

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FRIEDELINA, CANOFIOL, ÁCIDO SIQUÍMICO
Y AMENTOFLAVONA DE EXTRACTOS CETÓNICOS DE *Calophyllum brasiliense* Y
EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE AMENTOFLAVONA EN LÍNEAS CELULARES
HUMANAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ADRIANA PATRICIA JIMÉNEZ CRUZ

MÉXICO, 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: Prof. Francisco Hernández Luis
Vocal: M.en C. José Dolores Solano Becerra
Secretario: Prof. José Ignacio Páramo Ramírez
Primer Suplente: Prof. Ma. Elena Bravo Gómez
Segundo Suplente: Prof Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitios donde se desarrolló el tema:

-Laboratorio 205, Productos Naturales.
Instituto de Química. U.N.A.M.
-Laboratorio de Biología Molecular.
Departamento de Biología.
Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor del tema:

M. en C. José Dolores Solano Becerra. _____

Sustentante:

Adriana Patricia Jiménez Cruz_____

El presente trabajo se realizó con la dirección de la † Dra. Angelina Quintero Ruiz y el M. en C. José Dolores Solano Becerra del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM y del Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida, permitiéndome llegar a esta meta y por que nunca me ha faltado nada para seguir adelante.

A mi mamá Patricia Cruz Silva por su apoyo y amor incondicional que me ha brindado durante toda mi vida. Por el gran ejemplo que siempre ha sido para mí una mujer profesional tanto en su carrera como en su vida diaria. Por encontrar en ella a mi mejor amiga que esta con migo en los buenos y malos momentos de la vida.

A mi papá Javier Jiménez Herrera por ayudarme a superar mis metas en cada etapa de mi vida, por su cuidado y exigencia que me han hecho ser una mejor mujer.

A mis hermanos Brenda y Aldo por todo lo que hemos compartido. Brenda espero que pronto puedas ser una mujer profesionista, se que eres muy inteligente y que lograrás todas tus metas. Aldo tu también eres una persona muy capaz de lograr lo que tu quieras pero hay que trabajar en ello.

A mi abuela Hilda Herrera por todo su amor, apoyo y conocimientos que me ha brindado. Que siempre confió en que este día llegaría. Siempre ha sido para mí el ejemplo de la mujer culta.

A mi abuelo Juan Jiménez † por toda su entrega de amor y conocimiento que me dio en vida y porque aunque ya no esté con nosotros sigue siendo una luz en mi camino.

A mi abuelita Socorrito † por todo su amor que me entregó en vida.

A mis tías Emi y Cata † por brindarme todo su apoyo y amor.

A mis tíos: Juan, Ligia y Bebica por siempre estar cerca de mí y apoyarme con todo lo que pueden, los considero mis amigos. También a Jorge, Jaime y Joel.

A mis primos Luisita, Rodriguito, Isaac, Dianita y Jorgito por los momentos que hemos compartido. Y espero que todos sigan adelante con sus estudios hasta que lleguen a ser unos profesionales.

A toda la banda de los cruztáceos por todas las alegrías y buenos momentos que hemos pasado juntos esperando que con el paso de los años no se desintegre la banda sino que se haga más grande.

A las Juanas (Aline, Lupita, Carmen, Vale, Cinthia, Pq, Ana y Bere) por toda su amistad y apoyo durante tantos años.

A mis amigos Gladys Gómez, Alejandro, Diana Hernández, Melissa, Mariana Lozano, Julio C. Pérez y Lis por toda su amistad, alegrías y momentos compartidos.

A la UNAM por ser la máxima casa de estudios y haber obtenido de ella conocimientos y grandes aprendizajes.

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

Al M.en C. José Solano por asistirme en toda la tesis desde los experimentos hasta la realización del trabajo escrito y por toda su paciencia y amistad.

A Isabel Montor por que fue una gran jefa y amiga de la que adquirí muchos conocimientos y por apoyarme en que no dejara mi tesis a un lado.

A Natalia Tejera por todo el apoyo y conocimientos que me brindó. En general a todas las personas con las que conviví y aprendí estando en mi primer experiencia laboral en Boehringer Ingelheim Promeco.

A Karina Vázquez por ser una excelente amiga y compañera de la Facultad y estar juntas desde el inicio de la carrera hasta la realización de la Tesis.

A Eduardo Montes de Oca por darme su apoyo en el ámbito profesional, así como por ayudarme a concluir con mi titulación.

A Andrés Fregoso por ser un excelente compañero y amigo, además por compartirme de su experiencia y conocimientos que ha adquirido en su trayectoria profesional.

A Mario A. Pérez (mi dualidad y el amor de mi vida) por todas las alegrías y todos los momentos que hemos pasado juntos que han sido mágicos. Por darme tanto amor y amistad, desde que te conocí supe que en este camino de la vida ya no estaría sola sino contigo.

A mi hijito Balam por ser el regalo más hermoso que me ha dado la vida, así como por ser la fuerza motora que me impulsa a dar más de mí, en sí bebé eres una luz.

1. ABREVIATURAS

°C	Grados celsius
µg	Microgramos
µL	Micro Litros
µM	Micro Molar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
<i>C. brasiliense</i>	<i>Calophyllum brasiliense</i>
c.b.p	Cuanto baste para
Cc	Cromatografía en Columna
Ccf	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
Cu ⁺¹	Ion cuproso
Cu ⁺²	Ion cúprico
Cu	Cobre
D.O.	Densidad Óptica
D-MEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Ej.	Ejemplo
ER	Receptor de Estrógeno
g	Gramos
G0	Fase del ciclo celular en donde la replicación celular se detiene. Las células pueden ingresar a G1 ó quizá morir.
G1	Fase del ciclo celular que se encuentra entre la división celular y la síntesis de ADN.
G2	Fase del ciclo celular que se encuentra entre la síntesis de ADN y la división celular
h	Horas
HEPES	Ácido N (2-hidroxietil) piperazin N'-(2 etanosulfónico)

HLE	Elastasa Leucocítica Humana
IC ₅₀	Concentración del compuesto que inhibe el 50% de la proliferación celular.
iNOS	Oxido Nítrico sintasa inducible
IR	Infrarrojo
IκB	Cinasa inhibidora de del factor nuclear de transcripción.
kg	Kilogramos
M	Fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células.
m	Metros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaOH	Hidróxido de sodio
NF-κB	Factor Nuclear de Transcripción kappa B
NO	Oxido Nítrico
¹ O ₂	Oxígeno Singulete
O ₂ ^{·-}	Anión superóxido
OH [·]	Radical hidroxilo
PALA	Fosfonoacetil-L-aspartato
p.f.	Punto de fusión
PBS –EDTA	Solución amortiguadora salina de fosfatos con ácido etilendiamino tetracético.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH =7.4
r.p.m	Revoluciones por minuto
Rf	Fuente de referencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
ROO [·]	radical peróxido

S	Fase del ciclo celular durante la cual se realiza la síntesis de ADN.
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SRB	Sulfarrodamina B
TNF	Factor de necrosis tumoral (Citosina proinflamatoria)
TNF- α	Llamada también: Caquexina, una de las dos formas moleculares del TNF.
Topo I	ADN Topoisomerasa I
Topo II	ADN Topoisomerasa II
UV	Ultravioleta

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. JUSTIFICACIÓN.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 Generalidades del cáncer.....	6
4.2 Terapias contra el cáncer.....	8
4.2.1 Cirugía.....	8
4.2.2 Radioterapia.....	8
4.2.3 Quimioterapia.....	9
4.3 Fármacos antineoplásicos.....	11
4.4 Importancia de las fuentes naturales.....	15
4.5 El género <i>Calophyllum</i>	16
4.5.1 <i>Calophyllum brasiliense</i>	16
4.5.2 Composición química.....	17
4.6 Metabolitos primarios y secundarios en plantas.....	17
4.7 Ejemplos de algunos metabolitos secundarios aislados de <i>Calophyllum brasiliense</i>	18
4.7.1 ácido siquímico.....	19
4.7.2 terpenos.....	19
4.7.2.1 triterpenoides.....	19
4.7.2.2 canofilol.....	20
4.7.2.3 friedelina.....	21
4.7.3 flavonoides.....	21
4.7.3.1 amentoflavona.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Extracción, aislamiento e identificación de friedelina, canofilol, ácido siquímico y amentoflavona de un extracto cetónico de <i>Calophyllum brasiliense</i>	29

5.1.1 Material Biológico.....	29
5.1.2 Cromatografía e instrumentación.....	29
5.1.3 Cromatografía del extracto cetónico.....	30
5.1.4 Aislamiento del canofilol y friedelina.....	33
5.1.5 Aislamiento de la amentoflavona.....	33
5.1.6 Aislamiento del ácido siquímico.....	34
5.2 Evaluación de la citotoxicidad de la amentoflavona en líneas celulares humanas.....	34
5.2.1 Líneas celulares.....	34
5.2.2 Mantenimiento de líneas celulares.....	34
5.2.3 Preparación de reactivos y medio de cultivo.....	35
5.2.3.1 Preparación para un litro del medio D-MEM.....	35
5.2.3.2 Preparación de PBS-EDTA (1L).....	36
5.2.3.3 Preparación de PBS (1L).....	36
5.2.3.4 Preparación de la solución de MTT.....	36
5.2.3.5 Preparación de la amentoflavona.....	37
5.2.4 Métodos empleados en cultivos celulares.....	37
5.2.4.1 Descongelamiento de las líneas celulares.....	37
5.2.4.2 Propagación de líneas celulares.....	38
5.2.4.3 Conteo celular en cámara de Newbauer.....	38
5.2.4.4 Ensayo de citotoxicidad.....	39
5.2.4.4 Ensayo de reducción de MTT.....	40
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Aislamiento y caracterización.....	42
6.2 Resultados de inhibición de la proliferación celular de líneas celulares tratadas con amentoflavona.....	43
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	50
8. CONCLUSIONES.....	54

RESUMEN

Los productos naturales han sido el origen más significativo de fármacos en la historia de la humanidad. Su papel en la terapia del cáncer es muy importante ya que cerca del 74% de compuestos anticancerígenos provienen de productos naturales o de derivados de ellos.

El cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en México según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática del 2003 es la segunda causa de muerte más frecuente en hombres y la tercera en mujeres. Si bien existen tratamientos quimioterapéuticos que han tenido éxito en la remisión o cura en muchos tipos de cáncer, la obtención de nuevos compuestos con mayor eficiencia, así como una disminución en sus efectos adversos es relevante.

Estudios fitoquímicos previos indican que el árbol *Calophyllum brasiliense* es una fuente rica en metabolitos secundarios tales como triterpenoides (Ej. canofilol y friedelina), flavonoides (Ej. amentoflavona), cumarinas, xantonas, benzopiranos y esteroides. De ellos, la amentoflavona ha mostrado citotoxicidad en algunas líneas celulares, sin embargo su actividad citotóxica no ha sido plenamente caracterizada.

En este trabajo se realizó el aislamiento y purificación por técnicas de cromatografía e identificación por espectrofotometría de la amentoflavona, a partir de un extracto cetónico de hojas de *Calophyllum brasiliense*, así como su evaluación citotóxica *in vitro* en líneas celulares humanas de diferente fuente. Adicionalmente se llevó a cabo el aislamiento e identificación de canofilol, friedelina y ácido siquímico del mismo extracto cetónico. Los resultados demostraron que la amentoflavona tiene actividad citotóxica selectiva en las líneas celulares utilizadas.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer no se refiere a una enfermedad sino a un conjunto de ellas, las cuales se caracterizan por una división celular anormal y una proliferación celular descontrolada.

Las alteraciones en proto-oncogenes y genes supresores tumorales conducen a la ganancia y/o pérdida de sus funciones respectivamente, esto lleva a la desregulación de los mecanismos que controlan la proliferación celular, la diferenciación celular, así como la muerte celular programada, los cuales son algunos de los procesos celulares afectados en el cáncer.

El cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, en México según datos del INEGI del 2003 es la segunda causa de muerte más frecuente en hombres y la tercera en mujeres (INEGI, 2003). El cáncer puede ser causado por agentes físicos, químicos y biológicos.

Las principales terapias contra el cáncer son la cirugía, la radiación y la quimioterapia que pueden aplicarse de forma individual ó combinada. Existen tratamientos quimioterapéuticos que han tenido éxito en la remisión ó cura en muchos tipos de cáncer, sin embargo la resistencia a los fármacos que poseen ó adquieren los tumores es el principal problema que limita la efectividad de estos. Los tumores pueden ser intrínsecamente resistentes o desarrollar la resistencia a la quimioterapia durante el tratamiento. La resistencia quimioterapéutica intrínseca o adquirida, causa el fracaso de tratamiento en más del 90% de pacientes con cáncer metastásico.

Por lo anterior la obtención de nuevos compuestos que puedan actuar con mayor eficiencia en la remisión de tumores y disminuir los efectos secundarios no deseados, es relevante. Actualmente los productos naturales de origen vegetal son una excelente opción para satisfacer la demanda de fármacos antineoplásicos en el mercado mundial. Prueba de ellos son taxol (paclitaxel), alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), alcaloides de camptotecina (irinotecan, topotecan) y alcaloides del podofilotoxina (etopósido, tenipósido), empleados en quimioterapia en distintos tipos de cáncer.

Estudios fitoquímicos previos de *Calophyllum brasiliense* han revelado que es una fuente rica de metabolitos secundarios tales como: triterpenos (Ej: friedelina y canofilol), xantonas, cumarinas, biflavonoides (Ej: amentoflavona), ácidos libres (Ej: ácido siquímico y saponinas).

C. brasiliense es un árbol grande de bosques tropicales del continente Americano, es la única especie del género *Calophyllum* que llega y se distribuye en México. Esta especie se distribuye en América Latina, desde México hasta Brasil. En México crece en los remanentes de selvas altas y medianas. En la corteza de *C. brasiliense* se ha reportado la presencia de xantonas con propiedades quimiopreventivas y con actividad antifúngica. Los extractos con disolventes polares de las hojas que contienen amentoflavona, quercetina, ácido gálico, viperina, han mostrado actividad analgésica además de cumarinas con actividad citotóxica y antibacteriana.

La amentoflavona presenta actividades antifúngicas, antiinflamatorias, antivirales y antioxidantes. Grynberg y colaboradores en el 2002 demostraron que la amentoflavona presentó actividad citotóxica en la línea celular de Carcinoma de Ehrlich, pero no mostró actividad en la línea celular de eritroleucemia K562 (Grynberg et al, 2002). Lin y colaboradores en el 2000 demostraron que la amentoflavona no presentó actividad citotóxica en 6 líneas celulares; Raji (linfoma de Burkitt), Calu-1 (carcinoma de pulmón), K562, Vero (carcinoma de riñón de mono verde), Wish (línea celular transformada de célula epitelial) y HeLa (adenocarcinoma de cerviz) (Lin et al., 2000). En cuanto a su mecanismo de acción Rahman y colaboradores en 1989 demostraron que la amentoflavona es capaz de escindir al ADN, al funcionar como pro-oxidante, particularmente en presencia de iones metálicos de transición (Rahman et al, 1989).

En el presente trabajo se realizó la extracción, purificación y caracterización de 4 compuestos: amentoflavona, ácido siquímico, canofilol y friedelina los cuales fueron aislados de un extracto cetónico de las hojas de *C. brasiliens*. Para la extracción y purificación de los compuestos se utilizaron métodos cromatográficos como: cromatografía en columna (cc) y cromatografía en capa fina (ccf) en fase normal (sílica gel, alúmina) y fase reversa (sephadex LH-20); para la caracterización se utilizaron sus constantes físicas (descripción y punto de fusión) y los datos espectroscópicos (Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C) obtenidos para cada

compuesto. Se evaluó la actividad citotóxica de la amentoflavona, en las líneas celulares HeLa (adenocarcinoma de cérvix), SW620 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y K-562 (eritroleucemia) por la técnica de reducción de sales de bromuro de tetrazolio (MTT) determinando sus valores de IC_{50} . Los resultados mostraron que amentoflavona fue citotóxica en las líneas K562, SW620 y MCF-7.

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la amentoflavona en cuatro líneas celulares humanas de diferente fuente.

Objetivos específicos

Aislar la amentoflavona a partir de un extracto cetónico de las hojas del árbol *Calophyllum brasiliense* y adicionalmente los compuestos friedelina, canofilol y ácido siquímico.

Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos amentoflavona, friedelina, canofilol y ácido siquímico.

Evaluar el efecto de la amentoflavona en la proliferación celular de las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de cérvix HeLa, de mama MCF-7 y de colon SW620 así como de eritroleucemia K562 mediante ensayos de citotoxicidad por MTT.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer es la resistencia a la quimioterapia aunada a los efectos adversos, por lo que se hace necesario buscar nuevos compuestos con propiedades antitumorales que puedan disminuir tales problemas. Compuestos extraídos de fuentes naturales ofrecen una excelente opción para realizar la búsqueda de nuevos compuestos.

