preparación de las soluciones empleadas en los ensayos para determinar la citotóxicidad del compuesto en las diferentes líneas celulares.

#### 4.3.1 Reactivo de MTT (2.5 mg/mL).

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma)	50 mg
Buffer de fosfatos estéril pH 7.4 (PBS)	20 mL

1. Se pesó el MTT y se colocó directamente en el tubo falcon estéril, utilizando guantes y cubrebocas debido a la toxicidad del compuesto.
2. Se disolvió en el PBS previamente esterilizado.
3. Se llevó a un volumen de 20 mL.
4. El reactivo se conservó en refrigeración y protegido de la luz.

#### 4.3.2 Medio de cultivo

El medio D-MEM (Medio Tagle modificado por Dulbecco) se preparo con los siguientes componentes:

Medio D-MEM (Invitrogen®)	El contenido de un sobre (No. Cat.12800-017).
Antibiótico-antimicótico (100X) Invitrogen®	10 mL
Penicilina G sódica 10,000 unidades/mL	
Sulfato de estreptomicina 10,000 µg/mL	

Anfotericina B 25 µg/mL	
NaCl 0.85%	
Solución de aminoácidos no esenciales 10mM (100X) Invitrogen®	10 mL
L-Piruvato 100 mM (100X) Invitrogen®.	10 mL
HEPES (Sigma)	2.2 g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma)	3.7 g
Agua desionizada	c.b.p 900 mL
Suero fetal bovino inactivado (Invitrogen®)	100 mL

1. En un vaso de precipitado estéril se colocaron 700 mL de agua desionizada estéril y se disolvió el medio de cultivo contenido en el sobre y enseguida se agregó el resto de los componentes y se disolvieron con la ayuda de un agitador magnético.
2. Se agregó agua desionizada hasta completar 900 mL
3. Se esterilizó el medio por filtración a través de membrana Millipore® de 0.22 µm
4. Se complementó con 10% de suero fetal bovino inactivado.
5. El medio de cultivo se alicuota en frascos estériles y se conservo en refrigeración.
6. Se tomo una muestra de 4 mL del medio de cultivo en una placa de cultivo y se incubó por 48 h como control de esterilidad de cada uno de los frasco con D-MEM.

#### 4.3.3 Solución de PBS-EDTA

La solución amortiguadora salina de fosfatos con EDTA se preparó con los siguientes componentes:

NaCl (J.T.Baker®)	8.0 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®)	0.2 g
EDTA disódico (Sigma®)	0.372 g
Agua desionizada	c.b.p. 1000 mL

1. Se disolvieron las sales una por una en 900 mL de agua desionizada
2. Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH o HCl diluido.
3. Se aforo un litro utilizando un matraz volumétrico y se alicuota en frascos
4. Las alicuotas se esterizaron en autoclave y se conservaron a temperatura ambiente

## v. RESULTADOS

### **5.1 Caracterización e identificación de los compuestos aislados.**

De los extractos hexánico y acetónico se aisló el compuesto coumarínico mammea A/AA. Cabe mencionar que para poder identificar a este compuesto en los extractos se utilizó una muestra auténtica de la mammea A/AA, lo que permitió dar seguimiento al trabajo de aislamiento.

A partir de los datos espectroscópicos se pudo identificar al compuesto AAA3K, aislado de los extracto hexánico y acetónico, como mammea A/AA. En el espectro de  $^1\text{H}$ RMN se observó una señal en 5.89 ppm (1H, s, H3) característica de protón H3 del esqueleto de las cumarinas, otra de las señales de las cumarinas sustituidas con un grupo fenilo en el C-4 es la presencia de cinco protones aromáticos en 7.43 ppm (5H, *m*, H10, H11, H12, H13 y H14). Los datos espectroscópicos también nos permiten deducir que existe una cadena 3-metil-1-oxobutil, debido a las señales en 0.9 ppm que integra para 6 protones que corresponden a los hidrógenos de los metilos H4'' y H5'' (6H, *m*,  $J=6.45$  Hz); una señal en 2.205 ppm que integra para un protón que corresponde al H3'' (1H, *d*,  $J=13.17$  Hz, H3'') y finalmente un doblete en 2.99 ppm que integra para dos protones que están presentes en H2'' (*d*,  $J=6.75$ , H2''). La existencia de una señal en 5.18 ppm que integra para 2 protones (H, *tm*,  $J=6.7$ , H2') revela la presencia de una doble ligadura entre los C-2' y C-3'. También se observa un singulete que integra para 3 protones que corresponden al sustituyente metilo en la posición 4' (1.84 ppm, 3H, s, H4') y un doblete en 1.64 que integra para 3 protones correspondientes al sustituyente metilo en la posición 5'; estos datos confirman la presencia de un sustituyente prenilado. En el espectro de IR también pueden distinguirse señales características y confirmatorias de la presencia de grupo fenólico (3449, 767 y  $700\text{ cm}^{-1}$ ). Los datos obtenidos concuerdan con los reportados previamente (Crombie, 1967; Morel, 1999). El punto de fusión reportado en estas referencias se encuentra en el rango de 98 a  $109^\circ\text{C}$  y en el presente trabajo se determinó el punto de fusión ( $107$  a  $109^\circ\text{C}$ ) de la cumarina mammea A/AA.

Por otra parte, al compuesto K-02 se le identificó como ácido shikímico cuyo punto de fusión fue de  $183$ - $185^\circ\text{C}$ , además se realizó una espectroscopia de IR y  $^1\text{H}$ RMN, cuyos datos espectroscópicos se incluyen en el anexo 1. En la tabla 2 se resumen las características físicas de los compuestos mammea A/AA y ácido shikímico.

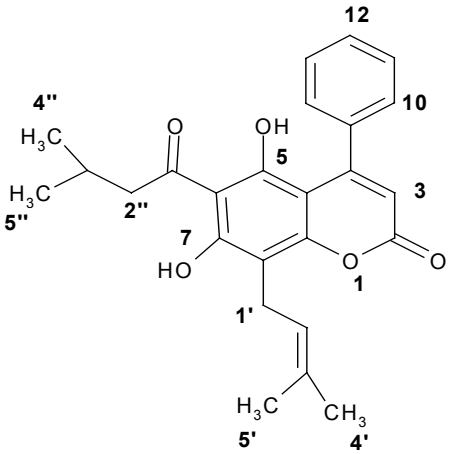
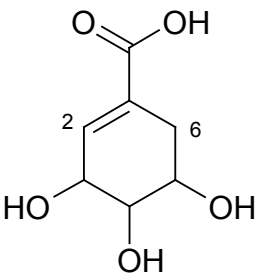
**Tabla 2 Características de los compuestos aislados**

Compuesto	AAA3K	K-02
Color	amarillo	blanco
Forma	agujas	polvo
Solubilidad	muy soluble: acetona soluble: acetato de etilo	ND*
Peso molecular	406	173
Punto de fusión	107 a 109°C	183 a 185°C
Fórmula molecular	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>

\* ND: no determinado

En la tabla 3 se muestran las estructuras químicas de los compuestos aislados.

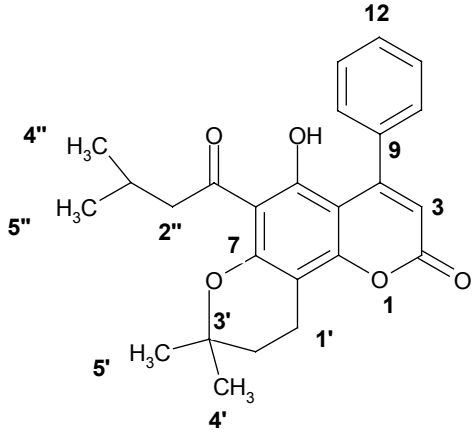
**Tabla 3 Estructuras químicas de los compuestos aislados**

	<p style="text-align: center;"><b>Clave AAA3K</b></p> <p>Mammea A/AA (Mammeisina)</p> <p>Nombre químico: 5,7-Dihidroxi-8-(3-metil-2 butenil)-6-(3-metil-butiril)-4-fenil-crom-2-ona</p>
	<p style="text-align: center;"><b>Clave K-02</b></p> <p>Ácido shikímico</p> <p>Nombre químico: Ácido 3,4,5-trihidroxi-ciclohex-1-en-carboxílico</p>

## 5.2 Caracterización y determinación de la estructura del producto obtenido de la reacción de ciclización de la mammeisina

Como producto de la reacción de ciclización se obtuvieron cristales de color amarillo en forma de agujas, cuyo punto de fusión fue de 152 a 154°C. También se le realizó  $^1\text{H}$ RMN, los datos espectroscópicos revelan la presencia de una cumarina con un grupo fenilo en C-4 ( $\delta_{\text{H}}$  7.3 ppm, 5H, m, H10, H11, H12, H13, H14), el protón H3 característico da una señal en forma de singulete en 5.9 ppm que integra para un hidrógeno; el sustituyente en C-6 no sufre cambios, excepto por pequeños desplazamientos químicos de las señales características (anexo 1). La existencia de anillo pirano se hace evidente por el acoplamiento de un par de tripletes (2.19 ppm que integra para dos protones en la posición H1' y 1.89 ppm, que de igual manera integra para dos protones en H2',  $J = 6.7$  Hz) junto con dos singuletes de un grupo *gem*-dimetilo (1.57 ppm, 3H, s, H4' y  $\delta_{\text{H}}$  1.46 ppm, 3H, s, H5'). En el anexo 1 se muestran los datos espectroscópicos.