Los polifenoles son un grupo diverso de metabolitos secundarios de plantas de los cuales se han demostrado sus actividades citotóxicas, a este grupo de compuestos pertenece la amentoflavona en la cual se ha evaluado su citotoxicidad en algunas líneas celulares tales como Raji, Calu-1 y K562, sin embargo aun, no se ha caracterizado dicha actividad ya que existen reportes en donde no tienen actividad. Por lo que con este trabajo al evaluar en cuatro líneas de diferente fuente se aportarán datos que contribuyan a la caracterización de la actividad citotóxica de este compuesto extraído de *Calophyllum brasiliense*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Generalidades del cáncer

Bajo el término cáncer se agrupan un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación excesiva y descontrolada de las células (Koda et al, 2005; Korolkovas et al, 1979).

Para que se lleve a cabo la transformación de células normales a cancerígenas se requieren al menos de tres pasos que son: la iniciación que se entiende como el conjunto de eventos que dan lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto con células contiguas; la promoción que se refiere a la perpetuación del daño celular, probablemente por la activación de oncogenes (Ej. c-fos, Myc, Bcl-2) o inactivación de supresores tumorales (Ej. RB, p53) ambos principalmente por mutaciones y finalmente la progresión, donde células premalignas producen nuevos clones con incremento en la capacidad proliferativa, invasiva y potencial metastático (Williams et al., 2001). Durante el proceso de transformación de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas, en donde se presenta la pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como de la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa contra el desarrollo del cáncer, en las células tumorales se activan diferentes vías de escape que permiten la progresión de la neoplasia.

En el desarrollo del cáncer se han encontrado diversos factores responsables de las mutaciones. Estos son factores ambientales de los cuales se encuentran los agentes físicos, químicos y biológicos; el estilo de vida y factores genéticos (Stein et al, 2004; Stewart, 2002; Philip, 2003). Uno de los principales factores involucrados en la carcinogénesis es la alteración del ciclo celular, el cual en condiciones normales consta de mecanismos que le permiten controlar su división.

Dado a conocer por Stewart en el 2002 en el reporte mundial del cáncer, 10 millones de nuevos casos de cáncer son reportados anualmente, provocando 7.1 millones de muertes por año. Alrededor de 22 millones de personas en todo el mundo están actualmente viviendo con una enfermedad oncológica. Desde 1990, la incidencia del

cáncer ha aumentado un 19% y la mortalidad por cáncer ha aumentado un 18% globalmente dentro de la última década (Stewart, 2002).

En México los datos estadísticos del INEGI del 2003 ubican como los principales padecimientos que conducen al fallecimiento de hombres y mujeres: las enfermedades del corazón, la diabetes y los tumores malignos. Los tumores malignos representan la segunda causa de muerte en los hombres con un total de 29,456 decesos, representando el 11.3%, en tanto que para las mujeres representan la tercera causa de muerte con 30,574 decesos representando el 14.6% (INEGI, 2004).

De cada 100 egresos hospitalarios femeninos por tumores malignos, 32 se deben al de cuello del útero, 33 al de mama, 17 leucemias y cinco al de tráquea, bronquios y pulmón. En los varones, 44.4% de los egresos se debe al de leucemia, 23.9% al de tráquea, bronquios y pulmón, 14.3% al de estómago y 10% por el de colon (INEGI, 2004).

Los agentes químicos están relacionados con actividades industriales, por lo que gran parte de los cánceres producidos por ellos, se dan en los países desarrollados. Además, independientemente de su composición, la capacidad de que una sustancia produzca cáncer va a depender de la cantidad de dosis recibida y del tiempo de exposición a la sustancia (Philip, 2003). Entre los agentes físicos se encuentran los rayos X y la luz UV, accidentes nucleares como es el caso de las fugas producidas en centrales nucleares (Philip, 2003). En los últimos años los agentes biológicos están tomando cada vez más protagonismo en la carcinogénesis humana. Hoy día sabemos que el 18% de los cánceres son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, entre los que destacan el virus del papiloma humano (cáncer de cuello uterino), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado), *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago), *Esquistosoma sp* (Bilharzia), que puede causar cáncer de vejiga (Stewart, 2002).

Los principales factores del estilo de vida que contribuyen al cáncer son: fumar, beber alcohol y la ausencia de una dieta equilibrada (Potter, 1995; Slattery et al, 1998; Stewart, 2002; Weinberg, 1989). Dentro de los factores genéticos el retinoblastoma y el

neuroblastoma son casi totalmente dependientes de predisposición genética (Stewart., 2002).

La habilidad de invadir tejido cercano y viajar a través del torrente sanguíneo y vasos linfáticos, para alojarse en partes del organismo diferentes de donde se originó el tumor, proceso conocido como metástasis, hace que el cáncer sea de carácter letal, 9 de 10 muertes provocadas por el cáncer son resultado de metástasis (Longley et al, 2005). Si el proceso no se detiene, puede progresar hasta causar la muerte del organismo.

4.2 Terapias contra el cáncer

4.2.1 Cirugía

Es el método más empleado para aquellos tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido eliminadas. En los casos donde el cáncer es detectado en una etapa temprana, la cirugía puede ser suficiente para curar al paciente al remover todas las células cancerosas. Es común que la cirugía sea empleada en combinación con la radioterapia y la quimioterapia. Lamentablemente, su uso está limitado a unos cuantos tumores sólidos y su eficacia depende en gran parte de la existencia o no de metástasis (Foye et al, 1988).

4.2.2 Radioterapia

La radioterapia consiste en dirigir radiación ionizante de alta frecuencia (rayos X ó rayos gamma) y en menor uso protones ó neutrones a una zona localizada del paciente cuyo tamaño y volumen se determinan por adelantado, se administra como complemento a la cirugía y a veces a la quimioterapia. La radioterapia es por tanto un tratamiento local, lo que hace posible la destrucción selectiva de las células cancerosas. Es una terapia localizada que se fundamenta en la inducción de daños moleculares en las células al ser irradiadas. Las lesiones directas en el ADN son las realmente responsables del éxito en el tratamiento, aunque no deja de tener riesgos puesto que estas lesiones también pueden inducir resistencia, principal inconveniente de esta terapia junto con los efectos secundarios que provoca (Koda et al, 2005; Foye et al, 1988)

4.2.3 Quimioterapia

La quimioterapia consiste en usar sustancias químicas para destruir células cancerosas, es una de las principales terapias utilizadas para combatir el cáncer, actúa interfiriendo la capacidad de la célula cancerosa para dividirse. La alta eficacia de la quimioterapia es consecuencia de su capacidad para tratar el cáncer metastásico. Tal capacidad hace que la quimioterapia sea muy importante en la lucha de un paciente por superar el cáncer, dado que la radioterapia y la intervención quirúrgica son adecuadas sólo para tratar el cáncer en zonas localizadas. Cuando se emplean los tres tratamientos combinados, sus rutas complementarias para atacar la enfermedad pueden ofrecer al paciente mejores posibilidades de eliminar el cáncer. Muchos son los diferentes tipos de medicamentos que califican como agentes quimioterapéuticos. El fármaco elegido depende del tipo de cáncer que será tratado.

La quimioterapia es eficaz cuando generalmente los fármacos usados afectan cierta fase del ciclo celular. Para replicarse, cada célula pasa por un ciclo de cuatro etapas. La primera, llamada G1, sucede cuando las células se preparan para el proceso de síntesis de ADN y se caracteriza por la expresión génica y la síntesis de proteínas, la segunda se denomina S, en ella ocurre la síntesis de ADN y éste se duplica, la siguiente fase es G2, la célula se prepara para el proceso de división, durante la cual revisa si la duplicación del ADN ha sido correcta antes de permitirle proceder a la siguiente fase, en esta fase existe un punto de control llamado G2-M. La etapa final es la fase M, que constituye la fase en la que los cromosomas replicados son separados en dos núcleos diferentes formando dos células hijas, en esta etapa se lleva a cabo la división nuclear y citoplasmática, proceso denominado citocinesis.

Dependiendo del medicamento elegido, la quimioterapia afecta a las células malignas en una de tres formas:

- Dañando el ADN de las células cancerosas de tal modo que éstas ya no puedan reproducirse. Esto sucede por la alteración de la estructura del ADN en el núcleo de la célula, evitando así la replicación.
- Durante la fase S del ciclo celular, inhibiendo la síntesis de ADN nuevo de tal manera que no sea posible replicación celular alguna. Esto ocurre cuando los fármacos bloquean la formación de los nucleótidos necesarios para la síntesis del ADN.

- Deteniendo el proceso mitótico de tal modo que la célula cancerosa no pueda dividirse en dos células, alterando la formación de husos mitóticos indispensables para desplazar el ADN original y el ADN replicado hacia lados contrarios de la célula y ésta pueda dividirse en dos células (Sherr, 1996).

La quimioterapia es muy eficaz para matar células cancerosas, pero también afecta a las células normales. La potencia de los fármacos usados en la quimioterapia tiene efectos secundarios. Los efectos secundarios típicos de la quimioterapia son:

- Problemas digestivos (náuseas, diarrea, estreñimiento y pérdida de apetito).
- Pérdida de cabello (Se pierde cabello dado que la quimioterapia afecta a los folículos pilosos que crecen de manera constante. Los medicamentos causan que los folículos dejen de reproducirse, hecho que detiene el crecimiento del cabello).
- Bajas cifras de las células sanguíneas (causa problemas en la médula ósea, ya que afecta células en división rápida, como son los precursores de eritrocitos y leucocitos).
- Erupciones cutáneas.
- Fatiga e infertilidad. La quimioterapia también puede tener efectos secundarios causando bajas cifras espermáticas.

La resistencia a los fármacos es uno de los principales problemas que limita la efectividad de la quimioterapia contra el cáncer. Los tumores pueden ser resistentes a la quimioterapia al inicio del tratamiento, sin embargo la resistencia puede adquirirse durante el tratamiento. Una propiedad de la resistencia adquirida es que los tumores no únicamente se hacen resistentes al fármaco originalmente usado, sino que pueden desarrollar resistencia cruzada hacia otros fármacos aun cuando sus mecanismos de acción sean diferentes (Longley et al, 2005). La resistencia a la quimioterapia intrínseca o adquirida, causa el fracaso de tratamiento en más del 90% de pacientes con cáncer metastásico, también puede reducir la eficacia de las quimioterapias que utilizan adyuvantes. Si la resistencia a fármacos se superara, la supervivencia de pacientes con cáncer aumentaría significativamente (Longley et al, 2005).

4.3 Fármacos antineoplásicos

Los medicamentos usados en la quimioterapia se agrupan en varias categorías. Son situados en dichas clases según su mecanismo de acción. De modo más específico, los medicamentos se ubican en una categoría específica según el proceso celular que interrumpen (Figura 1). Las categorías son: agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides de plantas, antihormonales, inhibidores de la mitosis e inhibidores de las Topoisomerasas I y II (Goodman y Gilman, 1996).

1) Los agentes alquilantes: Son fármacos que funcionan atacando directamente el ADN de una célula. Reaccionan sobre los nucleófilos celulares (Cabo, 2004). Estos medicamentos pueden operar en cualquier momento del ciclo celular, sin embargo, son más eficaces durante la síntesis de ADN. Sirven para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias crónicas y algunos carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario (Goodman y Gilman, 1996). Los agentes alquilantes se administran oral o intravenosamente, ejemplos de fármacos de esta categoría son: ciclofosfamida, mecloretamina y cisplatín (Platinol), cloranbucil, busulfán y mitomicina (Goodman y Gilman, 1996; Cabo, 2004).

2) Las nitrosoureas son similares a los agentes alquilantes y actúan inhibiendo los cambios necesarios para la reparación de ADN. Un rasgo muy importante es que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, hecho que les hace muy útiles en el tratamiento de los tumores cerebrales. También pueden servir para tratar linfomas y melanomas. Las nitrosoureas son administradas por vía oral o intravenosa, ejemplos de ellas son: carmustina y lomustina (Goodman y Gilman, 1996).

3) Los antimetabolitos inhiben la proliferación celular al interferir con la síntesis de ADN. Estos agentes interfieren con el metabolismo de purinas y pirimidinas causando una disminución en la reserva de nucleótidos (Goodman y Gilman, 1996). Los antimetabolitos afectan la fase "S" del ciclo celular y sirven para tratar tumores de la vía digestiva, mamarios y ováricos. Se administran por vía oral o intravenosa ejemplos de ellos son; 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo (Goodman y Gilman, 1996; Cabo, 2004).

4) Los antibióticos antitumorales o citostáticos funcionan al intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN para evitar la síntesis de ARN y ADN (Goodman y Gilman, 1996; Cabo, 2004). Estos fármacos también impiden la división celular al imposibilitar la replicación de ADN. Esta categoría de medicamentos sirve para tratar una variedad amplia de cánceres incluyendo el testicular y de leucemia. Algunos ejemplos son: doxorubicina y mitomicina-C (Goodman y Gilman, 1996; Cabo, 2004).

5) Los antihormonales disminuyen la proliferación celular de los cánceres con dependencia hormonal. Provocan un cambio en la forma tridimensional de los receptores de hormonas o simplemente compiten por su sitio activo, hecho que impide que el receptor activado por hormona se fije al elemento de respuesta en el ADN, impidiendo la transcripción de genes que inducen proliferación. Por lo general, estos medicamentos antihormonales se administran por la vía oral y sirven para tratar el cáncer mamario. Algunos ejemplos son: tamoxifeno y flutamida (Cabo, 2004).

6) Inhibidores de las topoisomerasas I y II: Estos fármacos estabilizan la unión de un complejo de topoisomerasa I ó II con el ADN causando rupturas de una o las dos hebras dependiendo de la enzima de que se trate, impidiendo la replicación e induciendo muerte celular, Algunos de ellos son el etopósido y la amsacrina.

7) Inhibidores de la mitosis que impiden la división celular, durante la metafase, los husos mitóticos orientan los dos contenidos de ADN organizado en cromosomas que la célula necesita para dividirse, los husos están constituidos por polímeros de tubulina. Estos fármacos se unen a la tubulina evitando su polimerización o estabilizándola, lo que impide la correcta formación de husos mitóticos. Debido a lo anterior la célula se divide incorrectamente, teniendo cada célula hija diferente contenido de genoma y organelos, muriendo por apoptosis y/o catástrofe mitótica. Estos fármacos son derivados de plantas y sirven para tratar tumores de Wilm, así como cánceres de pulmón, mama y testículo. Algunos ejemplos de esta categoría son: vincristina, vinblastina y taxol, este último conocido como PACLITAXEL fue descubierto en 1960 por el Instituto Nacional del Cáncer en cooperación con el Departamento de Agricultura de E.U.A. Estas agencias investigaron el contenido de cientos de plantas en busca de agentes antitumorales intentando descubrir nuevos compuestos para el tratamiento del cáncer. El taxol fue aislado por primera vez de grandes cantidades de la corteza de los

árboles de *Taxus sp.* La concentración de taxol en la corteza del árbol es extremadamente baja. Un árbol de 100 años produce 3 Kg de corteza que provee una concentración de taxol de 3 mg, obteniendo un rendimiento del 0.01%. por lo que actualmente su obtención es por semisíntesis (Denis et al, 1988).

El taxol (Figura 2) es muy usado en la quimioterapia y es muy eficaz en el tratamiento de cáncer de mama, ovario y pulmón (Rowinsky, 1997; Mekhail et al, 2002). Estabiliza las redes de microtúbulos, como consecuencia hay interferencia con los cambios dinámicos que ocurren durante la formación del uso mitótico, llevando al arresto mitótico en la transición metafase-anafase y posteriormente a la muerte celular programada ó apoptosis (Mekhail et al., 2002). El taxol como otros agentes que dañan a los microtúbulos activan la vía mitocondrial intrínseca de la apoptosis.

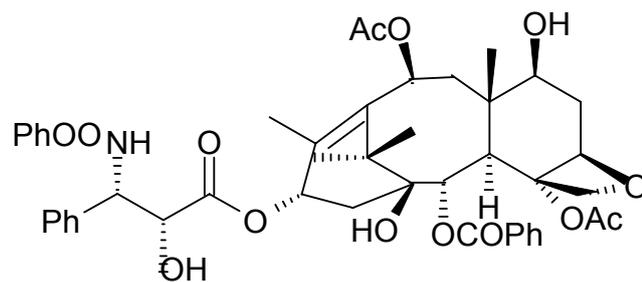


Figura 2. Estructura química del Paclitaxel.