**Tabla 4 Estructura química del producto de la reacción de ciclización**

	<p style="text-align: center;"><b>MIM</b></p> <p>Ciclomammeisina</p> <p>Nombre químico: 8-(3,3-dimetil-butil)-5,7-dihidroxi-6-(3-metil-butiril)-4-fenil-crom-2-ona</p>
--	--

## 5.3 Efecto de la ciclomammeisina en la viabilidad en cultivos de líneas celulares

Se analizó el efecto en la viabilidad de la ciclomammeisina sobre las líneas celulares humanas. A continuación se muestran los resultados de las pruebas realizadas en las líneas celulares de cérvix (HeLa y C33). El experimento para determinar el efecto de ciclomammeisina fue el ensayo de MTT y se realizaron tres experimentos independientes. El tiempo de exposición al compuesto fue de 72 h.

De acuerdo a los resultados para las células HeLa se observa que el grado de inhibición depende de la concentración del compuesto, el máximo porcentaje de inhibición en esta línea celular fue aproximadamente del 70%; posiblemente para alcanzar el cien por ciento de

inhibición de crecimiento celular se requieren concentraciones mayores, ya que no se alcanza aún la meseta de la curva (figura 18A).

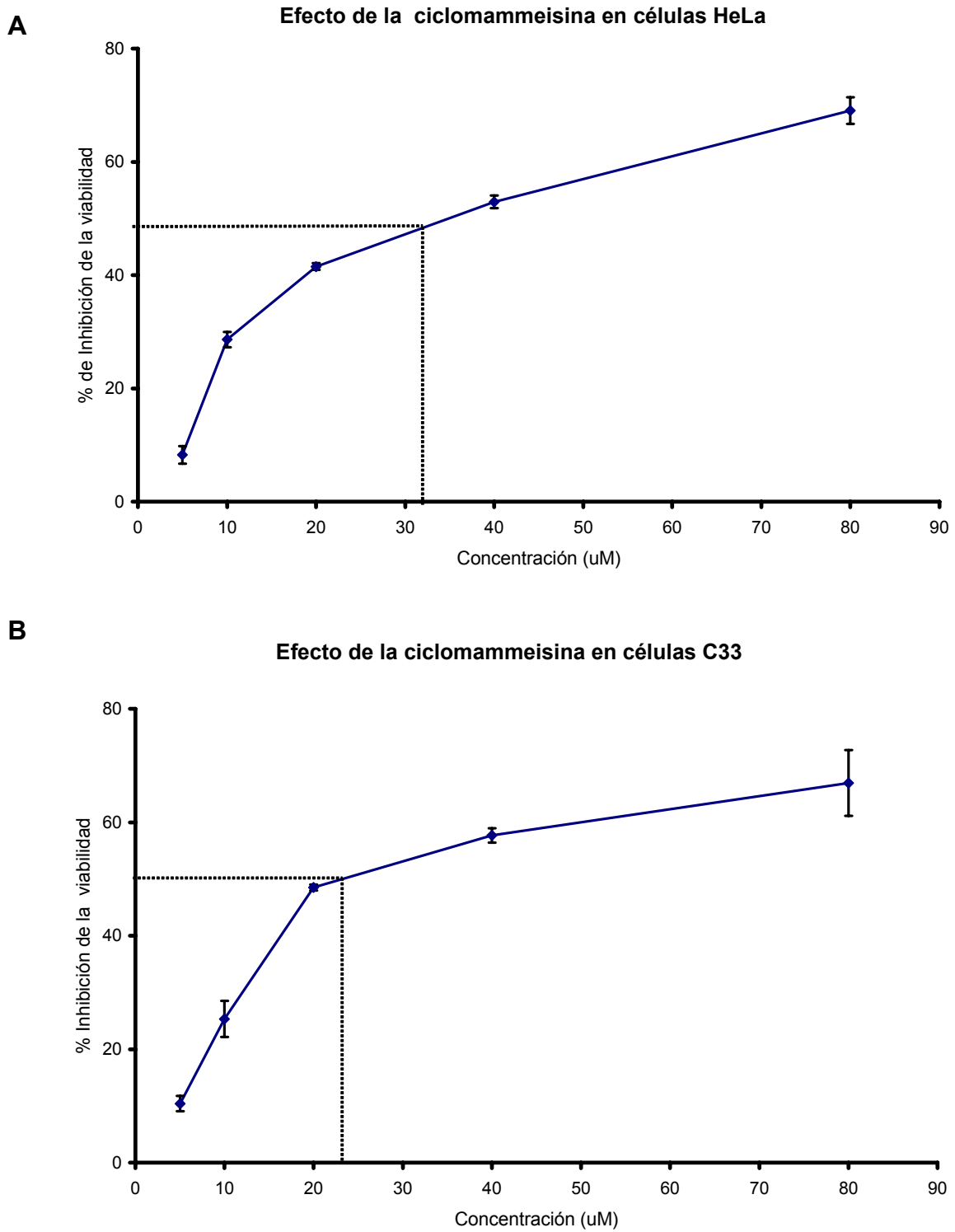


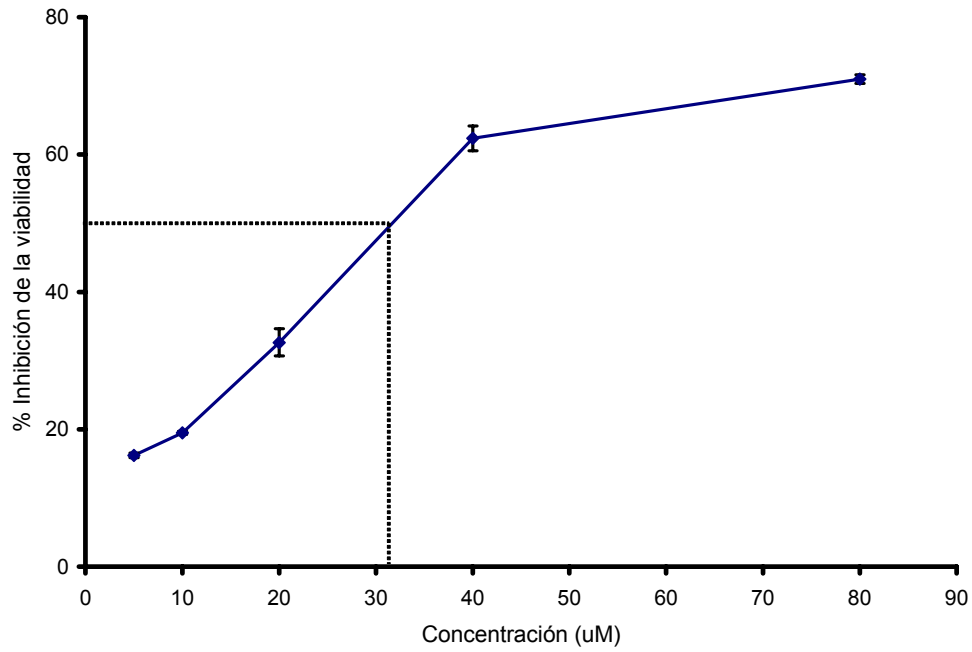
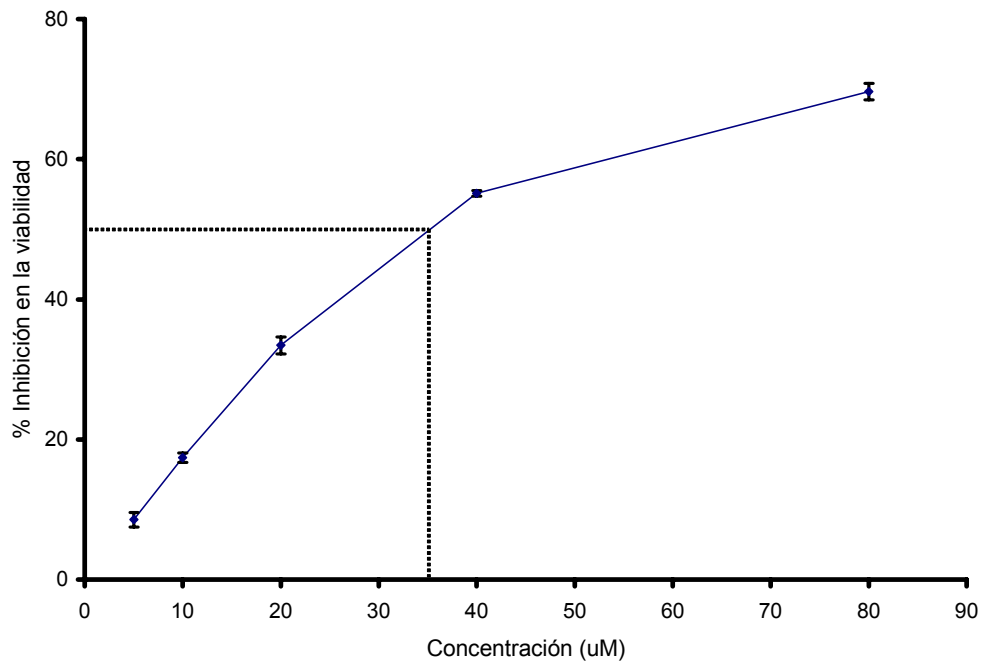
Figura 18 Efecto en el porcentaje de inhibición en la viabilidad celular a 72 h en células HeLa (A) y C33 (B) tratadas con ciclomammeisina a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 µM. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes (± D.E.).



Mientras que para las células C33 se puede observar que no es necesaria una mayor concentración de la ciclomammeisina para alcanzar una inhibición total de la viabilidad celular, ya que a concentraciones mayores de 40  $\mu\text{M}$  no hay un aumento considerable en dicha inhibición (figura 18B).

Con respecto a la línea celular SW480 también se obtuvo una respuesta dependiente de la concentración, como puede observarse en la figura 19A, con una concentración de 80  $\mu\text{M}$  de ciclomammeisina se alcanzó aproximadamente el 70% de inhibición de la viabilidad. Para la línea SW620 se tiene un comportamiento similar al obtenido en las células SW480 ya que a una concentración de 80  $\mu\text{M}$  el máximo porcentaje de inhibición obtenido fue del 70% (figura 19B).

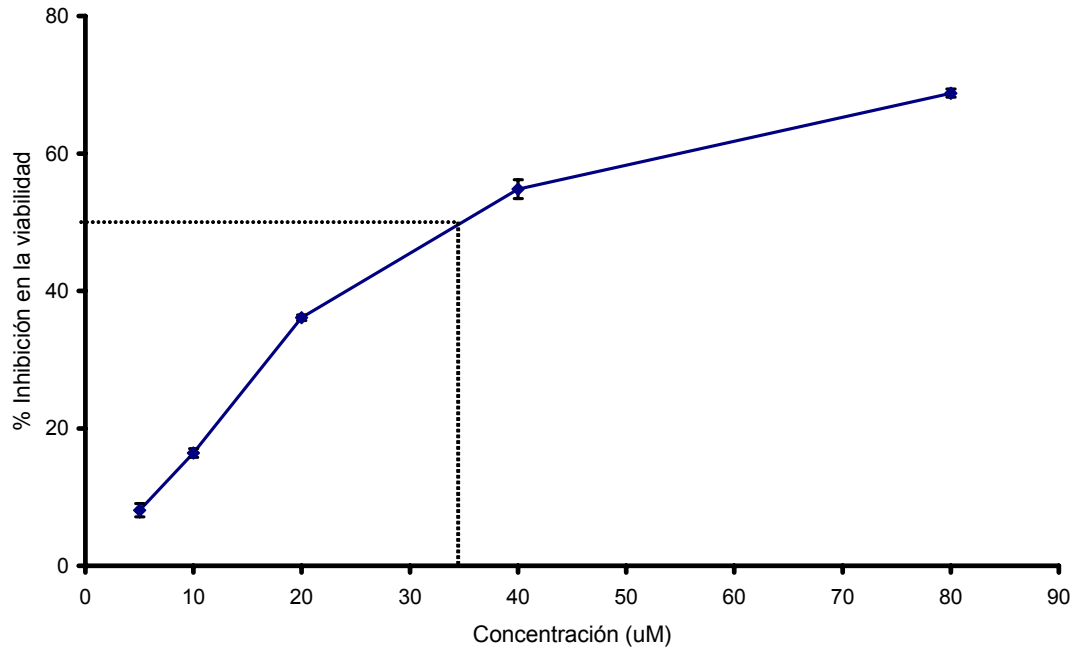
También se emplearon células MCF7 provenientes de cáncer de mama y células K562 de eritroleucemia, se llevó a cabo el mismo experimento para poder determinar el efecto de la ciclomammeisina. En la figura 20 se observa que de igual manera a lo que se mostró en las gráficas anteriores el porcentaje de inhibición en la viabilidad de ambas líneas es dependiente de la concentración de la ciclomammeisina donde en las 2 líneas el comportamiento fue similar (figura 20A y 20B).

**A****Efecto de la ciclomammeisina en células SW480****B****Efecto de la ciclomammeisina en células SW620**

**Figura 19 Efecto en el porcentaje de inhibición en la viabilidad celular a 72 h en células SW480 (A) y SW620 (B) tratadas con ciclomammeisina a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 μM. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes (± D.E.).**