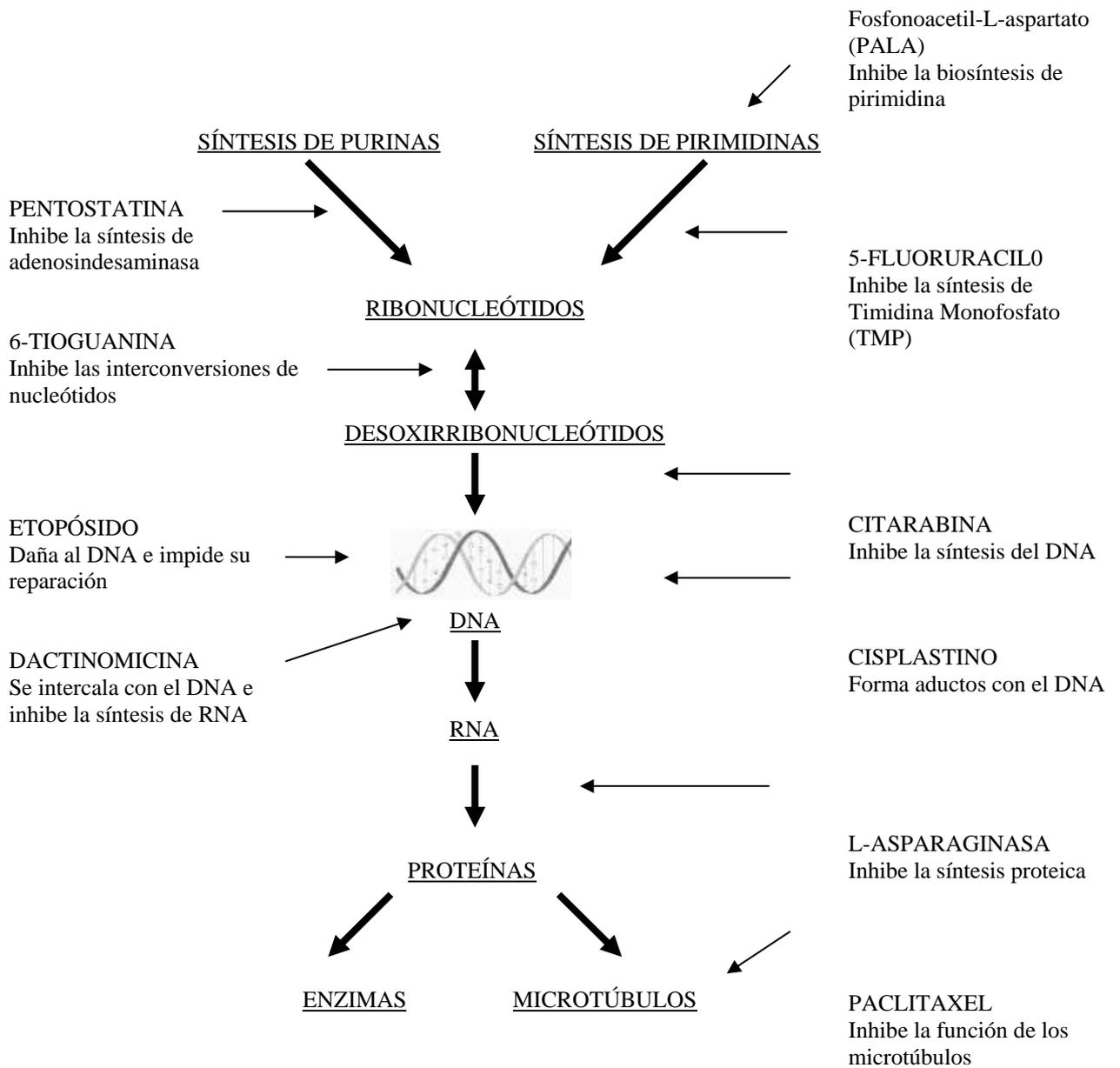


Figura 1. Resumen de mecanismos y sitios de acción de quimioterápicos útiles contra enfermedades neoplásicas (Modificada de Goodman y Gilman, 1996).

4.4 Importancia de las fuentes naturales

Aun poco se sabe acerca de la diversidad biológica, es decir, cuántas especies de plantas comparten el planeta con los seres humanos. Solo alrededor de una pequeña parte del total de las especies han sido identificadas y categorizadas y menos aún han sido estudiadas (Myers, 1998). Se estima que el 40% de los fármacos modernos provienen de fuentes silvestres, con un valor de unos 40,000 millones de dólares por año en ventas con y sin prescripción (Tuxill, 1999).

Pese al estudio y a la rápida expansión de la literatura científica, solo un pequeño tanto por ciento de la totalidad de las especies de plantas se ha estudiado y queda, por lo tanto, un gran campo de investigación por realizar. El hombre no necesitó de los modernos métodos de investigación para reunir por sí mismo una materia médica vegetal, que con frecuencia utilizó junto con prácticas rituales. Tales remedios populares variaron, como es lógico, de acuerdo con las especies existentes en una determinada región y pueden ser estudiadas hoy en las sociedades más o menos primitivas que aún existen.

Hacia finales de 1950, comenzó una intensiva revisión de plantas, microorganismos y animales (estrellas de mar, corales, etc.), respecto a su actividad antitumoral. Ello debido, principalmente, a que el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos fundó un programa de detección selectiva, en donde se ha adoptado un sistema de selección de plantas al azar, ya que pueden encontrarse nuevos compuestos en cualquier especie del reino vegetal o animal. Desde el comienzo del programa se han analizado, respecto a su actividad antitumoral, un considerable número de extractos de diversos orígenes. Se han mostrado con actividad reproducible, alrededor del 4% de los extractos estudiados. Durante más de unos veinticinco años se han experimentado unas 114,000 muestras vegetales, estando representadas 40,000 especies. Actualmente los productos naturales de origen vegetal son una excelente opción para satisfacer la demanda de fármacos en el mercado mundial (Woo et al., 2005), prueba de ellos es el taxol (Paclitaxel).

4.5 El género *Calophyllum*

Calophyllum es uno de los géneros de la familia *Clusiaceae*, está constituido de 180 a 200 especies de árboles tropicales. La mayoría se encuentran en la zona Indo-Pacífica, particularmente de la Península de Malaya de Nueva Guinea. Se estima que solo 8 especies se distribuyen en el continente Americano, desde México hasta las Antillas, Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Brasil y las Guayanas (Stevens, 1980). Este género se encuentra básicamente restringido a selvas húmedas, en tierras bajas, colinas y a veces en bosques de montaña, aunque algunas especies crecen en hábitats secos (Stevens, 1980).

4.5.1 *Calophyllum brasiliense*

Nombre científico: *Calophyllum brasiliense*, Nombre común: Santa María. *C. brasiliense* es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 m y con un diámetro de altura del pecho de aproximadamente 1.80 m, presenta flores blancas y florece de julio a diciembre (Figura 3) (Pennington et al, 1998). *C. brasiliense* es la única especie del género que llega y se distribuye en México (Stevens, 1980). Esta especie se distribuye en América Latina, desde Brasil hasta México. En México se encuentra en las vertientes del Golfo y del Pacífico. En el golfo desde el sur de Veracruz hasta la Península de Yucatán, abarcando Tabasco, norte de Chiapas, Campeche y Quintana Roo. En el Pacífico desde Nayarit hasta la zona central de Chiapas, pasando por Colima, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Stevens, 1980).



Figura 3. *Calophyllum brasiliense*, Árbol y Hoja

4.5.2 Composición química

Estudios fitoquímicos previos de *Calophyllum brasiliense* han revelado que es una fuente rica de metabolitos secundarios tales como: triterpenos (Ej.: friedelina y canofilol), xantonas, coumarinas, biflavonoides (Ej.: amentoflavona), ácidos libres (Ej.: ácido siquímico) y saponinas (Reyes-Chilpa et al, 2004; Reyes-Chilpa et al., 1997).

4.6 Metabolitos primarios y secundarios en plantas

El metabolismo primario, comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales los organismos vivos sintetizan y degradan una serie de sustancias orgánicas que le son indispensables para vivir. Estos procesos son similares en casi todos los organismos vivos y a los productos biosintetizados se les denomina metabolitos primarios. Estos metabolitos cumplen una función vital en los seres vivos y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Como ejemplos podemos citar a los aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas por tan solo mencionar algunos (Mata, 2000).

El metabolismo secundario comprende una serie de procesos metabólicos mediante los cuales los seres vivos sintetizan un gran número de compuestos orgánicos que aparentemente no le son indispensables para vivir. Estos compuestos se forman a partir de los metabolitos primarios y los procesos que conllevan a su formación, pueden diferir entre los diferentes organismos. Los productos del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios. Entre los metabolitos secundarios más importantes se encuentran las cumarinas, los flavonoides y los terpenoides, entre otros (Mata, 2000). Es de señalar que los productos del metabolismo secundario en general:

- Son utilizados por las plantas para su protección contra el ataque de herbívoros y patógenos.
- Son atractivos de los animales para la polinización y la dispersión del fruto y la semilla.
- Se acumulan en grandes cantidades sin efectos negativos en las plantas.
- Tienen la propiedad de formar glicósidos y de esta forma encontrarse de forma soluble.

4.7 Ejemplos de algunos metabolitos secundarios aislados de *Calophyllum brasiliense*.

4.7.1 ácido siquímico

El ácido siquímico es un metabolito secundario precursor de muchos alcaloides, aminoácidos aromáticos y derivados indólicos (Figura 4). Es utilizado como materia prima en la síntesis de productos farmacéuticos. Un ejemplo de lo anterior es el derivado antiviral Oseltamivir, usado en el tratamiento y profilaxis de la gripe A y de la gripe B.

El grupo de trabajo de Reyes Chilpa en el 2004 aislaron e identificaron compuestos provenientes de *C. brasiliense*, entre estos se identificó al ácido siquímico. Se evaluó su actividad citotóxica en tres líneas celulares humanas: K562 (eritroleucemia), U252 (sistema nervioso central) y PC3 (próstata) por el método de Sulforrodamina B (SRB). El ácido siquímico fue probado a 31 μM y no presentó actividad inhibitoria en las 3 líneas celulares evaluadas (Reyes Chilpa et al, 2004).

Estudios previos por Tomohiro y colaboradores en 1999 demostraron que algunos flavonoides y compuestos fenólicos entre ellos el ácido siquímico son atrapadores de radicales alquil peroxilo ROO^\cdot (Tomohiro et al., 1999).

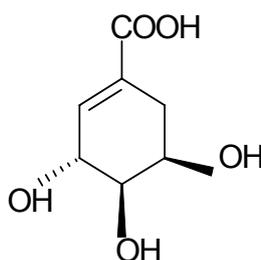


Figura 4. Estructura química del ácido siquímico

4.7.2 terpenos

Los terpenos forman una amplísima y muy diversa familia de sustancias naturales. Los terpenos juegan un papel defensivo importante, al ser tóxicos para los depredadores de las plantas. Tradicionalmente son considerados derivados del 2-metil-butadieno, conocido como isopreno. La “regla del isopreno” ha permitido clasificarlos y estudiarlos. El verdadero precursor de los terpenos es el ácido mevalónico, el cual proviene del acetil coenzima A.

Siguiendo esta regla los terpenos que son clasificados según las unidades de isopreno que lo componen C_5 : hemiterpenos, C_{10} : monoterpenos, C_{15} , sesquiterpenos: C_{20} , diterpenos: C_{30} , triterpenos, etc. Estos compuestos se encuentran en: semillas, flores, hojas, raíces y madera, de las plantas superiores así como musgo, algas y líquenes. Desde el punto de vista químico, son hidrocarburos, compuestos solo por carbono e hidrógeno. Algunos son precursores de ciertas vitaminas, como la A, la K, y la E (Dewick, 1997).

4.7.2.1 triterpenoides (C_{30})

Forman un grupo grande de sustancias naturales que incluyen a los esteroides, de gran importancia farmacéutica (Ej. los glucósidos cardiotónicos), los esteroides (que constituyen una parte importante de las membranas biológicas), las saponinas (que tienen gran importancia económica) y los limonoides (con función repelente a insectos). El esqualeno (Figura 5) es el precursor biológico inmediato de todos los triterpenoides, estos son compuestos naturales biológicamente activos, extraídos de las plantas. Ellos poseen actividades antiinflamatorias, anticancerígenas y propiedades antioxidantes (Cipak et al., 2006).

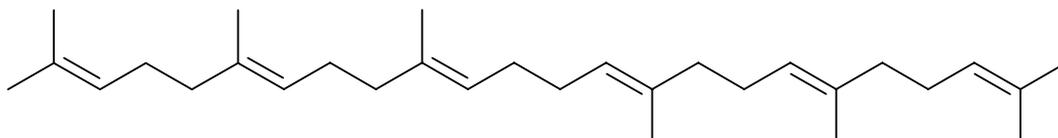


Figura 5. Estructura del esqualeno

4.7.2.2 canofilol

Es un triterpenoide que se encuentra en un gran número de plantas (Figura 6): en *Maytenus laevis* (Nakagawa et al., 2004), *Calophyllum brasiliense* (Reyes-Chilpa et al., 2004), *Hippocratea excelsa* (Navarrete et al., 2002), entre otras. Nakagawa y colaboradores en el 2004 aislaron varios compuestos de la planta *Maytenus laevis* entre ellos el canofilol, los cuales fueron evaluados como inductores de la actividad de citocinas en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs), adicionando cada compuesto a una concentración de 1 a 10 µg/mL en cultivos de PBMC por 48 h a 37°C, las citocinas en los sobrenadantes fueron analizadas por ELISA. De los compuestos evaluados el canofilol fue el más efectivo para la inducción de citocinas (Nakagawa et al., 2004).

Mitaine y colaboradores en el 2002 evaluaron 10 triterpenoides entre ellos el canofilol como inhibidores potenciales de elastasa leucocítica humana (HLE). El canofilol mostró una marcada actividad inhibitoria de HLE con una IC₅₀ de 2.5 µM (Mitaine et al 2002).

El Grupo de Reyes Chilpa en el 2004 realizaron una evaluación citotóxica por el método de sulforrodamina B (SRB) de los compuestos que obtuvieron de *Calophyllum brasiliense* entre ellos el canofilol en 3 líneas celulares humanas K562 (eritroleucemia), U252 (sistema nervioso central) y PC3 (próstata). El canofilol fue evaluado a 31 µM, obteniéndose un 7 %, 13.7 % y 0 % de actividad inhibitoria en PC3, U251 y K562 respectivamente (Reyes-Chilpa et al., 2004).

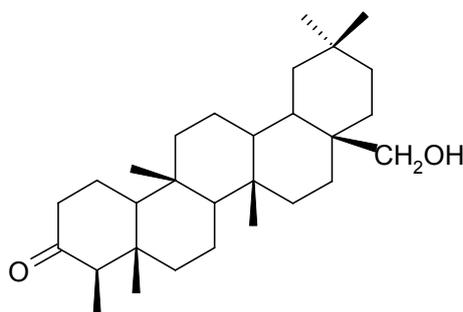


Figura 6. Estructura química del canofilol.

4.7.2.3 friedelina

Es un triterpenoide encontrado en un gran número de plantas (Figura 7) como en *Rabdosia japonica* (Wang et al, 2005), *Mallotus apelta* (Van et al., 2004), *Pourouma guianensis* (Torres et al, 2004), *Dalbergia hainanensis* (Zhang et al, 2003), *Hippocratea excelsa* (Navarrete et al, 2002) entre otras. El grupo de Reyes Chilpa en el 2004 obtuvieron friedelina de *Calophyllum brasiliense* y evaluaron su actividad citotóxica a 31 μM en 3 líneas celulares humanas por el método de SRB donde obtuvieron 61.9%, 25.8% y 0% de actividad inhibitoria en PC3, U251 y K562 respectivamente y adicionalmente observaron que posee actividad antifúngica y antibacteriana (Reyes-Chilpa et al, 2004).

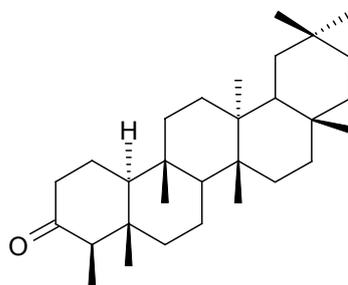


Figura 7. Estructura química de Friedelina

4.7.3. flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos cuya estructura contiene un esqueleto de quince carbonos y su disposición es similar a un anillo de flavano (Figura 8). Los flavonoides son producidos por biosíntesis mixta, debido a que parte de su molécula (anillo B), se forma a partir de la ruta del ácido siquímico, mientras que la otra parte de la molécula (anillo A) se sintetiza por la vía del malonato. Se encuentran en plantas comestibles, semillas, nueces, granos y diferentes plantas medicinales, así como en el vino rojo, te, cerveza y también en el café (Peterson et al, 1998; Kuhnau et al, 1976; Samuelsson, 1999).

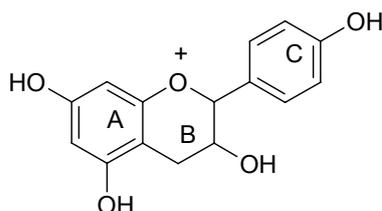


Figura 8. Estructura general de un flavonoide (flavano).

Los flavonoides son categorizados de acuerdo a su estructura química en: flavonas (encontradas en verduras incluyendo tomillo y perejil), isoflavonas (leguminosas como frijol), catequinas (té verde y manzanas), antocianidinas (uvas, cerezas, mora azul, ciruelas y en algunas otras frutas coloreadas), flavonoles (cebolla, col y brócoli. Un ejemplo de ellos es la quercetina) y flavononas (encontradas en frutas cítricas) (Peterson et al., 1998; Pietta, 1999). Son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas, en donde juegan un papel importante como: pigmentos, bactericidas, fungicidas, absorben la luz UV, son secretadas al suelo por las raíces de las leguminosas, regulan la expresión génica en bacterias nitrificadoras, constituyen atractivos de los insectos y de algunas aves para la polinización (Middleton et al, 2000).