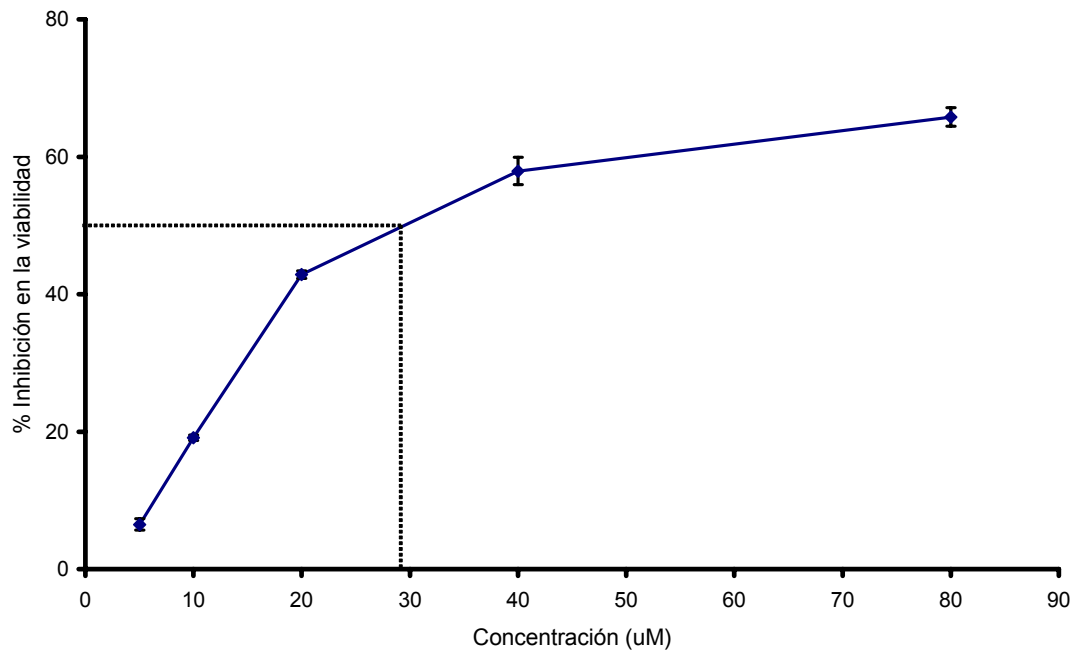
**A**

**Efecto de la ciclomammeisina en células MCF7**



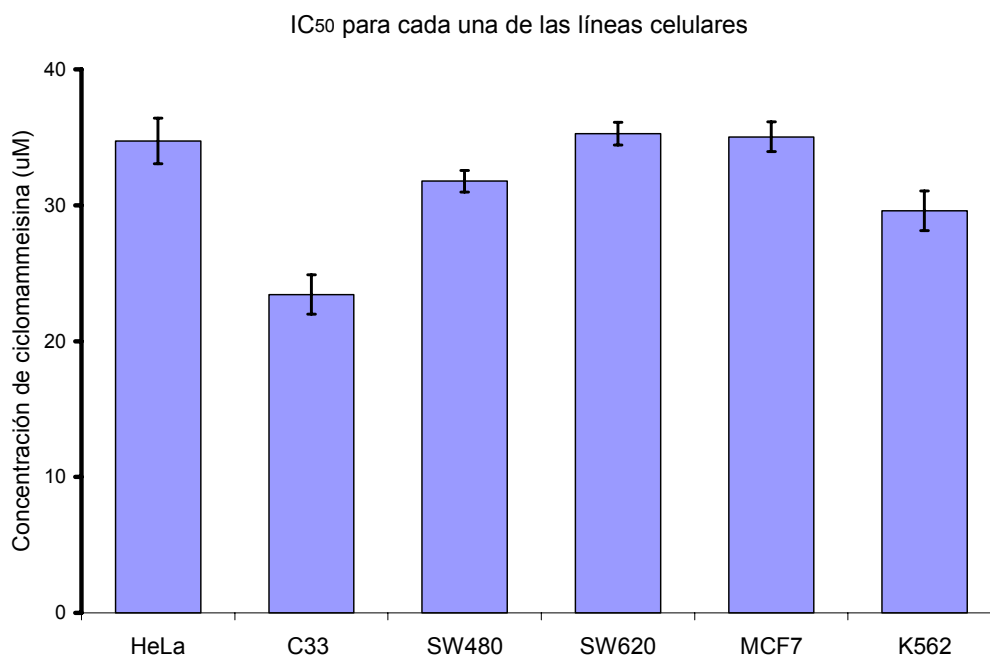
**B**

**Efecto de la ciclomammeisina en células K562**



**Figura 20 Efecto en el porcentaje de inhibición en la viabilidad celular a 72 h en células MCF7 (A) y K562 (B) tratadas con ciclomammeisina a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 µM. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes (± D.E.)**

Para determinar la IC<sub>50</sub> de cada una de las líneas celulares se realizó un análisis de regresión no lineal con el programa Origin 5.0. De éste análisis se obtuvieron los valores numéricos donde el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular fue del 50%. En la tabla 5 y en la figura 21 se muestran los resultados de IC<sub>50</sub> obtenidos en los experimentos realizados.



**Figura 21 Gráfico comparativo de la concentración de ciclomammeisina que inhibe en un 50% la viabilidad celular en las diferentes líneas celulares. Se muestra el promedio de los 3 ensayos independientes ± D.E.**

	HeLa	C33	SW480	SW620	MCF7	K562
<b>Experimento 1</b>	32.8	22	30.9	34.4	34	28.2
<b>Experimento 2</b>	35.6	23.4	31.9	35.3	36.18	29.44
<b>Experimento 3</b>	35.8	24.9	32.5	36.09	34.9	31.1
Promedio	<b>34.73333333</b>	<b>23.43333333</b>	<b>31.76666667</b>	<b>35.26333333</b>	<b>35.02666667</b>	<b>29.58</b>
D.E.	1.67729942	1.45028733	0.80829038	0.84559644	1.09550597	1.45506014

**Tabla 5 Resultados de los valores de IC<sub>50</sub> para cada una de las líneas celulares**

Como se puede observar la IC<sub>50</sub> del compuesto ciclomammeisina para cada una de las líneas celulares utilizadas en el experimento van de 23.4 µM para C33 a 35.2 µM para SW620, dichas concentraciones no se encuentran muy distanciadas en el sentido de que tienen un mismo orden de magnitud y aunque aún no se conoce el mecanismo de acción de la ciclomammeisina se puede inferir que actúan sobre componentes comunes presentes en las células ya que, en éste

estudio se obtuvo que la ciclomammeisina responde de manera análoga en las líneas celulares empleadas. Por ejemplo en la mayoría de las líneas celulares la inhibición de la proliferación celular siempre se mantuvo dependiente de la dosis.

## vi. discusión

En el presente trabajo se aislaron los compuestos mammea A/AA y ácido shikímico, a partir de la cáscara del fruto del árbol *Mammea americana*. A la cumarina mammea A/AA, en cuya estructura química tiene un sustituyente isoprenilo en el carbono 8 (C-8), se le realizó una modificación de su estructura molecular al ciclizarla en condiciones ácidas (Finegan, 1965), con la finalidad de obtener el compuesto ciclomammeisina. En condiciones ácidas el grupo isoprenilo forma un anillo pirano. La presencia tanto de la mammea A/AA como de la ciclomammeisina se confirmó por <sup>1</sup>HRMN, ésta herramienta espectroscópica permitió evidenciar la ciclización del isoprenilo presente en C-8, se observó un cambio en la señal del  $\delta_H$  5.18 ppm, que integra para un protón en H2' ( $J = 6.7$  Hz) presente en el espectro de mammea A/AA a la señal  $\delta_H$  1.89 ppm del espectro de ciclomammeisina que integra para dos protones en H2',  $J = 6.7$  Hz); el desplazamiento de la señal  $\delta_H$  5.18 ppm a  $\delta_H$  1.89 ppm está dado por la conversión de un enlace doble a un enlace sencillo, entre el C-2' y C-3'. Estos datos sirvieron para confirmar la ciclización de la mammea A/AA y la obtención de la ciclomammeisina.

Posteriormente, a la ciclomammeisina se le realizaron pruebas de citotoxicidad empleando seis líneas celulares (HeLa, C33, Sw480, SW620, K562 y MCF7). Se usó la técnica de MTT para medir la viabilidad celular, los experimentos se realizaron por triplicado y la manipulación se realizó en condiciones estériles el tiempo de exposición al fármaco fue de 72 h.

El efecto citotóxico de la ciclomammeisina en las líneas celulares HeLa, C33, SW480, SW620, MCF7 y K562 se manifiesta en la disminución de la proliferación celular, que se encuentra entre un 65 y 70%. También, se determinó la IC<sub>50</sub> para cada una de estas líneas celulares y se encontró que la más sensible, a la ciclomammeisina, es la C33 con una IC<sub>50</sub> de 23.4  $\mu$ M y la más tolerante a este compuesto es SW620 para la que se determinó una IC<sub>50</sub> de 35.2  $\mu$ M. Se observó que hay un comportamiento dependiente de la dosis en todos los experimentos realizados. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores, que desarrollan investigación en el campo de las cumarinas por ejemplo Yang H., y grupo de investigación quienes encontraron que diversas cumarinas entre las que se encuentran las mammea A/AA, mammea A/AA ciclo D, mammea A/AA ciclo F, mammea A/AC ciclo D, mammea A/AD ciclo D, mammea B/BA, mammea B/BA ciclo F, mammea B/BB, mammea B/BC, mammea B/BD, mammea E/BA, y mammea E/BB, tienen actividad citotóxica en las líneas

celulares SW480, HT29, y HCT116 provenientes de cáncer humano de colon de este estudio se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de 13.9 a 88.1, 11.2 a 85.3, y 10.7 a 76.7  $\mu M$ , en las tres líneas celulares respectivamente. Estos resultados son comparables con los obtenidos empleando el 5-fluouracilo para el cual se obtuvo un  $IC_{50}$  de 53.0, 46.1 y 45.1  $\mu M$  (para las tres líneas celulares respectivamente, Yang H y col., 2005).

La obtención de diversos compuestos con núcleo cumarínico es importante ya que, en base a reportes, presentan actividad citotóxica en diversas líneas celulares tumorales. Los sustituyentes que presente el núcleo cumarínico determinan su actividad biológica. Por ejemplo, López-González y colaboradores (2000) encontraron que la cumarina y la 7-hidroxycumarina tienen actividad antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. Reportaron que inhiben la proliferación celular, por inducir arresto en la fase  $G_1$  del ciclo celular en líneas celulares de carcinoma de pulmón.

Kawaii (2001) y colaboradores reportaron que esculetina inhibe el crecimiento celular y la progresión por inducir arresto en la fase  $G_1$  en células de leucemia HL-60 también se reportó que el porcentaje de células que expresan la ciclina D1 en células de A-427 de adenocarcinoma de pulmón es reducido por exposición a las 7-hidroxycumarina.

Marshall y su grupo de investigación (1994) usaron fragmentación de ADN como único criterio de detección de apoptosis, reportaron también lo mismo para varias líneas tumorales y solo se presentó apoptosis en las células HL-60.

Aunque no se realizaron estudios para conocer el mecanismo de acción, por el cual la ciclomammeisina disminuye la proliferación celular; se observó que este compuesto es citotóxico para las diferentes líneas celulares tumorales, aunque la concentración necesaria de la ciclomammeisina para inhibir el 50% de cada línea celular varía entre 22.8  $\mu M$  y 35.8  $\mu M$ . Hasta la fecha aún no se conoce el mecanismo molecular por el cual las cumarinas ejercen su efecto citotóxico.