Alrededor de 4,000 flavonoides han sido bien identificados, muchos de los cuales se encuentran en frutas, vegetales y bebidas. Estos compuestos poseen actividades antioxidantes (Pannala et al, 1998); se unen a iones metálicos evitando que estos actúen como catalizadores que aumenten la producción de radicales libres en el cuerpo (Yamaguchi et al, 2005); son atrapadores de radicales libres en la activación de carcinógenos y mutágenos (Pannala et al, 1998); afectan la progresión del ciclo celular y alteran la expresión de genes y proteínas (Pannala et al, 1998; Ferry et al, 1999); además son antiinflamatorios, antibacterianos, anticarcinogénicos (Middleton et al, 2000), quimiopreventivos (Birt et al, 2001; Galati et al, 2000). Algunos flavonoides pueden actuar como antiespasmolíticos por relajación de músculo liso en mamíferos (Middleton et al., 2000). Muchos flavonoides han mostrado una potente actividad como agentes hepatoprotectores (Middleton et al, 2000); algunos como quercetina y epicatequina muestran actividad analgésica significativa (Myers, 1998).

Los flavonoides son rápidamente absorbidos (Cova et al., 1992; King et al., 1998) y permanecen estables en el fluido luminal (Hollman et al., 1995). Además la habilidad de las células intestinales para acumular flavona es consistente con el papel de los flavonoides en la prevención del cáncer de colon (Kuo et al., 1998). Los flavonoides son conocidos por su poder antioxidante *in vitro* (Pannala et al, 1998). Datos convincentes de estudios *in vitro* y *in vivo*, investigaciones epidemiológicas y ensayos clínicos en humanos indican que los flavonoides tienen efectos importantes en la quimiopreención y terapia contra el cáncer (Galati et al, 1994).

Los flavonoides pueden interferir en varios de los pasos que llevan al desarrollo de tumores malignos, incluyendo la protección al ADN de daño oxidativo, inhibición de la activación de carcinógenos, de estrés oxidante y detoxificación de sistemas (Galati et al, 2004; Galati et al, 2000; Birt et al, 2001; Ren et al, 2003). El daño oxidativo al ADN es uno de los mecanismos que juega un papel importante en la mutagénesis y carcinogénesis (Sahu et al, 2001). Los flavonoides polifenólicos pueden actuar como antioxidantes y prooxidantes dependiendo de su estado redox o del ambiente biológico en el que se encuentren (Figura 9).

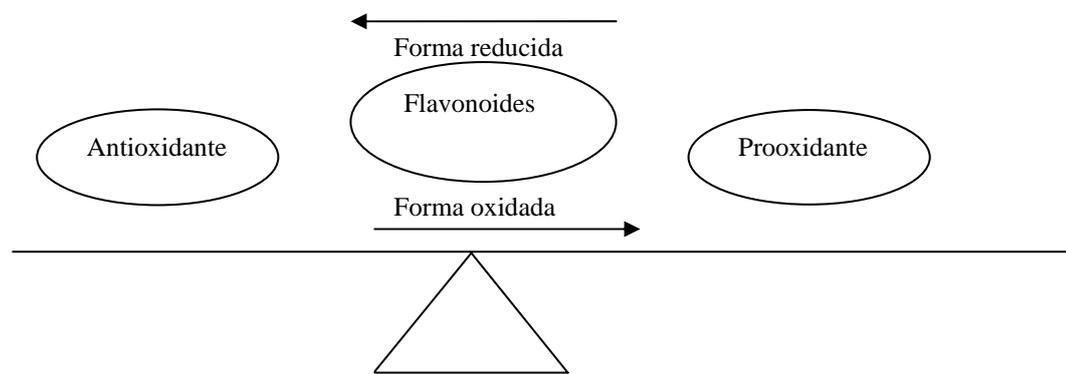


Figura 9. El diagrama representa el balance entre las características antioxidantes y pro-oxidantes de los flavonoides y otros compuestos fenólicos. Las formas reducidas de los flavonoides y otros fenólicos actúan como antioxidantes, sin embargo las formas oxidadas (radicales fenoxil) pueden tener actividad pro-oxidante (Tomada de Sahu et al, 2001).

Los biflavonoides son dímeros de los flavonoides por una unión C-C o C-O-C, se ha observado que tienen propiedades como anti-inflamatorios, anti-artríticos (Harborne, 1967), anticancerígenos (Lin et al, 2000; Murray et al, 2006; Wall et al, 1994). En la búsqueda de quimioterapéuticos menos tóxicos para el tratamiento de cáncer de mama, algunos laboratorios han puesto notable atención en los biflavonoides y en sus análogos sintéticos, el galangin es un ejemplo de los compuestos polifenólicos que ha mostrado actividad biológica importante, este inhibe la transición de G_0/G_1 a la fase S del ciclo celular en ER-Hs578T células de cáncer de mama epitelial humano que contiene receptor de estrógeno, deteniendo así la proliferación celular (Murray et al., 2006). Algunos biflavonoides tienen la propiedad de suprimir especies reactivas de oxígeno e inhibir ciclooxigenasas (Kim et al, 1999).

4.7.3.1. amentoflavona

La amentoflavona (Fig. 10A) es un biflavonoide, dímero de la apigenina (Fig. 11A). Se encuentra en un gran número de plantas con propiedades medicinales incluyendo: *Ginkgo biloba* (Saponara et al, 1998), *Hypericum perforatum* (Xulin et al, 2005), *Calophyllum brasiliense* (Reyes-Chilpa et al, 2004A y 2004B), *Ouratea semiserrata* (Grynberg et al, 2002) y *Shelaginella delicatula*, esta última es ampliamente usada en la medicina tradicional China en el tratamiento contra el cáncer, gastritis, hepatitis y enfermedades cardiovasculares (Lin et al, 2000). A la amentoflavona le son conocidas varias actividades farmacológicas tales como: efectos antioxidantes (Gambhir et al, 1987; Huguet et al, 1990; Yamaguchi et al, 2005), antiinflamatorios (Kim et al, 1998; Huguet et al, 1990; Tordera et al, 1994), antivirales (Lin et al, 1999), efectos citotóxicos (Grynberg et al, 2002; Lin et al, 2000), antifúngicos (Woo et al, 2005), también inhibe la fosfolipasa C1 (Lee et al, 1996) lo cual correlaciona con la inhibición de la proliferación celular en líneas celulares (Ji et al, 2000; Pico et al., 2002), e inhibe a la fosfodiesterasa dependiente de AMPc (Saponara et al, 1998) aunado esto último con el aumento intracelular de AMPc; lo que causa efectos cardiovasculares como estimulación cardíaca, aumento de contractibilidad y frecuencia cardíaca, además de reducción de la resistencia vascular sistémica que tiende a bajar la presión arterial (Maxwell et al, 2004).

También se ha encontrado que la amentoflavona es inhibidor reversible de la Catepsina B que es una proteína lisosomal de la familia de proteasas de residuos de cisteína, interviene en diferentes procesos fisiológicos; tanto en procesamiento de antígenos en la respuesta inmune como en la activación hormonal. También hay evidencias de que la Catepsina B esta relacionada en enfermedades crónicas inflamatorias como artritis y en el cáncer (Xulin et al, 2005).

En trabajos de Spedding en 1989, 18 flavonoides fueron investigados para analizar la inhibición de transcriptasas reversas (RT), la amentoflavona y la quercetina fueron los compuestos más activos y sus efectos fueron dependientes de la concentración (Spedding, 1989).

Banerjee y colaboradores en el 2002 demostraron que la amentoflavona inhibe la actividad del factor de transcripción NF- κ B, favoreciendo la inhibición de la degradación

de I κ B α y la disminución de la translocación al núcleo de NF- κ B, disminuyendo la expresión de la COX-2 en células A549 activadas con TNF- α . El factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en la expresión de genes implicados en la proliferación celular, inflamación y apoptosis (Peterson et al, 1998; Pannala et al, 1998). La amentoflavona aparentemente afecta múltiples procesos que modulan la expresión de genes por TNF α en células A549. La liberación de NF- κ B y su unión al ADN ocurre en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo la quimioterapia y la radiación. La inducción de NF- κ B promueve resistencia a TNF y a la quimioterapia y la inhibición de la activación de NF- κ B por sobre-expresión de I κ B restablece la sensibilidad a TNF y a la quimioterapia (Wang et al, 1996). Esto sugiere que la activación de NF- κ B puede ser un importante mecanismo de resistencia a la quimioterapia. Estudios en líneas celulares *in vitro* han mostrado que NF- κ B tienen una actividad incrementada en cáncer de mama y próstata (Nakshatri et al, 1997; Catz et al, 2001).

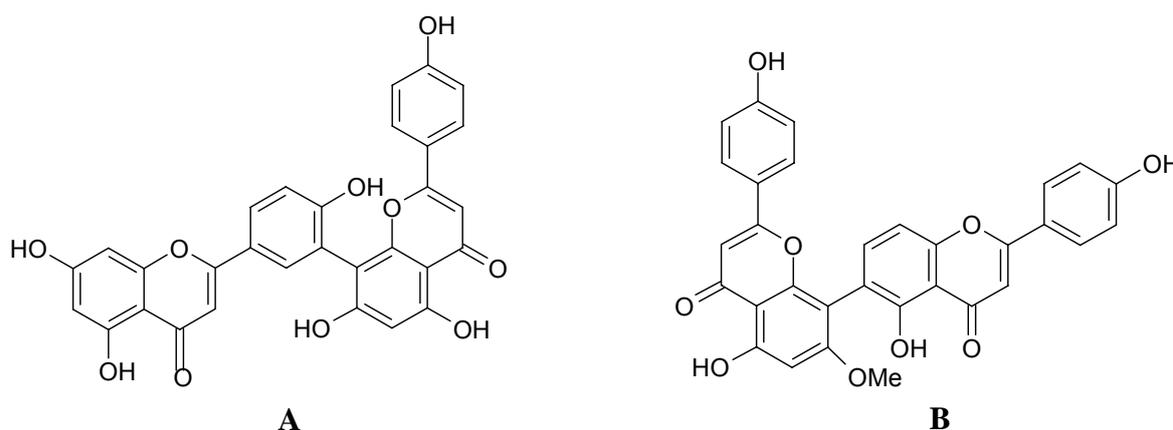


Figura 10A. Estructura química de la amentoflavona, 10B. Estructura de la 7''-O metil-agatisflavona.

Grynberg y colaboradores en el 2002 aislaron y caracterizaron 7''-O-metil-agatisflavona (Fig. 10B) y amentoflavona (Fig. 10A) proveniente de *Ouratea semiserra*, también obtuvieron un derivado acetilado de amentoflavona por medio de una acetilación con anhídrido acético en presencia de piridina. Las actividades antiproliferativas fueron evaluadas *in vitro* por la técnica del MTT en 2 líneas celulares humanas: carcinoma de Ehrlich y K562 a 45 h de incubación, a concentraciones de, 25, 50, 100 y 200 μ M. Los compuestos mostraron actividad inhibitoria dependiente de la concentración en la línea

de carcinoma de Erlich, con una IC_{50} de 24 μM para 7''-O metil-agatisflavona, 26 μM para amentoflavona y para el derivado acetilado de 10 μM , mientras que en K562 la 7''-O metil-agatisflavona a 90 μM tuvo una actividad inhibitoria del 42%, mientras que amentoflavona y su derivado acetilado no mostraron actividad inhibitoria (Grynberg et al, 2002). En la misma publicación Grynberg demostró por ensayos de relajación de ADN súper-enrollado que la amentoflavona y su derivado acetilado son inhibidores de la Topo I a 200 μM , mientras que para la Topo II no se presentó inhibición en su actividad.

Rahman y colaboradores en 1989 demostraron que un gran número de polifenoles son capaces de cortar al ADN, al funcionar como pro-oxidantes, particularmente en presencia de iones metálicos de transición (Figura 11A y 11B). También demostraron que la amentoflavona es más eficiente que otros polifenoles para degradar al ADN (Rahman et al, 1989).

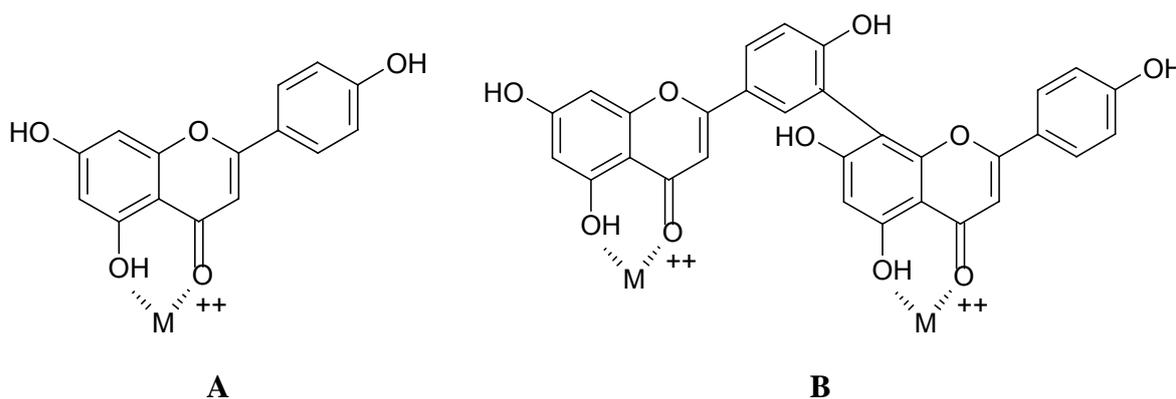


Figura 11A. Estructura de la apigenina con un solo un sitio de quelación metálico. 11B. amentoflavona con dos posibles sitios de quelación metálicos.

Uddin y colaboradores en el 2004 demostraron que la amentoflavona en un rango de 50 a 400 μM en presencia de iones de cobre es capaz de reducir Cu (II) a Cu (I) y generar radicales hidroxilo, adicionalmente se observó un efecto en la hidrólisis de ADN en función de la concentración de amentoflavona (Uddin et al, 2004).

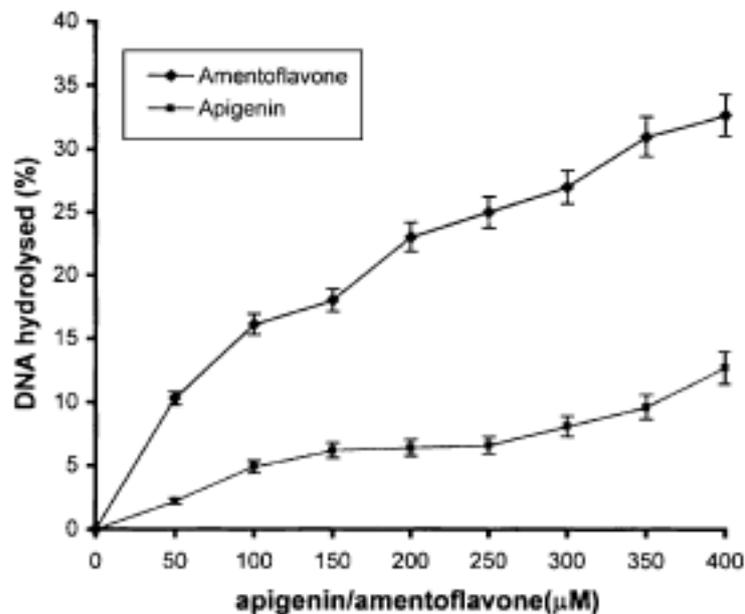
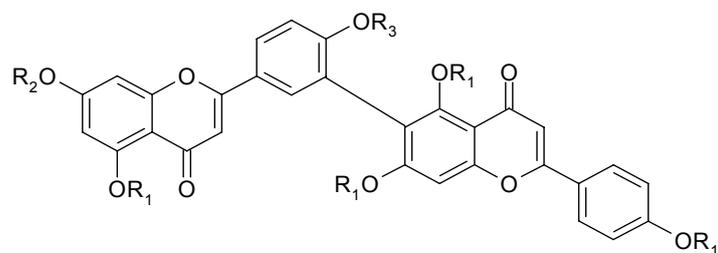


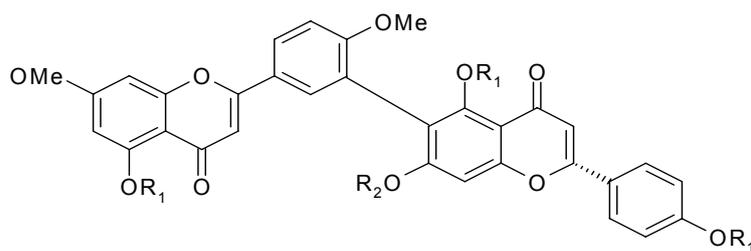
Figura 12. Degradación de ADN de timo de becerro por la amentoflavona y apigenina en presencia de Cu (II). (Tomada de Uddin et al., 2004).

Lin y colaboradores en el 2000 aislaron y caracterizaron 4 biflavonoides nuevos (A, B, C y D) y 2 conocidos; amentoflavona y robustoflavona de *Selaginella delicatula*. De los compuestos nuevos se aislaron: A) robustoflavona 4'-metil éter (Figura 13A), B) robustoflavona 7,4'-dimetil éter (Figura 13B), C) 2'',3''-dihidrorobustoflavona 7,4'-dimetil éter (Fig. 13C) y D) 2'',3''-dihidrorobustoflavona 7,4',7''-trimetil éter. (Figura 13D). Fue evaluada su actividad citotóxica por la técnica de incorporación de timidina tritiada, probándolos a diferentes concentraciones (12.5, 25, 50 y 100 μM) en 6 líneas celulares humanas: Raji, Calu-1, K562, Vero, Wish y HeLa. De los compuestos evaluados solo el A y el C mostraron actividad inhibitoria en dos líneas celulares. El compuesto A y C a 100 μM en células Calu-1 presentaron actividad inhibitoria del 100% y en células Raji 98.4% y 96.3% respectivamente. La robustoflavona es un isómero de la amentoflavona, y presenta una moderada actividad inhibitoria, mientras que la amentoflavona no presenta actividad en estas condiciones (Lin et al., 2000).



A) R₁=H R₂= H R₃=Me

B) R₁=H R₂= Me R₃=Me



C) R₁ =R₂=H

D) R₁=H R₂ = Me

Figura 13. Estructuras químicas de **A)** robustoflavona 4'-metil éter. **B)** robustoflavona 7,4'dimetil éter. **C)** 2'',3''-dihidrorobustoflavona 7,4'dimetil éter. **D)** 2'',3''-dihidrorobustoflavona 7,4',7''-trimetil éter.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1 Extracción, aislamiento e identificación de friedelina, canofilol, ácido siquímico y amentoflavona de un extracto cetónico de *Calophyllum brasiliense*.

Para la obtención amentoflavona se requirió de un procedimiento en el cual se aisló conjuntamente el canofilol, friedelina y ácido siquímico.

5.1.1 Material biológico.

Se partió de un extracto cetónico de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, proporcionado por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química de la UNAM.

5.1.2 Cromatografía e instrumentación.

El extracto se separó en sus diferentes componentes utilizando Cromatografía en Columna (cc), Cromatografía Flasch y Cromatografía en Capa Fina (ccf). La cc consiste en una técnica de separación de mezclas o purificación de sustancias, en donde hay dos fases una móvil y otra estacionaria que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo, regularmente se utiliza como fase estacionaria gel de sílice o alúmina dentro de una columna y como fase móvil disolventes orgánicos. La columna se empaca con una mezcla de soporte y disolvente y se rellena colocando previamente en el fondo de ésta un poco de algodón o lana de vidrio para evitar que la sílica o la alúmina queden retenidas en la columna. A continuación se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido, que pasa a través de la columna por efecto de la gravedad. La Cromatografía Flash que al igual que la cc consiste en una técnica de separación de mezclas o purificación de sustancias en donde hay dos fases, la diferencia entre ambas técnicas es que se utiliza un embudo de separación en lugar de una columna y que el disolvente elegido eluye por aplicación de presión, por lo que es una técnica de separación más rápida. La ccf consiste en una técnica que permite determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras, realizar el seguimiento de una reacción, monitorear el contenido de las fracciones obtenidas en cromatografía de columna, en ccf se usa como fase estacionaria un sólido como gel de sílice ó alúmina conteniendo algún material que hace que se mantenga la fase estacionaria sobre un soporte como placas de vidrio ó aluminio y como fase móvil disolventes orgánicos. Se disuelve una pequeña cantidad de la muestra y mediante un capilar de vidrio se coloca en la parte inferior de la placa,

la placa se introduce en un recipiente con disolvente adecuado el cual asciende por capilaridad y finalmente la placa es revelada.

En la separación cromatográfica se utilizaron: como adsorbentes celita y gel de Sílice 60 (Merck) y como eluyentes diferentes disolventes orgánicos. La pureza de los compuestos fue observada por ccf utilizando cromatofolios de Sílica Gel de 0.25 mm de espesor (Merck) y como reveladores se usaron: luz ultravioleta, cloruro férrico y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 1 N. Las constantes físicas y los datos espectroscópicos que sirvieron para la identificación de compuestos aislados, fueron obtenidos como se indica a continuación:

- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher Johns.
- Los R_f (distancia recorrida del compuesto/distancia recorrida del disolvente) se identificaron en cromatofolios de fase normal en gel de sílice (Merck) con ayuda de referencias caracterizadas previamente.
- Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (HMNR) se realizaron en los espectrofotómetros Varian Gemini 2000 (200MHz) y Varian Unity 300 (300 MHz).
- Los espectros de ¹³CRMN se determinaron en un espectrofotómetro Varian Gemini 2000 (200 MHz).

5.1.3. Cromatografía del extracto cetónico.

Se inicio con una cromatografía flash y se partió de 25.3 g del extracto cetónico que fue disuelto en acetato de etilo y se preabsorbió en 70 g de celita siguiendo la proporción recomendada de 5 gramos de celita por gramo de extracto. Se dejó evaporar el disolvente de la celita durante 2 días, agitándola con agitación constante.

La celita con el extracto preabsorbido se colocó sobre un embudo Buchner de cerámica previamente empacado con 154 g de gel de sílice homogenizado en hexano. Empacado el embudo, se eluyó el extracto con hexano, acetato de etilo y una mezcla de estos disolventes en diferentes proporciones. Se obtuvieron 17 fracciones de 500 mL. Cada una de las fracciones obtenidas se concentraron en un rotavapor (Modelo R II, BUCHI). Se utilizaron diferentes proporciones de los disolventes para eluir mezclas de sustancias de diferente polaridad, comenzando por los de menor polaridad.

Las 2 primeras fracciones se eluyeron con hexano, en las cuales no eluyó ningún compuesto empacado en el embudo, esto se pudo comprobar por ccf. De la fracción 3 a la 6 se eluyó con una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 8:2, de ellas en las fracciones 3 y 4 se obtuvieron dos precipitados color blanco con p.f. de 258-260°C y de 269-272°C respectivamente. Estos precipitados fueron solubles en cloroformo y diclorometano. Se realizó su ccf observándose que ambos precipitados tenían dos manchas con RF similares, por lo que se trataban de dos compuestos pero mezclados, por lo que se realizó una cromatografía en placa fina preparativa, en fase normal utilizando como fase móvil hexano /acetato de etilo 9:1, las manchas de los compuestos se separaron, la placa se raspó en donde se encontraban cada uno de los compuestos, obteniendo cristales blancos en ambos.

La fracción 7-9 se eluyó con una mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 6:4.

La fracción 10-11 se eluyó con mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 4:6.

La fracción 12-13 se eluyó con mezcla hexano/acetato de etilo en una proporción 2:8

La fracción 14-15 se eluyó con acetato de etilo puro.

La fracción 16-17 se eluyó con mezcla acetato de etilo/metanol 8:2

Cada una de las fracciones obtenidas se analizaron por ccf empleando diferente fase móvil: hexano, hexano/acetato de etilo 8:2, hexano/acetato de etilo 1:1 y acetato de etilo y se reunieron con base en la similitud de su patrón cromatográfico.

Las fracciones 1 y 2 se denominaron fracción **I**, las fracciones 3 a 6 fracción **II**, las fracciones 7 a 10 fracción **III**, las fracciones 11 a 15 fracción **IV** y 16 a 17 fracción **V**. De esta forma se organizaron 5 fracciones de las que la **V** se subdividió como se observa en la Figura 14.

FASE ORGÁNICA
Extracto cetónico de hojas de
Calophyllum brasiliense

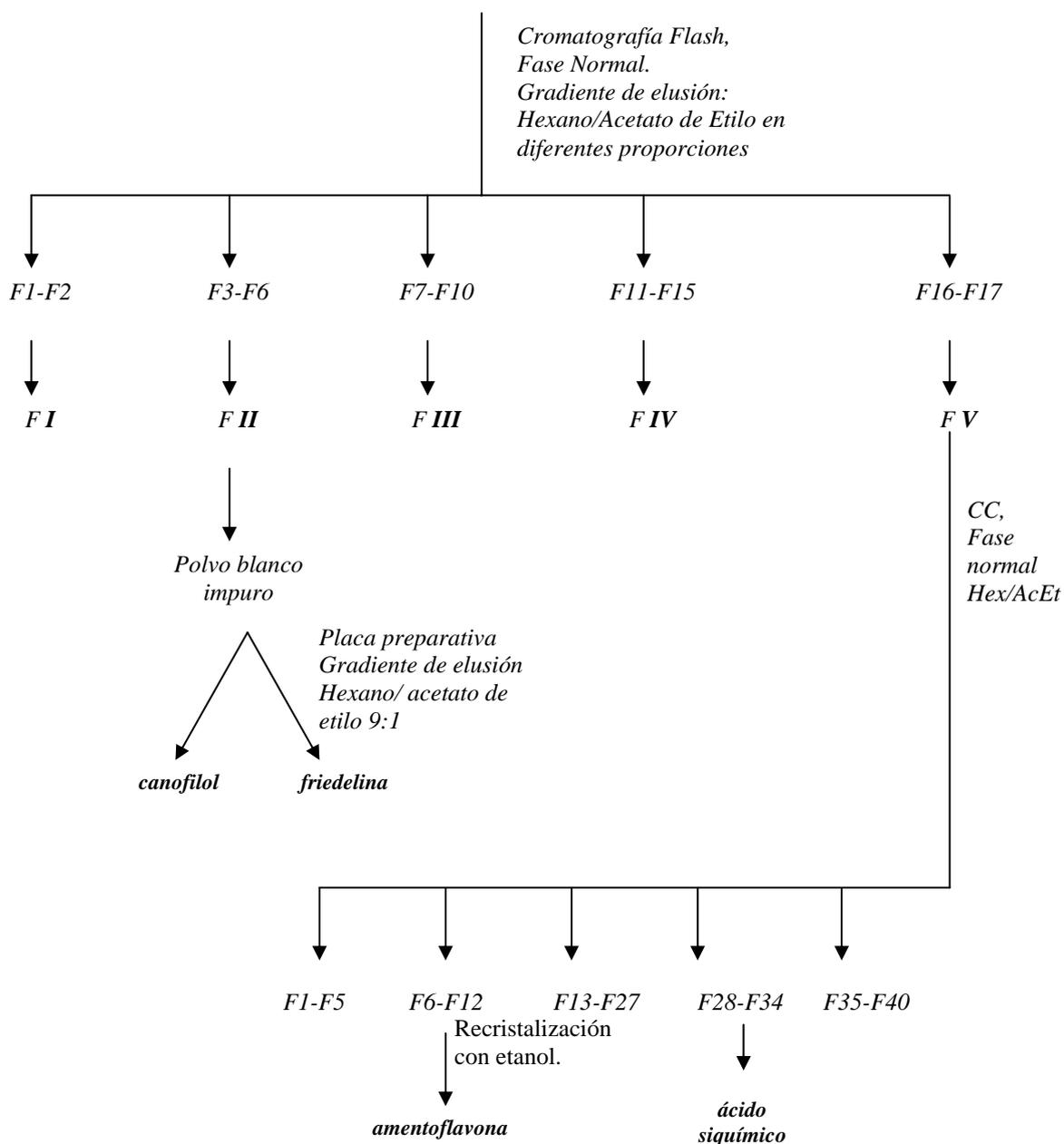


Figura 14. Esquema de separación cromatográfica empleado para la obtención friedelina, canofilol, amentoflavona y ácido siquímico a partir de un extracto cetónico de hojas de *C. brasiliense*.

6.1.4 Aislamiento del canofilol y friedelina.

De la fracción número II se obtuvo un precipitado blanco impuro, en su ccf se observaron 2 manchas, por lo que se realizó una cromatografía en placa preparativa fase normal utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo 9:1, separando cada uno de los compuestos cuyos cristales blancos se secaron al vacío. El punto de fusión de uno de ellos fue de 281-282°C y del otro de 260-261°C. Posteriormente fueron identificados por métodos espectrofotométricos como: ¹HRMN, ¹³CRMN, e IR, tratándose de canofilol y friedelina.

6.1.5 Aislamiento de la amentoflavona.

La fracción número V fue analizada por ccf observándose 3 manchas de color amarillo intenso. 21.7 g de esta fracción se preabsorbió en 64.19 g de celita y se colocó ya seca en una columna cromatográfica previamente empacada con 260 g de sílica gel (malla 70/230) y se eluyó con una mezcla hexano/aceto de etilo, primero 1:1, posteriormente 2:8 y por último solo acetato de etilo. Se recolectaron fracciones de 250 mL que posteriormente se concentraron en un rotavapor. Cada una de las fracciones obtenidas fueron analizadas por ccf.

De la fracción 10 eluida con hexano/acetato de etilo (2:8) se obtuvo un precipitado color verde, el cual se lavó con etanol, obteniéndose cristales de color amarillo que fueron secados al vacío. Su punto de fusión fue de 249-250 °C. El compuesto obtenido se analizó por ccf fase reversa (Silica Gel C-18: metanol/agua 8:2) y se uso como referencia al biflavonoide amentoflavona y se observó que tenía el mismo RF y que el compuesto obtenido se encontraba puro. La identificación de este compuesto se comprobó por métodos espectrofotométricos como: ¹HRMN, ¹³CRMN, e IR.

5.1.6 Aislamiento del ácido siquímico.

De la fracción 33 se obtuvieron cristales color café los cuales fueron analizados por ccf (acetonitrilo/metanol, 8:2) y se observaron 2 manchas, esto quiere decir que en los cristales había 2 compuestos químicos. Se realizó la identificación espectrofotométrica por IR y por ¹HRMN y se trató del ácido siquímico con una impureza que no fue identificada.

5.2 Evaluación de la citotoxicidad de la amentoflavona en líneas celulares humanas.

5.2.1 Líneas celulares.

Las líneas celulares humanas empleadas adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) fueron las siguientes:

- -HeLa: Línea celular que proviene del adenocarcinoma de cérvix de una mujer afroamericana de 31 años de edad, crece de forma adherente y posee la secuencia para el virus del papiloma humano18.
- MCF-7: Línea celular aislada de adenocarcinoma de glándula mamaria que expresa el receptor de estrógenos. Proviene de una mujer caucásica de 69 años, carece de caspasa 3 proteasa efectora en apoptosis.
- K562: Está línea celular de leucemia mielogénica crónica humana fue obtenida de la pleura de una mujer de 59 años en fase terminal, carece de p53.
- SW620: Línea celular aislada del adenocarcinoma de colon de un hombre caucásico de 51 años de edad. Una recurrencia del padecimiento resultó en una metástasis diseminada de colon a una masa abdominal.

5.2.2 Mantenimiento de líneas celulares.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Invitrogen, Carlsbad California).

La manipulación de las líneas celulares se realizó en una campana de flujo laminar vertical en un ambiente estéril, los materiales y reactivos utilizados fueron esterilizados antes de ser utilizados.

El mantenimiento de las líneas celulares en cultivo se llevó a cabo a las siguientes condiciones: a 37 °C, 5% de CO₂, 95% de aire y 95% de humedad relativa, en una incubadora con inyección de CO₂ (Thermo electron-corporation E.U.A.).

5.2.3 Preparación de reactivos y medios de cultivo.

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

5.2.3.1 Preparación para un litro del medio D-MEM (Dulbeccos Modified Eagle Médium) (Invitrogen, Carlsbad California).

1. Se midieron 700 ml de agua desionizada estéril y se colocaron en un vaso de precipitados de 1L.
2. Se agregaron 2.2 g de HEPES y 3.7 g de bicarbonato de sodio al vaso de precipitados.
3. Se adicionaron 10 mL de solución de aminoácidos no esenciales 10 µM, solución 100X (Invitrogen, Carlsbad California).
4. Se agregaron 10 mL de antibiótico-antimicótico (Penicilina en Solución 10,000 U/mL, Sulfato de Estreptomicina 10,000 µg/mL y anfoterisina B 25 µg/mL, (Invitrogen, Carlsbad California).
5. Se adicionaron 10 mL de solución de piruvato de sodio 100 µM, solución 100X (Invitrogen, Carlsbad California) y se agregaron en el vaso de precipitados.
6. Se agregó al vaso de precipitados un sobre de Dulbeccos Modified Eagle Médium.
7. Se tapó el vaso con papel aluminio y se colocó en un agitador magnético.
8. Se agitó suavemente hasta que se disolvieron todos los compuestos agregados.
9. Se adicionó agua desionizada estéril hasta obtener 900 mL de medio.
10. El medio preparado se filtró en una membrana Millipore de 0.22 µm (Millipore ®)
11. Se complemento el medio con 100 mL de suero fetal bovino inactivado para completar 1 L.

5.2.3.2 Preparación de PBS-EDTA (1L)

NaCl	8.000 g
KH ₂ PO ₄	0.240 g
Na ₂ HPO ₄	1.440 g
KCl	0.200 g
EDTA (sal disódica dihidratada)	0.372 g
Agua desionizada c.b.p	1.00 L

1. Se disolvieron las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada
2. Se ajustó el pH a 7.4
3. Se adicionó agua desionizada hasta completar un volumen de 1L.
4. La solución se adicionó en alícuotas y se esterilizaron en una autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in².
5. La solución se almacenó a temperatura ambiente ó en refrigeración.