## vii. conclusiones

- Se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización de la mammea A/AA y del ácido shikímico provenientes de la mezcla de extractos hexánico y cetónico del fruto del árbol *Mammea americana* A/AA.
- Se obtuvo el compuesto ciclommeisina por medio de una reacción de ciclización del sustituyente isoprenilo del compuesto mammea A/AA.
- En los experimentos de citotoxicidad se obtuvo que la ciclommeisina es un compuesto citotóxico, ya que disminuyó la tasa de viabilidad de las líneas celulares empleadas: HeLa, C33, SW480, SW620, MCF7 y K562 entre el 65 y 70%.
- Se determinó la concentración necesaria de ciclommeisina para inhibir el 50 por ciento de la proliferación celular y se obtuvo que la línea más sensible a éste compuesto es C33 ( $IC_{50}$  de 23.4  $\mu$ M) y la que presentó menos sensibilidad es SW620 con ( $IC_{50}$  de 35.2  $\mu$ M).



## viii. bibliografía

- Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Rafft M., et al. *Biología Molecular de la Célula*. Barcelona, Omega, 3ª Ed. (1996), pág: 596-614
- Alley, M.**, Scudeiro D.A. Monks A., Hurseu M.L. 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 tetrazoluim assay. *Cancer Res.* (1988), vol. 48 pág:589-601
- American Cancer Society**, *Cancer facts and figures 2005*, Atlanta (2005), pág 1-10
- Arriaga-Maldonado**. Preliminary study on the propagation of *Mammea americana* by grafting. Guatemala: Revista Cafetalera. (1976), pág 157:1315.
- Avendaño L.** *Introducción a la Química Farmacéutica*. 1ª edición. Editorial Iberoamericana. Madrid, España, (1996), pág:33, 47-54 y 63
- American Type Culture Collection**, *Catalogue of Cell Lines and hybridomas*  
Editores: Hay, R., Caputo, J., Macy, M., Mc Clintock, P., Reid, E.U.A., 7ª Edición (1992), pág: 4, 122, 129 y 223
- Crombie, L.**, Games, D.E. Isolation and structure of *Mammea A/BA, A/AB y A/BB*: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana L* (1966). *Tetrahedron Letters*. Vol.2 pág:145-149
- Crombie, L.**, Games, D.E. Extractives of *Mammea americana L*. Part II. The 4-phenylcoumarins. Isolation and structure of *Mammea A/AA, A/AB cyclo D, A/BA, A/AB and A/BB* (1967). *J. Chem. Soc. (C)* Vol 7 pág:2553-2559
- Crombie, L.**, Games, D.E., Hashins, N.J., Reed, G.F. Extratives of *Mammea americana L*. Part V. The insecticidal compounds. *Journal of the chemical Society Perkin Transactions I*, (1972), pág:2255-2260
- Crown J.** and O'Leary M. *The Taxanes: An Update*. Labcet, (2000), vol. 355 pág:1176-1178
- Finnegan R.** and Mueller W.H. Constituents of *Mammea americana L*. The structure of Mammeigin (1965), *J.Nat.Prod.* vol. 30, pág: 2342-2344
- Finnegan R.**; Merkel, K.E.. Constituents of *Mammea americana L*. XI: Oxidation of mamein and mammeisin (1972). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61(10), pág: 1603-1608.
- Fishel R**, Lescoe MK, Rao MRS, Copeled NG, Jenkins NA, Garber J. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* (1993), vol.75 pág:1027-1038.

- Frame, A.** Rios-Olivares, E., De Jesus, L., Ortiz, D., Pagan, J., Mendez, S. (1998). Plants from Puerto Rico with anti-Mycobacterium tuberculosis properties. P.R. Health Sci. J. 17(3) pág:243-252.
- Ishikawa T.,** Oku Y. and Kotake K. L. (1997). Diastereoselective preparation of a trans, trans 2,3-dimethylchroman-4-ol skeleton: A model synthetic approach to anti-HIV-1 active *Calophyllum* coumarins. Tetrahedron 53(44), pág:14915-14928
- Ito C,** Itoigawa M., Michna Y., Filho V. C., Enjo F., Tozuda H., Nishino H., Furukawa H. Chemical Constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. Structure of the Three New Coumarins and Cancer Chemopreventive Activity of 4-Substituted Coumarins. J.Nat. Prod, (2003), vol. 66, pág:368-371
- Kahn J,** Preis P, Waldman F, Tseng A Jr. Coumarin modulates the cell-cycle progression of an MTV-EJras cell line. J Cancer Res Clin Oncol. (1994), vol.120 Suppl:S19-22.
- Katzung, B.** Farmacología Básica y Clínica. Ed. Manual Moderno, México (2003), 10ª ed, Cap. 13, pág: 1011-1049.
- Kawaii S.,** Tomono Y., Ogawa K., Sugiera M., Yano M., Yoshizaea Y. The antiproliferative Effect of Coumarins on several Cancer Cell Lines. Anticancer Research (2001-2A), vol. 21, pág:917-924
- Kawaii S,** Tomono Y, Ogawa K, Sugiura M, Yano M, Yoshizawa Y, Ito C, Furukawa H Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines. Anticancer Res. (2001-3B) May-Jun; 21 (3B), pág: 1905-1911.
- Kimura, S.** Ito C; Naoto J, Segawa H, Kuroda J, Okada M, Adachi S, Nakahata T, Yuasa T, Cechinel F. V, Furukawa H and Maekawa T. Inhibition of Leukemic Cell Growth by a Novel Anti-Cancer Drug (GUT-70) from *Calophyllum Brasiliense* that acts by Induction of Apoptosis (2005). Int. J. Cancer: vol.113, pág :158–165
- Lewin B.** Cell Cycle and Grow regulation. En: Lewin B. Genes VI. 6 Ed. New York: Oxford University Press, (1997) pág: 1089-129.
- López-Gonzalez J.** García H.P., Cázarez D.A., Guarneros J.M., Mandoki J.J., Morales F.M. Efecto en el ciclo celular de línea de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina, Rev. Inst. Enf. Resp. Méx. (2000), 13 (4), pág:192-197
- Lodish, H.,** Berk A, Zipursky S.L, Matsudaria, P., Baltimore, D., Darnell J. Biología Celular y Molecular. Ed. Médica Panamericana. Méx., (2003). Cuarta edición, capítulo 24 pág: 1054-1084.
- Matern U.,** Luer P., Kreush D. Biosynthesis of Coumarin. Comprehensive Natural Products Chemistry, (1999). Vol 1. Elsevier pág: 623-637
- Mc Murry J.** Química Orgánica. 3a Edición. Editorial Iberoamericana. México, (1992), pág: 390 y 391

- Mahecha V.**, Echeverri R. (1983). Árboles del Valle del Cauca. Bogotá, Colombia: Litografía Arco. pág 208.
- Mendoza-Rodríguez S.**, Morillón I., Cerbón M.A., Luna P., Santiago-Payán H., and Quintero A. Differential expresión of *c-fos*, *c-myc* and *c-K-ras* oncogenes in colorectal cancer from mexican patients (1996). *Biol Estud. Méd. Biol. Méx.* Vol. 44, pág:77-79
- Morel C.**, Guilet D., Oger J.M., Seraphin D., Sevenet T., Wiart C. Hadi A.H., Richomme P. Bruneton J. 6-Acylcumarina from *Mesua racemosa*. *Phytochemistry* (1999), vol. 50, pág:1243-1247
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol* (1983); vol. 65, pág:55-63.
- Murray R.** Méndez J. Brown S.A. Introduction. In: Muray R.D.B., Méndez J., Brown S.A. (eds). *The natural cumarinas, occurrence, chemistry and biochemistry.* New York. (1982), pág: 1-12.
- Nagata, S.**, Apoptosis by Death Factor. *Cell* (1997), vol. 88, pág: 355-365
- Nair R.**, Fischer P.E., Safe H.S., Cortez C, Harvey G.R., DiGiovanni J. Novel cumarinas as potential anticarcinogen agents. *Carcinogenesis* (1991), vol.12, pág:65-69
- National Toxicology Program.** Toxicology and carcinogenesis studies of coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech. Rep. Ser.* (1993); vol. 422, pág:1-340
- Newman D. J.**, Cragg G.M. Sanador K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* (2003), vol. 66, pág:1022-1037
- Ochoa-Carrillo**, Francisco Javier. La Sociedad Mexicana de Oncología, A. C. En la lucha contra el cáncer (2006), Vol. 5 Núm. 2
- O'Connor P.**, Fan S. ADN damage checkpoints: implication for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res*, (1996), vol. 2, pág:165-173
- Perera F.** Uncovering New Clues to Cancer Risk. *Sci Am.*, 1996, vol. 9, pág:40-46
- Pezzuto J. M.** Taxol Production in Plant Cell Culture Comes of Ages. *Nat. Biotech.*, 1996, vol. 14, pág:1083.
- Pezzuto J. M.** Plant-derived anticancer agents. *Bichemical Pharmacology* (1997). vol. 53, pág:121-133
- Plumb, J.**, 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 chemosensivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.*, (1989), vol. 49 pág:4435-4440
- Popoca J.**, Aguilar A., Alonso D., Villareal M.L. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mewxican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* (1998), vol. 59, pág:173-177

- Prakash Chaturvedula**, Jennifer K. Schilling, and David G. I. Kingston. *New cytotoxic coumarins and prenylated benzophenone derivatives from the bark of Onchocarpus punctatus from the Madagascar Rainforest*. J. Nat. Prod. (2002), vol. 65, pág:965-972
- Reyes-Chilpa R.**, Estrada- Muniz E., Ramírez Apan T. Amekraz B., Aumelas A., Jankowski Ch., Vázquez Torres M. Cytotoxic Effects of MammeeType Cpoumarins From Calophyllum brasiliense. *Life Science* (2004), vol. 75, pág:1635-1647
- Rivera**, L., Detección de la actividad antitumoral de fármacos tipo heparán sulfato en líneas celulares tumorales. *Tesis profesional*, Facultad de Química, U.N.A.M. (1995)
- Ruíz C.**, 2005. Estudio Farmacológico toxicológico de las cumarinas aisladas de *Calophyllum brasiliense* sobre la tumorigenesis experimental. Tesis. Maestría en ciencias en farmacia, pág: 5
- Shiff P.** Fant J. and Horwitz S.B. Promotion of Microtubule Assembly *in vitro* by Taxol. *Nature* (1999), vol. 277, pág:665-667
- Shinya K.**, Ito C., Jyoko N., Segawa H, Koruda JI. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anticancer drug (GUT-70) from *Callophyllum brasiliense* that acts by induction of apoptosis. *Int. J. Cancer* (2005), vol.113, pág:158-165
- Suffnes M.** and Wall M.E. Discovery and Development of taxol. Science and Applications. Suffnes M CRC Press, Boca Raton Florida (1995). pág :1-25
- Suffnes M.**, Douros J., Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* (1982), vol. 45, pág:1-14
- Tamarin, R.** Principios de genética editorial Reverté, S.A. (1996). capítulo 15, pág: 442- 456
- Thormes R.** Daly L., Lynch B., Breslin B., Browne H., Corrigan T., Daly P. Edwards G., Gaffney E., Henley J., Keane F., McMurray N., O'Loughlin S., Tanner S.A. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma (1994). *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* Vol. 120, S32-S34.
- Vistica D. T.**, Skehan P., Scudeiro D., Monks A., Piiman A., Boyd M.R., Tetrazoluim-based assays for cellular viability: a critical examination of 'pselected parameter affecting formazan production. *Cancer Res.* (1991). 15;51 (10) pág:2515-2520
- Wogan G.**, Hecht S., Felton J., Conney A., Loeb L. Enviromental and chemical carcinogenesis (2004). *Seminars in Cancer Biology*, pág. 1 - 14
- Ya-Chig Shen**, Li-Tang Wang, Ashraf Taha Khalil y Tao-Haur Kuo. *Chromanones and dihydrocoumarins from Calophyllum blancoi*. *Chem. Pharm Bull* (2004) 52(4) pág:402-405
- Yang H**, Protiva P, Gil RR, Jiang B, Baggett S, Basile MJ, Basile MJ, Reynertson KA, Weinstein IB, Kennelly EJ Antioxidant and cytotoxic isoprenylated coumarins from *Mammea Americana* (2005). *PLANTA MEDICA* 71 (9) pág: 852-860
- Yasunaka K**, Fumiko A, Ariaki N, Hikaru O, Lozada-Pérez L., López-Villafranco E., Estrada M,

**Reyes-Chilpa.** Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones (2005). Journal of Ethnopharmacology vol. 97, pág 293–299

Páginas de internet consultadas

<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/default.asp?c=269&e=>

<http://www.napralert.org/Search/Pharmacology/Default.aspx>

## IX. ABREVIATURAS

μg	microgramos
μL	microlitros
μM	micromolar
°C	grados centígrados
CO	monóxido de carbono
<sup>13</sup> CRMN	resonancia magnética nuclear de carbono 13
c.c.	cromatografía en columna
c.c.f.	cromatografía de capa fina
cdk	quinasas dependientes de ciclinas
c.p.b.	cuanto baste para
δ	desplazamiento químico
D-MEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Food and Drugs Administration
g	gramos
G1	fase del ciclo celular comprendido entre la mitosis y la replicación de DNA (fase S) 1
G2	fase del ciclo celular comprendido entre la fase S y la division celular
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
<sup>1</sup> HRMN	Resonancia magnética nuclear de protón
IC <sub>50</sub>	Concentración del compuesto que produce 50 por ciento de inhibición del crecimiento celular
J	Constante de acoplamiento
KCl	Cloruro de potasio
Kg	kilogramo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio
mg	miligramos
mL	mililitro
min	minutos
MTT	bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MPF	Factor Promotor de Mitosis
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nm	nanómetros
No. cat.	Número de catálogo
p.f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno o grado de acidez
PBS	Phosphate Buffer Solution
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiamino tetraacético
pRb	Proteína producto del gen supresor de tumores (retinoblastoma)
S	fase del ciclo celular donde se lleva a cabo la replicación del DNA
sol.	Solución
SFB	Suero fetal bovino

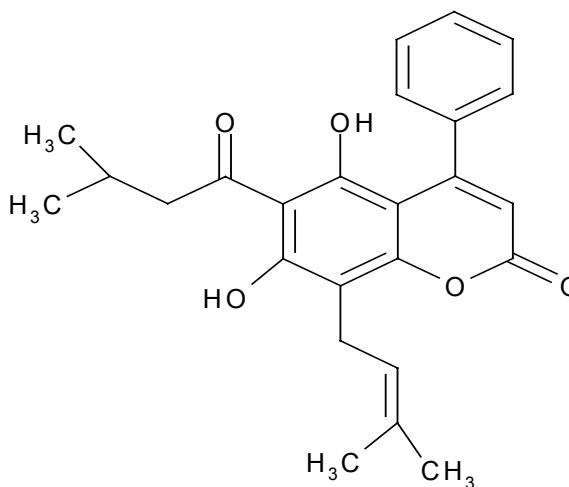
Thr  
Thy  
U.V.

Treonina  
Tirosina  
Ultravioleta

## X. ANEXO 1

Tabla 6 Datos espectroscópicos del análisis de infrarrojo del compuesto AAA3K; *mammea A/AA*

Radical	Señal (cm <sup>-1</sup> )
<b>OH</b>	3449.02
<b>C-H alifático</b>	2927.86
<b>C=O</b>	1737.29
	1710.81
<b>C=C</b>	1618.98
	1379.43
<b>-CH<sub>3</sub></b>	1379.43
<b>C-O</b>	1115.17



El espectro de IR de la *mammea A/AA* se encuentra en la figura 22

Tabla 7 Espectro de RMN hidrógeno (300 MHz) del compuesto AAA3K; *mammea A/AA*.

Protón	$\delta$ <sup>1</sup> H ppm (300MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
<b>C6H5</b>	7.43	<i>m</i>	-	5
<b>CH-3</b>	5.89	<i>s</i>	-	1
<b>CH2-2''</b>	2.99	<i>d</i>	6.75	2
<b>CH-3''</b>	2.20	<i>dd</i>	6.45 y 13.17	1
<b>2Me (4'' y 5'')</b>	23.99	<i>d</i>	6.45	6
<b>CH2-1'</b>	<b>3.54</b>	<i>d</i>	7.05	2
<b>CH - 2'</b>	<b>5.18</b>	<i>tm</i>	6.7	1
<b>CH3 - 4'</b>	<b>1.84</b>	<i>s</i>	-	3
<b>CH3 - 5'</b>	<b>1.64</b>	<i>d</i>	17.58	3