5.2.3.3 Preparación de PBS (1 L)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

La preparación se realizó de la misma manera que el PBS-EDTA

5.2.3.4 Preparación de la solución de MTT

Se preparó la solución del reactivo de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio "MTT" (Sigma San Louis Mo) en PBS a una concentración de 5 mg/mL utilizando frascos limpios y estériles.

MTT	50 mg
PBS	10 mL

1. Se pesó el MTT.
2. Se disolvió en el PBS previamente esterilizado.
3. Se esterilizó por filtración con una membrana de 0.22 μm (Millipore $\text{\textcircled{R}}$).
- 4.- Se conservó el reactivo en refrigeración, envuelto en papel aluminio.

5.2.3.5. Preparación de la amentoflavona

Se preparó un stock de amentoflavona disolviéndose en DMSO, a partir de este stock se hicieron diferentes diluciones con D-MEM para obtener las concentraciones 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 μM . Posteriormente para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron todas y cada una de las concentraciones 5 veces mas concentradas (5X) en un volumen de 50 μl , los cuales se adicionaron a las placas de cultivo de 96 pozos, en donde un cultivo de líneas celulares previamente establecido con 200 μl de D-MEM esta listo para evaluar a la amentoflavona, diluyéndose 1:5 y así obtener las concentraciones deseadas.

5.2.4. Métodos empleados en cultivos celulares.

5.2.4.1 Descongelamiento de las líneas celulares.

1. Se colocaron 5 mL de D-MEM en cuatro placas de cultivo de 5 cm de diámetro y se atemperaron en la incubadora de CO_2 por 5 a 10 min.
2. Las suspensiones de las diferentes líneas celulares contenidas en criotubos a -192°C en un contenedor de N_2 líquido (Wharton Inc. E.U.A.), fueron extraídas y descongeladas; frotando los criotubos manualmente hasta quedar como una pastilla de hielo resuspendida.
3. Se agregó el contenido de cada uno de los criotubos a su correspondiente placa de cultivo con D-MEM previamente atemperado y se homogenizó el contenido con movimientos circulares suaves.
4. Las líneas celulares se cultivaron en la incubadora de CO_2 durante dos horas, para que las células se adhirieran a la superficie de la placa.
5. Una vez que las células se adhirieron a la superficie, se les cambió el medio de cultivo para desechar tanto las células que no se adhirieron a la placa así como los restos del medio de congelamiento y de detritus celulares.

6. Se cambió el medio de cultivo, cuando cada línea celular lo requirió (por lo general cada dos días)
7. Cuando se observó en el microscopio invertido (Olympus, Tokio) una confluencia celular de entre 80-90% (es decir, las células en proliferación cubrían un área de entre 80 a 90% del fondo de la placa de cultivo) se procedió a realizar su propagación.

5.2.4.2 Propagación de líneas celulares.

Para ampliar el número de células necesarias para un ensayo de citotoxicidad fue necesario propagar cada uno de los cultivos o simplemente para conservar el cultivo en estado óptimo de proliferación de acuerdo a las necesidades se procedió a la propagación:

1. El medio de cultivo de cada placa se decantó para descartarlo con previa aplicación de movimientos circulares suaves.
2. Se lavó con PBS-EDTA y se decantó nuevamente el sobrenadante.
3. Se agregó 1 ml de PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular formada en el fondo de la caja petri y se incubó durante 5-10 min.
4. Con la ayuda de una pipeta estéril se procedió a despegar suavemente las células de la caja petri, hasta observar una turbidez en la suspensión celular.
5. Una vez despegadas las células, se pasó una alícuota de la suspensión celular a una caja de 10 cm de diámetro que contenía 6 ml de medio D-MEM y se distribuyó uniformemente con movimientos circulares y se incubó.

5.2.4.3 Conteo celular en cámara de Newbauer.

1. Se inició nuevamente con una confluencia de 80 a 90% para cada línea celular.
2. Se lavó con PBS-EDTA y se decantó el sobrenadante.
3. Se agregó 1 ml de PBS-EDTA y se incubó de 5 a 10 minutos.
4. Con la ayuda de una pipeta estéril se procedió a despegar las células de la caja, hasta observar una turbidez en la suspensión celular.
5. Una vez que se desprendieron las células de las placas, se colocaron en un tubo cónico estéril de 50 mL, posteriormente se le agregó 10 mL de medio D-MEM.

6. La cámara Newbauer o hemocitómetro se limpió con etanol al 70% antes de ser usada y se secó.
7. Se tomó una alícuota de 20 μL de la suspensión celular perfectamente homogénea y se colocó en la cámara de Newbauer por capilaridad.
8. La cámara de Newbauer se colocó en el microscopio y se contaron las células localizadas en los 4 cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos.
9. Cuando se obtuvo el promedio de las cuatro cuadrículas se aplicó la siguiente fórmula:

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

Donde:

C = células en un mililitro de suspensión.

P = promedio de las células en los cuatro cuadrantes observados en la cámara de Newbauer.

1×10^4 = Factor utilizado, ya que el volumen de la zona de cada uno de los cuadrantes representa $1/1 \times 10^4$ partes de 1 mL.

Al obtener el número de células por mL, se calculó el volumen de suspensión adecuado para agregar el número de células necesario en los ensayos de citotoxicidad.

5.2.4.4 Ensayo de citotoxicidad.

Para observar el efecto de la amentoflavona en las líneas celulares humanas se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. A partir de los cultivos de cada una de las líneas celulares, plenamente establecidos y en una confluencia del 80 al 90%, se realizó el conteo en la cámara de Newbauer para calcular el volumen de suspensión adecuado (de 20 a 50 μL), de esta manera se agregaron 6,500 células en cada uno de los 96 pozos de una microplaca de cultivo.
2. Se agregó D-MEM cuanto bastó para 200 μL , se rotuló plenamente cada microplaca de acuerdo a la línea celular y se incubó por 24 horas.
3. Al término de la incubación se agregaron 50 μL de la amentoflavona diluida en DMSO y en D-MEM (el DMSO no paso del 0.4% en D-MEM), para obtener las diferentes concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 μM en los pozos y se completó un volumen de 250 μL por pozo.

4. Se incubó por 72 horas. Al finalizar la incubación se determinó la viabilidad celular por la técnica de reducción del MTT.

5.2.4.5. Ensayo de reducción de MTT.

La técnica del MTT 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 de color púrpura (formazán del MTT) (Fig. 15), esta reducción es producida principalmente por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Lawrence et al., 2000), por lo que la cantidad de formazán generado es debido a la reducción de células viables (Alley et al., 1988), es decir el color púrpura generado es directamente proporcional a la viabilidad celular y el cual se lee a 550 nm en un lector de microplacas. De esta manera la inhibición de la proliferación celular puede determinarse de forma indirecta al evaluar la viabilidad celular por este método. El procedimiento fue el siguiente:

1. Al término de la incubación de cada una de las líneas celulares tratadas con diferente concentración de amentoflavona, a cada uno de los pozos se le adicionaron 20 µL de una solución de 5.0 mg/mL de MTT.
2. Se incubó la placa de cultivo de 96 pozos por un mínimo de 4 horas. Después de este tiempo el MTT se redujo a formazán.
3. Se decantó el contenido de las placas del 96 y se resuspendieron los cristales de formazán sedimentados en el fondo de la placa con 200 µl de DMSO.
4. Se leyeron las absorbancias en un lector de placas de 96 a una longitud de onda de 550 nm. El porcentaje de células vivas se calculó con respecto a un control de cultivo celular sin tratamiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{inhibición} = 100 - \left[\frac{\text{absorbancia de problema} \times 100}{\text{absorbancia del control}} \right]$$

5. Con los datos obtenidos del % de inhibición se calculó el valor de IC₅₀ por medio de una regresión no lineal utilizando el programa Origin Pro 7.0 (Origin Lab, Northampton USA).

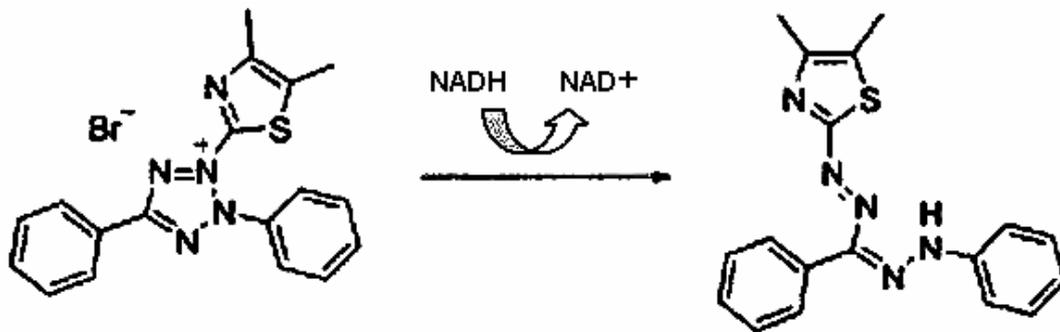


Figura 15. Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo tetrazolio el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria. (Tomada de Lawrence et al, 2000).

6. RESULTADOS.

En el presente trabajo se aislaron y caracterizaron 4 metabolitos secundarios provenientes de un extracto cetónico de hojas de *Calophyllum brasiliense* previamente preparado. Una vez aislada e identificada la amentoflavona, uno de los metabolitos aislados, se evaluó en cultivos de líneas celulares humanas de adenocarcinoma de cérvix HeLa, de adenocarcinoma de colon SW620, de mama MCF-7 y de eritroleucemia K-562. Se determinaron las IC₅₀ utilizando los valores de porcentaje de inhibición obtenidos por ensayos de MTT en periodo de exposición de 72 horas.

6.1. Aislamiento y caracterización.

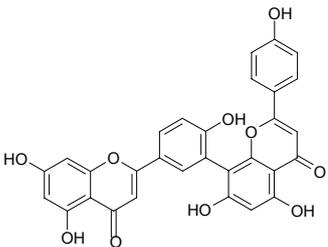
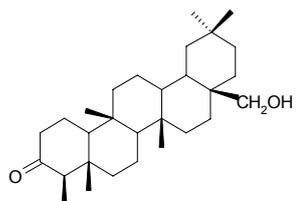
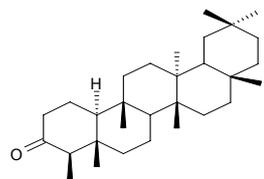
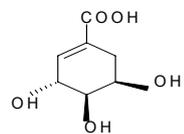
Del extracto cetónico de las hojas de *Calophyllum brasiliense* se separaron en 4 de sus diferentes componentes utilizando métodos cromatográficos: Cromatografía en columna, cromatografía flash y cromatografía en capa fina en fase normal (sílica gel, alúmina) y fase reversa (sephadex LH-20). Para la identificación de cada uno de los compuestos obtenidos se realizó un análisis espectroscópico (Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C).

Las estructuras químicas propuestas a partir de los análisis espectroscópicos los cuales se muestran en el apéndice de este trabajo, así como los puntos de fusión para los compuestos que fueron aislados, llevaron a la conclusión de que tales compuestos corresponden a los que se había propuesto en los objetivos:

1. amentoflavona.
2. canofilol.
3. friedelina.
4. ácido siquímico..

La estructura, descripción, punto de fusión así como el método de identificación utilizado se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructuras, descripción, punto de fusión y método espectroscópico utilizado para identificación de metabolitos secundarios aislados y caracterizados de extracto cetónico de *Calophyllum brasiliense*.

Compuesto	Estructura	Descripción	Punto de Fusión (°C)	Identificación
amentoflavona		Cristales amarillos	299-300	IR, ¹ HRMN, ¹³ CRMN
canofilol		Cristales blancos	281-282	IR, ¹ HRMN, ¹³ CRMN
friedelina		Cristales blancos	260-261	IR, ¹ HRMN, ¹³ CRMN
ácido siquímico		Cristales cafés	185-186	IR, ¹ HRMN

6.2. Resultados de inhibición de la proliferación celular de líneas celulares tratadas con amentoflavona.

Una vez aislada e identificada la amentoflavona se evaluó su efecto en la viabilidad de las líneas celulares humanas HeLa, SW620, MCF-7 y K-562 por la técnica de reducción de sales de bromuro de tetrazolio en un periodo de exposición de 72 horas, se utilizó como control negativo un cultivo celular sin tratamiento, como control positivo taxol. 0.4 μm y células incubadas con DMSO a una concentración del 0.2% como control disolvente ó vehiculo. Las concentraciones de amentoflavona se muestran en la Tabla 2.

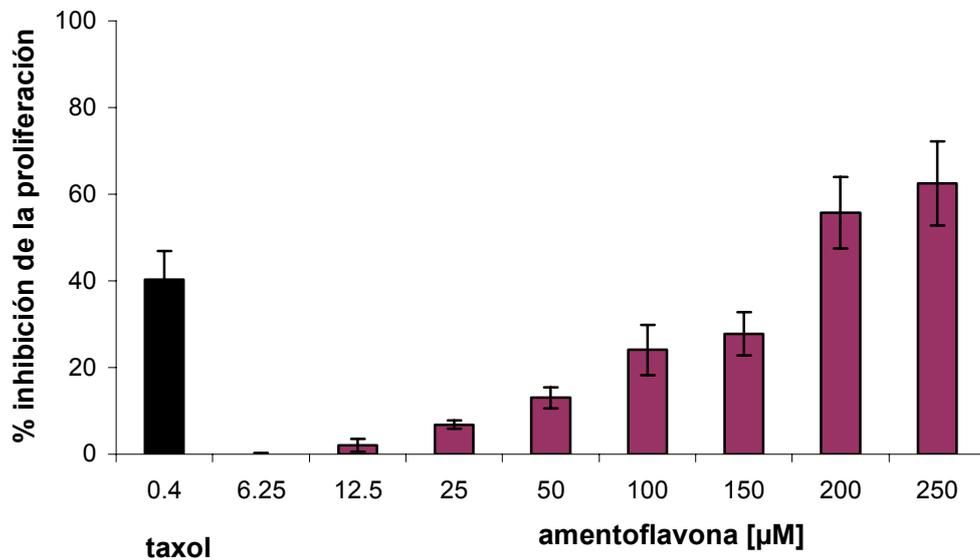
Tabla 2. Concentraciones amentoflavona

	Concentraciones (μM)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
amentoflavona	6.25	12.5	25	50	100	150	200	250

El efecto en la proliferación celular tanto en la línea celular MCF-7 como en K562 tratadas con amentoflavona mostró una inhibición de la proliferación en función de la concentración, donde se observa que dicho efecto se hace evidente a una concentración de 50 μM con una inhibición del 20% en ambas líneas celulares y un efecto máximo de inhibición del 60% para MCF7 y de 85% para K562 cuando ambas líneas se trataron con 250 μM de amentoflavona, este comportamiento se muestra en la Figura 16.

En el caso de las líneas SW620, la inhibición de la proliferación celular se notó a una concentración de 150 μM con una inhibición del 30%, y un máximo de 70% de inhibición a una concentración de 250 μM (Figura 17), mientras que contrario a las líneas celulares anteriores en células HeLa la amentoflavona prácticamente carece de actividad inhibitoria (Figura 17), a excepción de una ligera actividad inhibitoria del 15.2% a 100 μM , sin embargo a concentraciones mayores la actividad de la amentoflavona fue nula.