El espectro de <sup>1</sup>HRMN se encuentra en la figura 23



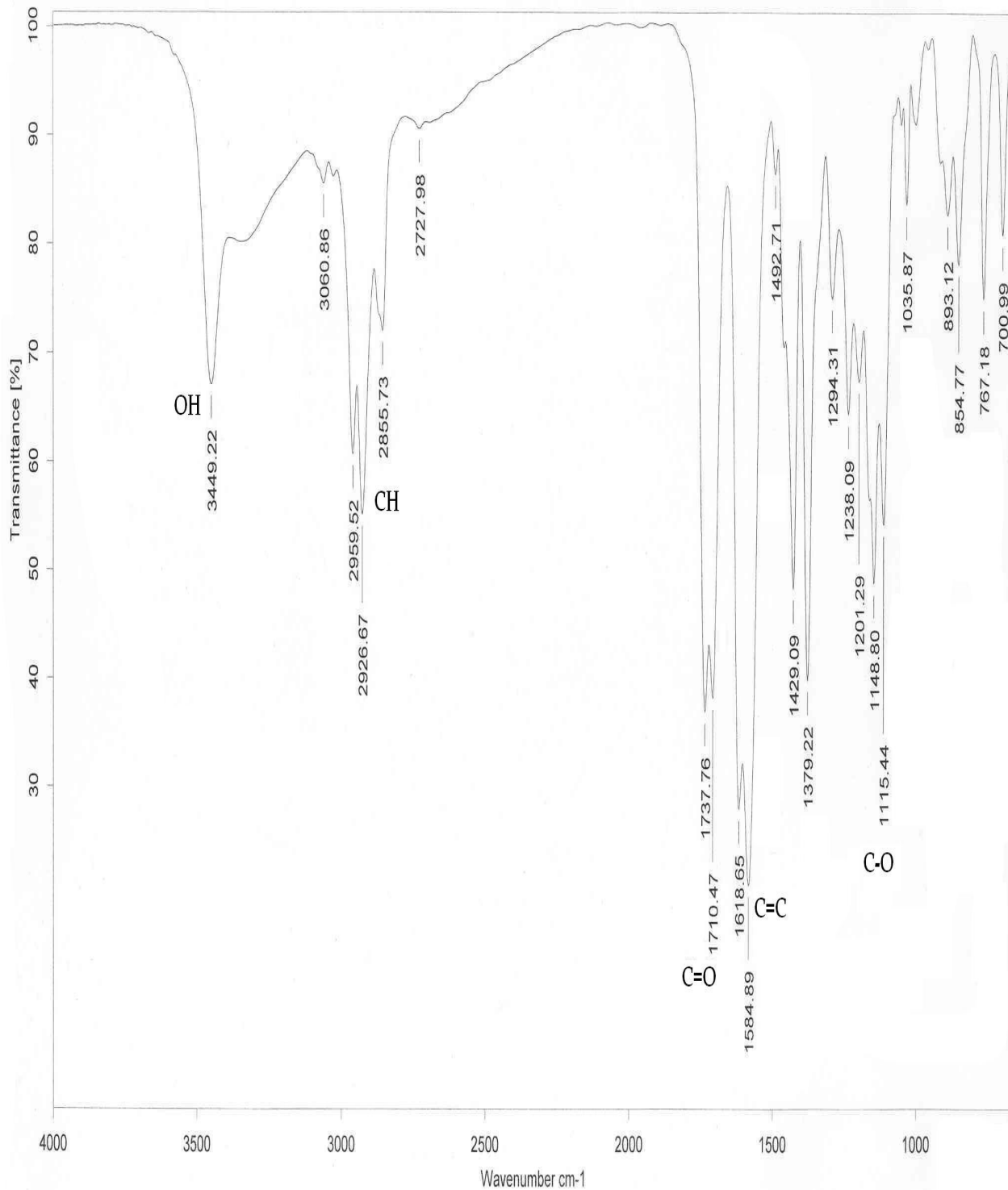


Figura 22. Espectroscopia infrarrojo del compuesto AAA3K; mammea A/AA

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/EHS

Dr. R. Reyes Ch./Karina V.

Clave: AAA3K

Disolvente: Acetona-d6

Hidrogeno-1

Eclipse 300 MHz Jeol (E)

7-III-05

No. de registro: 751

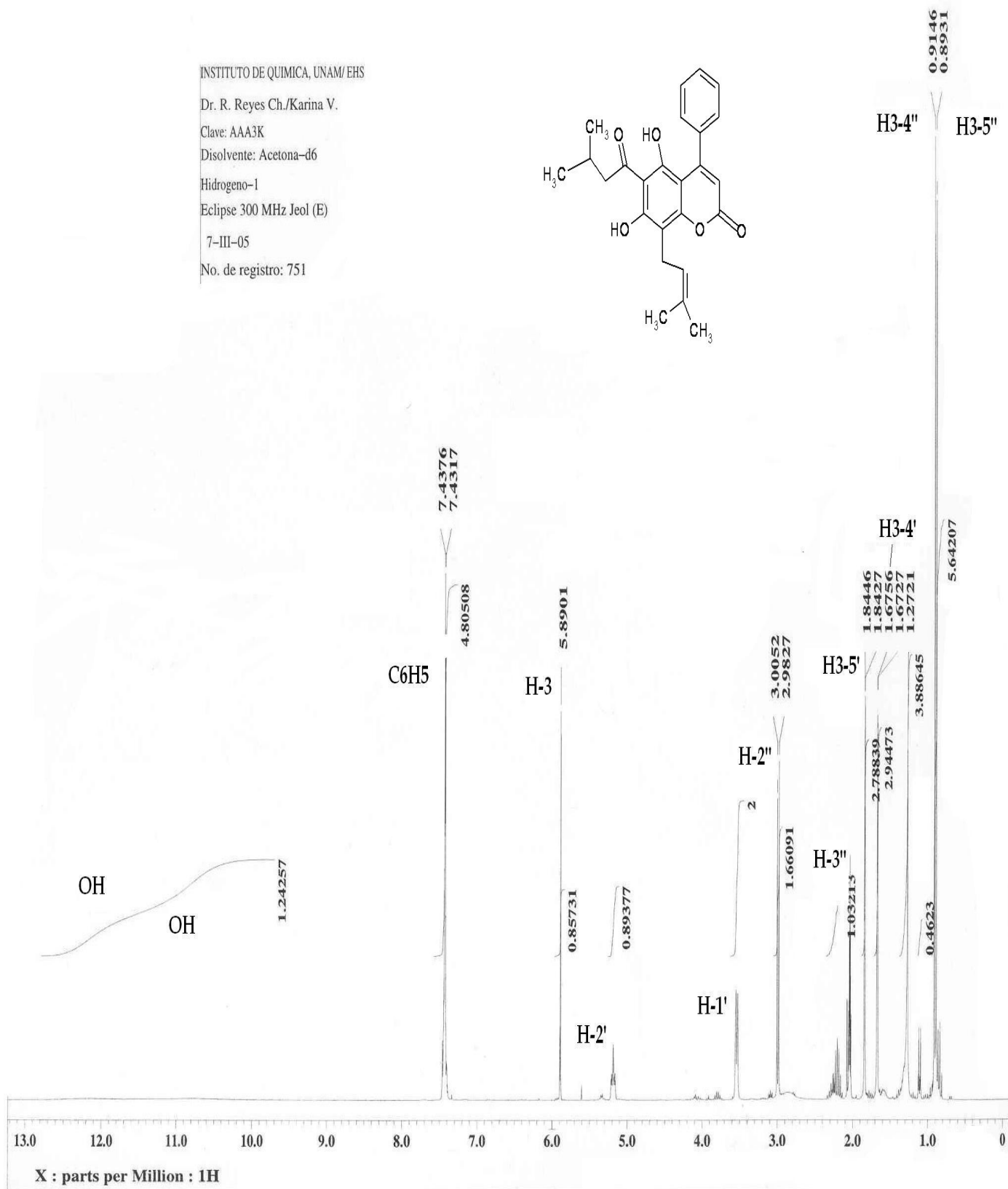
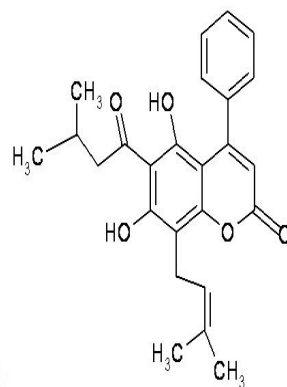


Figura 23 Espectro de 1RMN hidrógeno (300 MHz) del compuesto AAA3K; mammea A/AA.

**Tabla 7 Espectro de RMN hidrógeno (200 MHz) del compuesto K-02; ácido shikímico**

Protón	$\delta$ <sup>1</sup> H ppm (300MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
CH-1	3.69	<i>dd</i>	4 y 7.6	1
CH-2	3.9	<i>m</i>	-	1
CH-3	4.3	<i>m</i>	-	1
CH-4	6.7	<i>m</i>	-	1
CH-6 ax <sup>a</sup>	2.16	<i>ddt</i>	16, 5.6 y 1.6	
CH-6 ec <sup>b</sup>	2.65	<i>ddt</i>	16, 5.6 y 1.6	1

ax<sup>a</sup>= axial; ec<sup>b</sup>=ecuatorial.

El espectro de 1RMN se encuentra en la figura 24

**Tabla 8 Espectro de RMN hidrógeno (200 MHz) del compuesto MIM. Ciclomammeisina**

Protón	$\delta$ <sup>1</sup> H ppm (300MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
C6H5	7.3	<i>m</i>	-	5
CH-3	5.9	<i>s</i>	-	1
CH2-2''	2.9	<i>m</i>	-	2
CH-3''	2.22	<i>m</i>	-	1
CH3-4''	0.96	<i>s</i>	-	3
CH3-5''	0.92	<i>s</i>	-	3
CH2-1'	2.19	<i>t</i>	-	2
CH-2'	1.89	<i>t</i>	6.7	2
CH3-4'	1.57	<i>s</i>	-	3
CH3-5'	1.46	<i>s</i>	-	3

El espectro correspondiente a 1RMN de la ciclomammeisina se encuentra en la figura 25

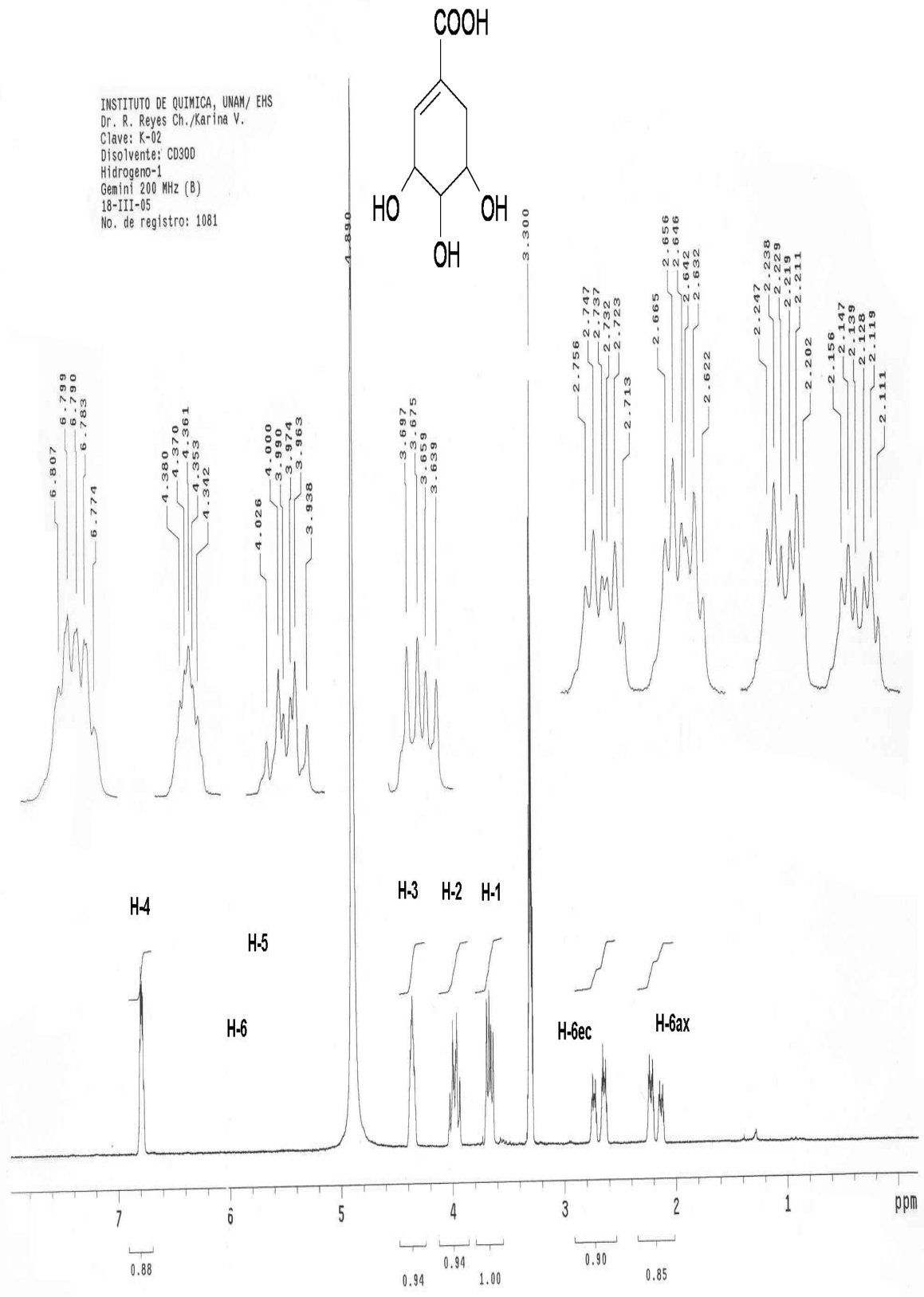


Figura 24 Espectro de RMN hidrógeno (200 MHz) del compuesto K-02; ácido shikímico

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, APO  
 Dr. Ricardo Reyes / Karina Vazquez  
 Clave: N I M  
 Disolvente: CDCl<sub>3</sub>  
 Hidrogeno-1  
 Gami-200 MHz (B)  
 6-VI-2005  
 No. Reg- 2862

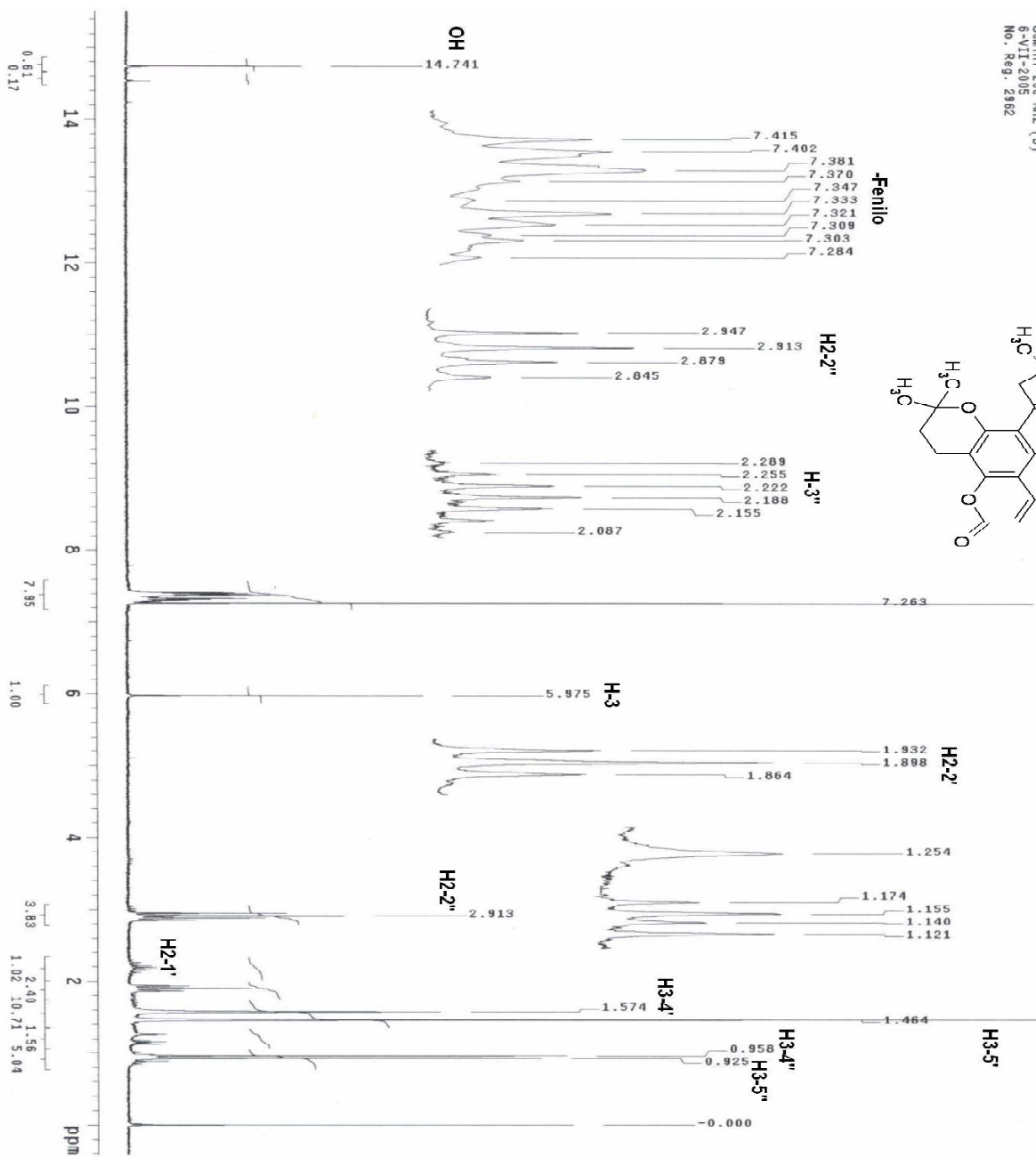
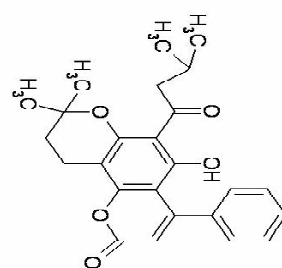


Figura 25 Espectro de RMN hidrógeno (200 MHz) del compuesto MIM. Ciclammeisina