MCF-7



K-562

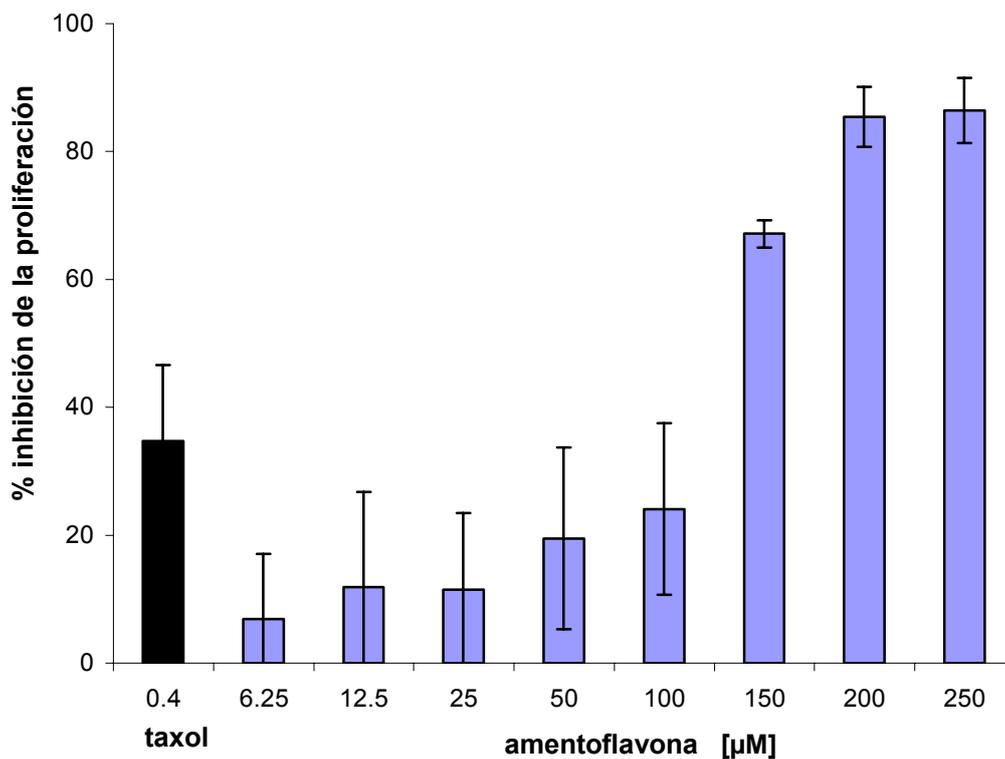
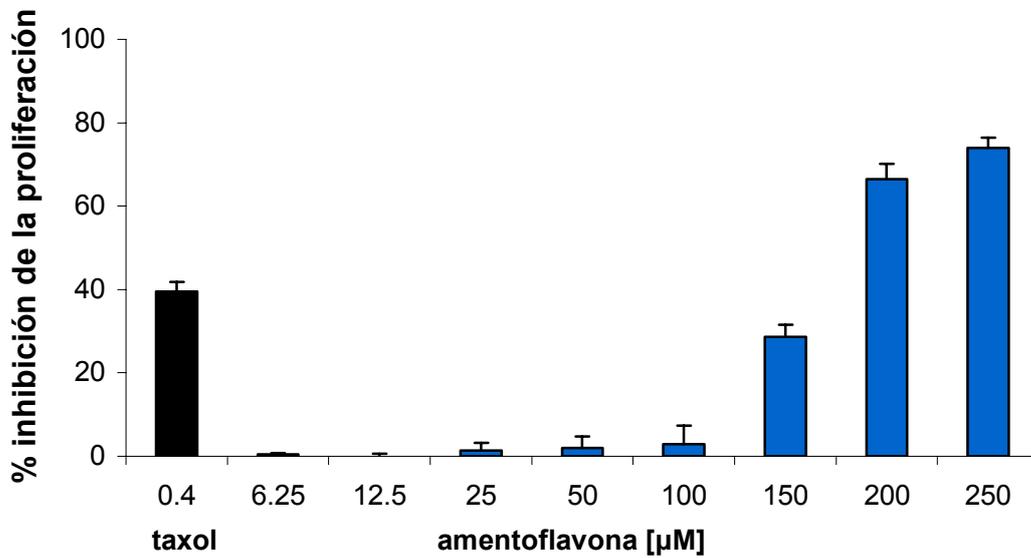


Figura 16. Efecto en la proliferación celular de las líneas celulares MCF-7 y K562 tratadas con amentoflavona a diferentes concentraciones durante 72 h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos realizados por octuplicado \pm desviación estándar, se utilizó taxol a 0.4 μ M como control positivo

SW-620



HeLa

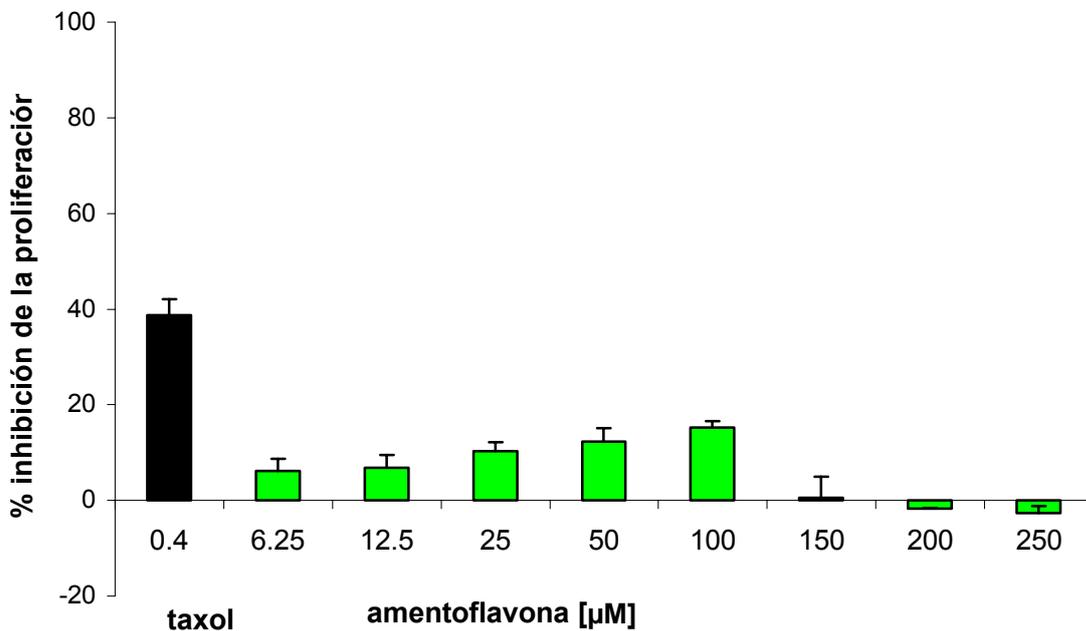


Figura 17. Efecto en la proliferación celular de las líneas celulares SW620 Y HeLa tratadas con amentoflavona a diferentes concentraciones durante 72 h. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes y cada uno de ellos realizados por octuplicado \pm desviación estándar, se utilizó taxol a 0.4 μ M como control positivo

La comparación de los comportamientos del efecto de inhibición de la proliferación en las diferentes líneas celulares tratadas con amentoflavona a diferentes concentraciones mostradas en la Figura 18 revela que la amentoflavona presentó actividad citotóxica dependiente de la concentración a 72 horas de exposición en tres de las cuatro líneas celulares. En donde la línea celular K-562 muestra el mayor efecto con un $86.4 \pm 5.10\%$ de inhibición, seguida de la línea SW620 con $74.0 \pm 2.5\%$ y MCF-7 con $62.5 \pm 9.6 \%$ cuando la concentración es de $250 \mu\text{M}$ en las tres líneas celulares, en tanto que la línea en donde la amentoflavona fue ligeramente activa fue en HeLa con un porcentaje de inhibición máximo del $15.2 \pm 2.5\%$ solo a una concentración de $100 \mu\text{M}$ a mayores concentraciones no mostró actividad.

**Inhibición de la proliferación celular en las líneas:
MCF-7, K562, HeLa y SW620**

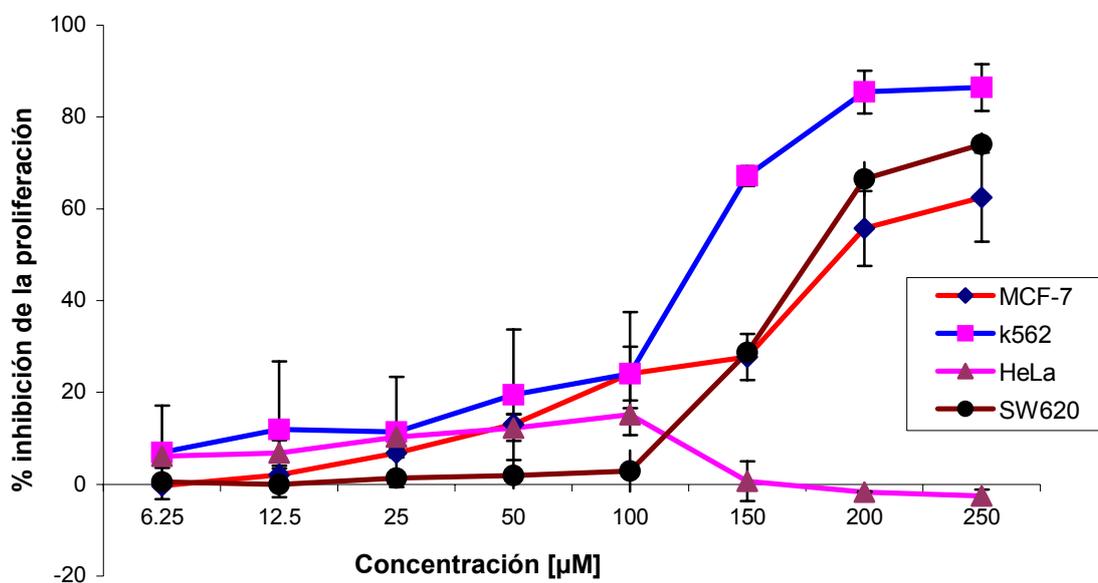


Figura 18. Efecto en la inhibición de la proliferación celular en las 4 diferentes líneas celulares, tratadas con amentoflavona a diferentes concentraciones, durante 72 horas, determinado por ensayos del MTT. Los resultados muestran el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Tomando los datos obtenidos del porcentaje de inhibición en las diferentes líneas celulares tratadas con amentoflavona, se procedió a determinar los valores de la concentración en la cual se obtiene un 50% de inhibición (IC_{50}) para cada línea. Los resultados muestran que la ametoflavona tiene mayor efecto en la línea celular K562, seguida de SW620 y por ultimo la línea celular MCF-7, mientras que para HeLa no se alcanzo el valor de IC_{50} a las concentraciones de amentoflavona utilizadas (Tabla 3). Los valores de las IC_{50} se obtuvieron mediante análisis de regresión no lineal empleando la ecuación de Boltzman en el programa OriginPro 7 (Origin Lab ®).

Tabla 3. Valores obtenidos de IC_{50} (μM) de la amentoflavona en las diferentes líneas celulares humanas. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

	Línea celular			
	MCF-7	K-562	SW-620	HeLa
amentoflavona	215.33 \pm 9.73	129.54 \pm 9.22	179.66 \pm 2.36	ND

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El uso de productos naturales en la terapia del cáncer es importante ya que cerca del 74% de compuestos anticancerígenos provienen de productos naturales o de derivados de ellos. Algunos fármacos convencionales en la terapia contra el cáncer han sido descubiertos gracias a la medicina tradicional por lo que es importante seguir con la búsqueda de nuevos agentes derivados de plantas usadas en la medicina tradicional en las diversas regiones del mundo, principalmente por dos razones de suma importancia en la quimioterapia del cáncer; primero para obtener alternativas de principios activos que puedan escapar a los mecanismos de resistencia por parte de células tumorales y segundo reducir los efectos secundarios que afectan al paciente debido al tratamiento quimioterapéutico.

El grupo de trabajo del Dr Reyes-Chilpa (2004A y 2004B) llevó a cabo el aislamiento de cumarinas y xantonas obtenidas de *Calophyllum brasiliense* las cuales resultaron ser citotóxicas *in vitro* en diferentes líneas celulares humanas, utilizando una estrategia similar logró también el aislamiento de los compuestos: ácido siquímico, canofilol, friedelina y amentoflavona de los cuales el efecto de la amentoflavona en la inhibición de la proliferación en líneas celulares no fue suficientemente evaluada.

En el presente trabajo utilizando el modelo de aislamiento del grupo de investigación del Dr Reyes-Chilpa de un extracto cetónico de hojas de *Calophyllum brasiliense* fue aislada la amentoflavona y adicionalmente el ácido siquímico, canofilol, friedelina, con la utilización de métodos cromatográficos y análisis espectrofotométrico. Estos últimos tres compuestos que aunque no fueron evaluados en su efecto citotóxico en este trabajo, contribuyeron a la obtención de la amentoflavona ya que el patrón de aislamiento en donde se obtuvo de un fraccionamiento cromatográfico inicial, en primer lugar al canofilol y posteriormente a la friedelina, y en un segundo fraccionamiento cromatográfico a la amentoflavona y al ácido siquímico. Así el orden de aislamiento nos ofreció el monitoreo y la certeza de que los compuestos obtenidos fueron los planteados en nuestros objetivos.

Una vez identificada plenamente la amentoflavona se determino mediante ensayos de citotoxicidad por MTT su efecto en la inhibición de la proliferación celular en las diferentes líneas celulares, las cuales se plantearon desde el inicio que fueran de diferente fuente es decir que provenían de diferentes tipos de cáncer, los cuales representan algunos de los mas frecuentes en incidencia en la población mexicana. Por lo que se seleccionó un panel de líneas que incluyo una línea de adenocarcinoma cérvico-uterino (HeLa), de adenocarcinoma de mama (MCF-7), de adenocarcinoma de colon (SW620) y una de leucemia (K-562).

En datos obtenidos de la literatura, la amentoflavona ha sido evaluada solo en algunas líneas celulares, Grynberg y colaboradores en el 2002, analizaron por ensayos de MTT el efecto de amentoflavona y algunos biflavonoides estructuralmente relacionados en células de carcinoma de Erlich donde se obtuvo una IC_{50} de 26 μ M para la amentoflavona, mientras que para la línea celular K562 solo se estima que es mayor a 200 μ M ya que no probaron en sus estudios de citotoxicidad mayores concentraciones, sin embargo a 200 μ M en ensayos de relajación de ADN súper-enrollado por parte de la enzima Topo I, la amentoflavona resultó ser un inhibidor de la actividad de esta enzima, por lo que este autor propone como posible mecanismo de acción la inhibición de esta enzima (Grynberg et al., 2002), la cual es importante para el cuidado de la topología del ADN que influye en procesos vitales como la replicación del material genético.

El trabajo anterior concuerda con nuestros resultados. Obtuvimos para la amentoflavona una IC_{50} de 129.54 μ M en la línea celular K562, el hecho de que Grynberg y su grupo no lograron obtener el valor de IC_{50} en esta línea celular, puede deberse a que sus ensayos de citotoxicidad fueron a 45 h de exposición a la amentoflavona, donde se observó un máximo de inhibición de la proliferación del 40%, mientras que en nuestro caso la exposición a la amentoflavona fue de 72 h, tiempo en el cual se tuvo mayor contacto con el compuesto y como el cálculo de inhibición se realiza con un cultivo de células sin compuesto, este sigue proliferando frente al cultivo con amentoflavona.

En el presente trabajo los valores obtenidos de IC_{50} para la amentoflavona están en un rango de entre 129 a 215 μM solo en tres de 4 líneas celulares utilizadas. La amentoflavona resultó ser mas activa en la línea celular K562 con una IC_{50} de 129.54 μM , para SW620 de 179.66 μM y de 215.33 μM en células MCF-7. De forma interesante en la línea celular HeLa la amentoflavona solo tuvo una ligera actividad a 100 μM con un máximo de inhibición de 15%, resultados parecidos también los muestran Grynberg y colaboradores (2002), ya que como se describió anteriormente en su trabajo demostraron que la amentoflavona fue muy activa con una IC_{50} de 26 μM en células de carcinoma de Erlich mientras que para K562 fue moderadamente activa. Sin embargo en estudios realizados por Lin LC y colaboradores (2000) la amentoflavona fue probada junto con otros biflavonoides estructuralmente relacionados en seis líneas celulares (Raji, Calu-1, K562, Vero, Wish y HeLa) y donde la amentoflavona no fue activa en todas las líneas celulares, solo dos de los nuevos biflavonoides (Robustoflavona 4'-metil eter y la 2'',3''-dihidrorobustoflavona) fueron activos, la diferencia de este trabajo con el nuestro radica en que este autor utilizó concentraciones de hasta 100 μM a 72 h y en este trabajo se probaron hasta 250 μM .

En nuestro trabajo los datos de inhibición de la proliferación celular mostrados en la Figura 18, así como los valores obtenidos de IC_{50} mostrados en la Tabla 3, sugieren que la amentoflavona tiene actividad en las líneas celulares evaluadas, pero para HeLa su IC_{50} no fue determinada.

El mecanismo o mecanismos de acción de la amentoflavona para inhibir la proliferación celular aun no ha sido completamente elucidado, en nuestro trabajo aunque no se evalúa los mecanismos por el cual la amentoflavona tiene un efecto inhibitorio en la proliferación, se sabe que inhibe la actividad de la Topo-I *in Vitro* (Grynberg et al., 2002), también se sabe que inhibe la actividad de factor de transcripción NF- κ B el cual esta implicado en la inducción de genes que promueven la proliferación celular así como procesos de inflamación entre otros (Peterson et al, 1996; Pannala 1998).

Otro posible mecanismo de inhibición celular podría ser su papel pro-oxidante y la habilidad que tienen para inducir disfunción mitocondrial que llevan a apoptosis. Al generarse especies reactivas de oxígeno, estas últimas median la fragmentación apoptótica del ADN, que en presencia de iones metálicos la fragmentación del ADN se

incrementa. El mecanismo del corte del ADN por amentoflavona y Cu^{2+} , se correlaciona con la formación de un complejo de amentoflavona con el Cu^{2+} , reduciéndolo a Cu^{+1} , lo cual forma una o más especies oxidadas que aumentan su papel pro-oxidante (Rahman et al, 1989).

8. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el aislamiento, obtención y caracterización de ácido siquímico, canofilol, friedelina y amentoflavona provenientes de un extracto cetónico de hojas de *Calophyllum brasiliense*.

La amentoflavona presentó una inhibición proliferativa en las líneas celulares humanas: SW620, K-562 y MCF-7 a 72 horas de exposición probadas, mostrando una relación dependiente de la concentración.

La amentoflavona tiene una mayor actividad citotóxica a concentraciones mayores de 100 μM en las líneas celulares SW620, K-562 y MCF-7.

BIBLIOGRAFÍA

- Alley MC, Scudeiro DA, Monks A, Hursey ML, Abbot BJ. *Feasibility of Drug Screening with panels of Human tumor cell lines using a Microculture Tetrazolium Assay*. Cancer Res.1988; 48 (3): 589-601
- *Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from Pourouma guianensis*. Phytomedicine.2004; 11 (2-3):114-20.
- Banerjee T, Valacchi G, Ziboh V, Van Der Vliet A. *Inhibition of TNF α -induced cyclooxygenase-2 expression by amentoflavone through suppression of NF- κ B activation in A549 cells*. Mol Cell Biochem. 2002;238(1-2):105-10
- Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G. *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity..* Clin Cancer Res. 1996; 2 (11):1843 –1849.
- Berenblum I, Armuth V. *Two independent aspects of tumor promotion*.Biochim Biophys Acta. 1981; 651 (1):51–63.
- Birt DF, Hendrich S, Wang W. *Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids*. Pharmacol Ther. 2001; 90:157– 177.
- Cabo Mercado Jonathan Rodríguez. *Evaluación de la citotoxicidad de Xantonas naturales y sus derivados acetilados y metilados en líneas celulares tumorales*. Tesis Profesional Facultad de Química UNAM México 2004. Asesor: Angelina Quintero Ruiz.
- Catz SD, Johnson JL. *Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer*. Oncogene. 2001; 20:7342–7351.
- Cipak L, Grausova L, Miadokava E, Novotny L, Rauko P. *Dual activity of triterpenoids: apoptotic versus antidifferentiation effects*. Arch Toxicol. 2006; 80(7):429-435.
- Cova D, De Angelis L, Giavarini F, Palladini G, Perego R. *Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers*. Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.1992; 30(1):29-33.
- Da Silva KL, dos Santos AR, Mattos PE, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V. *Chemical composition and analgesic activity of Calophyllum brasiliense leaves*. Therapie 2001; 56 (4): 431–434.
- Decaer EA. *Phenolics: prooxidants or antioxidants?* Nutr Rev. 1997; 55:396– 407.

- Denis JN, Greene AE, Guenard D, Gueritte-Voeguelein F, Mangatal L, Potier P. *A highly efficient, practical approach to natural taxol*. J Amer Chem Soc.1988; 110(3): 5917-5919.
- Dewick PM. *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons, Nueva York.1997.
- Dumontet E, Petit E, Tarrade T, Nouvelot A. *UV-C irradiation-induced peroxidative degradation of microsomal fatty acids and proteins: protection by an extract of Ginkgo biloba (EGb 761)*. Free. Rad. Biol. Med. 1992; 13 (3):197-203.
- Evans WC. *Farmacognosia*. Editorial Interamericana. pp: 692-714. 1991.
- Foye WO. *Principios de química farmacéutica*. Cap. 36 Naturaleza del cáncer.pp 881-908. Vol. II, 2ª ed. Reverté, España, 1988.
- Fucks J, Packan L. *Photooxidative stress in the skin*. In: Sies,H. (Ed.), *Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants*. Academic Press, London, pp. 559–583.1991.
- Galati G, O'Brien PJ. *Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties*. Free. Rad. Biol. Med. 2004; 37 (3):287-303.
- Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. *Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics*. Drug Metab Drug Interact. 2000; 17 (1-4):311 – 349.
- Gambhir SS, Goel RK, Das Gupta G. *Anti-inflammatory & anti-ulcerogenic activity of amentoflavone*. Ind J Med Res.1987; 85:689–93.
- Goodman y Gilman. *Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas*, Introducción Sección X en las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Vol 2, Ed. Mac. Graw Hill Interamericana, 9 ° edición. México pp 1301-1308. 1996.
- Grynberg NF, Carvalho MG, Velandia JR, Oliveira MC, Braz-Filho R, Echevarria A. *DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from Ouratea species*. Braz J Med Biol Res. 2002 ;35(7):819-22
- Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. *Involvement of nuclear factor-kappaB, Bax and Bcl-2 in induction of cell cycle arrest and apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma cells*. Oncogene. 2002; 21:3727–38.
- Harborne JB. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press, London (Ed).1967:130-145.

- Hayot C, Farinelle S, De Decker R. *In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton.* Int J Oncol. 2002; 21:417–425.
- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. *Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers.* Am J Clin Nutr. 1995;62(6):1276-82
- Holmquist GP, Gao SW. *Somatic mutation theory, DNA repair rates, and the molecular epidemiology of p53 mutations.* Mutat Res Rev. 1997; 386: 69–101.
- Huguet AI, Manez S, Alcaraz MJ. *Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system.* Z Naturforsch [C].1990; 45 (1-2):19–24.
- Ito C, Itoigawa I., Takakura T., Ruangrunsi N, Enjo F, Tokuda H, Nishino H, Furukawa H. *Chemical constituents of Garcinia fusca: structure elucidation of eight new xantonas and their chemopreventive activity.* J Nat Prod. 2003; 66: 200-205.
- Ito C, Itoigawa M, Mishina Y, Filho VC, Mukainaka T, Tokuda H., Nishino H, Furukawa H. *Chemical constituents of Calophyllum brasiliensis: structure elucidation of seven new xanthones and their cancer chemopreventive activity.* J Nat Prod. 2002; 65(3):267-272.
- Ji SL, Jinwoong K, Bo YK, Hyun SL, Jong SA, Yuan SC. *Inhibition of Phospholipase C1 and Cancer Cell Proliferation by Triterpene Esters from Uncaria rhynchophylla.* J Nat Prod. 2000; 63(6):753-756.
- Jordan MA, Wilson L. *Microtubules as a target for anticancer drugs.* Nat Rev Cancer.2004; 4: 253–65.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types.* Science. 1994; 264 (5157) : 436–440.
- Kerry N, Rice-Evans C. *Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships.* J. Neurochem. 1999; 73 (1):247 – 253.
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. *Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent.* Arch Pharm Res Journal. 1998; 21 (4): 406-410.

- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. *Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent*. Arch Pharm Res. 1998; 21(4):406–10.
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. *Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from Ginkgo biloba leaves*. Planta Med. 1999; 65(5):465–467.
- King RA, Bursill DB. *Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans*. Am J Clin Nutr. 1998; 67(5):867-72.
- Koda K, Yee YL., Kradjan WA., Guglielmo BJ. *Applied Therapeutics: The clinical use of drugs. Cap. 88 Neoplastic Disorders and Their Treatment: General Principles* pp 88.1-88.15 8^a ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2005
- Korolkovas A, Burckhalter JH. *Compendio Esencial de Química Farmacéutica. Cap. 34 Antineoplásicos*. pp. 679-691. Reverté, México, 1979. J.B. Lippincott Company. E. U A. 1992.
- Kuhnau J. *The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World Rev Nutr Diet. 1976; 24:117-191.
- Lawrence N, Rennison D, McGown A, Ducki S, Gul L, Hadfield J, Khan N. *Linked Parallel Synthesis and MTT Bioassay Screening of Substituted Chalcones*. J. Com. Chem. 2000; 3 (5):421-426
- Lee HS, Oh WK, Kim BY, Ahn SC, Kang DO, Shin DI, Kim J, Mheen TI, Ahn JS. *Inhibition of phospholipase C gamma 1 activity by amentoflavone isolated from Selaginella tamariscina*. Planta Med. 1996;62(4):293-6.
- Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. *Cytotoxic biflavonoids from Selaginella delicatula*. J Nat Prod. 2000 ;63(5):627-30
- Lin YM, Flavin MT, Schure R, Chen FC, Sidwell R, Barnard DL, Huffman JH, Kern ER. *Antiviral activities of biflavonoids*. Planta Med. 1999; 65(2):120-125.
- Longley DB, Johnston PG. *Molecular mechanisms of drug resistance* J Pathol. 2005; 205: 275–292.
- Mata R, Rivero JF. *Curso Teórico de Farmacognosia. Material didáctico 2º Versión*. UNAM, Facultad de Química. Departamento de Farmacognosia. pp.42-43 .2000.
- Maxwell CR, Kanen SJ, Abel T, Siegel SJ. *Phosphodiesterase inhibitors: a novel mechanism for receptor-independent antipsychotic medications*. Neuroscience 2004; 29 (1): 101-107.

- Mekhail TM, Markman M. *Paclitaxel in cancer therapy*. Expert Opin Pharmacother 2002; 3(6):755–766.
- Middleton JR, Kandaswami C. *The impact of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer*. Pharmacol Rev. 2000; 52: 673-751.
- Mitaine AC, Hornebeck W, Sauvain M, Hanrot MZ. *Triterpenes and phytosterols as human leucocyte elastase inhibitors*. Planta Med. 2002; 68(10):930-932.
- Muenchen HJ, Lin DL, Walsh MA, Keller ET, Pienta KJ. *Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor- κ B by an IkappaB α "super-repressor."*Clin Cancer Res. 2000; 6:1969–1977.
- Murray TJ, Yang X, Sherr DH. *Growth of a human mammary tumor cell line is blocked by galangin, a naturally occurring bioflavonoid, and is accompanied by down-regulation of cyclins D3, E, and A*. Breast Cancer Res. 2006;8(2):R17
- Myers, N. Securing the fabric of life. 1998. People & the Planet 7(4): 6-9.
- Nagao M, Morita N, Yahagi T, Sugimura T. *Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds*. Environ Mutagen. 1981; 3: 401-419.
- Nakagawa H, Takaishi Y, Fujimoto Y, Duque C. *Chemical Constituents from Colombian Medicinal Plant Maytenus lavéis*. J Nat Product. 2004; 67(11): 1919-1924.
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr. *Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. Mol Cell Biol. 1997;17: 3629–3639.
- Navarrete A, Trejo JL, Reyes L. *Principles of root bark of Hippocratea excelsa (Hippocrataceae) with gastroprotective activity*. J Ethnopharmacol. 2002; 79(3):383-388.
- Oren M. *Lonely no more: p53 finds its kin in a tumor suppressor haven*. Cell 1997; 90 (5) : 829–832.
- Pannala AS, Razaq R, Halliwell B, Singh S, Rice-Evans CA. *Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation?* Free. Rad. Biol. Med. 1998 ;24(4):594-606.

- Pennington TD, Sarukhán J. *Manual para la Identificación de Campo de los Principales árboles Tropicales de México*. UNAM/FCE, 2° edición. pp : 390–391. 1998.
- Pennington TD, Sarukhán, J. *Manual para la Identificación de Campo de los Principales árboles Tropicales de México*. UNAM/FCE, 2° edición. pp: 390–391. 1998.
- Peterson J, Dwyer J. *Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire*. J Am Diet Assoc. 1998; 98 (2): 667-682.
- Philip Rubin MD. *Oncología clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Cap. 1, pp: 1-12 Editorial Elsevier Science, 8° edición, México 2003.
- Piccolo E, Innominato PF, Mariggio MA, Maffucci T, Falasca M. *The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cg1 activity in cell migration*. Oncogene 2002; 21 (1): 6520 – 6529.
- Pietta PG, Simonetti P. *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press (Ed); San Diego.pp.283-308.1999.
- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. *Colon cancer a review of the epidemiology*. Epidemiol Rev. 1993; 15 (2):499–545.
- Potter JD. *Risk factors for colon neoplasia-epidemiology and biology* . Eur J Cancer. 1995 ; 31A(7-8):1033-8.
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. *Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu (II): role of Cu (I) and oxygen free radicals*. Carcinogenesis 1989; 10(10): 1833–1839.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang, L. *Flavonoids: promising anticancer agents*. Med Res Rev. 2003;23 : 519– 534.
- Reyes-Chilpa R, Estrada-Muniz E, Apan TR, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vazquez-Torres M. *Cytotoxic effects of mammea type coumarins from Calophyllum brasiliense*. Life Sci. 2004; 75(13):1635-47
- Reyes-Chilpa R, Jiménez-Estrada, M., Estrada-Muñiz, E. *Antifungal xanthenes from Calophyllum brasiliensis heartwood*. J Chem Ecol.1997; 23 (7):1901-1911.
- Rowinsky EK. *Paclitaxel pharmacology and other tumor types*. Semin Oncol. 1997; 24(6 Suppl 19):S19-1-S19-12.

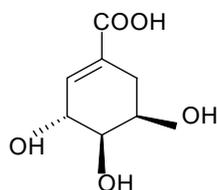
- Sahu SC, Flynn T, Bradlaw J, Roth W. *Pro-oxidant effects of the flavonoid myricetin on rat hepatocytes in culture*. Toxicology Methods. 2001; 11: 277-283.
- Sahu SC, Gray GC. *Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin*. Cancer Lett. 1993; 70 (1-2):73-9.
- Sahu SC, Gray GC. *Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation*. Cancer Lett.1994; 85(2):159-64
- Sahu SC, Gray GC. *Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nucle*. Food Chem Toxicol. 1997;35(5):443-7.
- Samuelsson G. *Drugs of Natural Origin: a textbook of Pharmacognosy, 4th edition*. San Diego. pp. 35-.38. 1999.
- Saponara R, Bosisio E. *Inhibition of cAMP-phosphodiesterase by biflavones of Ginkgo biloba in rat adipose tissue*. J Nat Prod. 1998; 61(11):1386-7.
- Sherr CJ. *Cancer cell cycles*. Science. 1996; 274(5293).
- Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD. *Eating patterns and risks of colon cancer*. Am J Epidemiol. 1998; 148 (1): 4-16.
- Spedding G, Ratty A, Middleton E. *Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids*. Antiviral Res. 1989; 12: 99-110.
- Stein CJ, Colditz GA. *Modifiable risk factors for cancer*. Br J Cancer. 2004 ; 90(2):299-303.
- Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. *Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women's Health Study*. Am J Epidemiol. 1994; 139 (1): 1–15.
- Stevens PF. *A revision of the old world species of Calophyllum (Guttiferae)*.J Arnold Arbor.1980; 61 (2):117–171.
- Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. World Health Report 2002: Reducing risks, promoting helthy life. Geneva. WHO 2002
- Surh YJ. *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic compounds*. Mutat Res. 1999; 428 (1):305–327.
- Tan G, Gyllenhaal C, Soejarto DD. *Biodiversity as a source of anticancer drugs*. 2006;7(3):265-77

- Tordera M, Ferrandiz ML, Alcaraz MJ. *Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils*. Z Naturforsch [C]. 1994; 49 (3-4):235–40.
- Torres EC, Lopes D, Oliveira RR, Carauta JP, Falcao CA, Kaplan MA, Rossi B.
- Tuxill, J. Nature's cornucopia: Our stake in plant diversity. 1999. Washington, D.C., Worldwatch Institute, Sep. (Worldwatch Paper No. 148) 85 p.
- Uddin Q, Malik A, Azam S, Hadi N, Azmi AS, Parveen N, Khan NU, Hadi SM. *The biflavonoid, amentoflavone degrades DNA in the presence of copper ions*. Toxicol In Vitro. 2004; 18(4):435-40.
- Vacca A, Ribatti D, Iurlaro M. *Docetaxel versus paclitaxel for antiangiogenesis* J Hematother Stem Cell Res. 2002; 11:103–118.
- Van P, Van C, Huong HT, Nam NH, Lee JJ, Kim YH. *Pentacyclic triterpenoids from Mallotus apelta*. Arch Pharm Res. 2004 ; 27(11):1109-1113
- Wall ME, Wani MC, Fullas F, Oswald JB. *Plants antitumor agents.31. The calycopterones, a new class of biflavonoids with novel cytotoxicity in a diverse panel of human tumor cell lines*. J Med Chem. 1994; 37 (10): 1465-1470.
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin, AS Jr. *TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB*. Science 1996; 274 :784–7.
- Wang FD, Ding L, Wang HQ. *Studies on triterpenoid constituents from Rabdosia japonica var. Galaucocalyx*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005; 30(24):1929-1932.
- Weinberg RA. *Oncogenes antioncogenes, and the bases of multistep carcinogenesis*. Cancer Res. 1989; 49(14): 3713-3721.
- Williams GM. *Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment*. Toxicology 2001 ;166(1-2):3-10.
- Woo ER, Lee JY, Cho IJ, Kim Sg, Kang KW. *Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kB activation in macrophages*. Pharmacol Res. 2005;51(6):539-46
- Woo ER, Lee JY, Cho IJ, Kim SG, Kang KW. *Amentoflavone inhibits the induction of nitric oxide synthase by inhibiting NF-kappaB activation in macrophages*. Pharmacol Res. 2005 ;51(6):539-46.
- www.inegi.org.mx/estadisticasvtales2005.html
- www.medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/bugs/

- Yamaguchi L, Vassao DG, Kato MJ, Di Mascio P. *Biflavonoids from Brazilian pine Araucaria angustifolia as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation*. *Phytochemistry* 2005; 66 (18):2238-2247.
- Zhang PC, Wu Y, Yu DQ. *Chemical constituents from the leaves of Dalbergia hainanensi*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2003; 28(6):527-530.

APÉNDICE

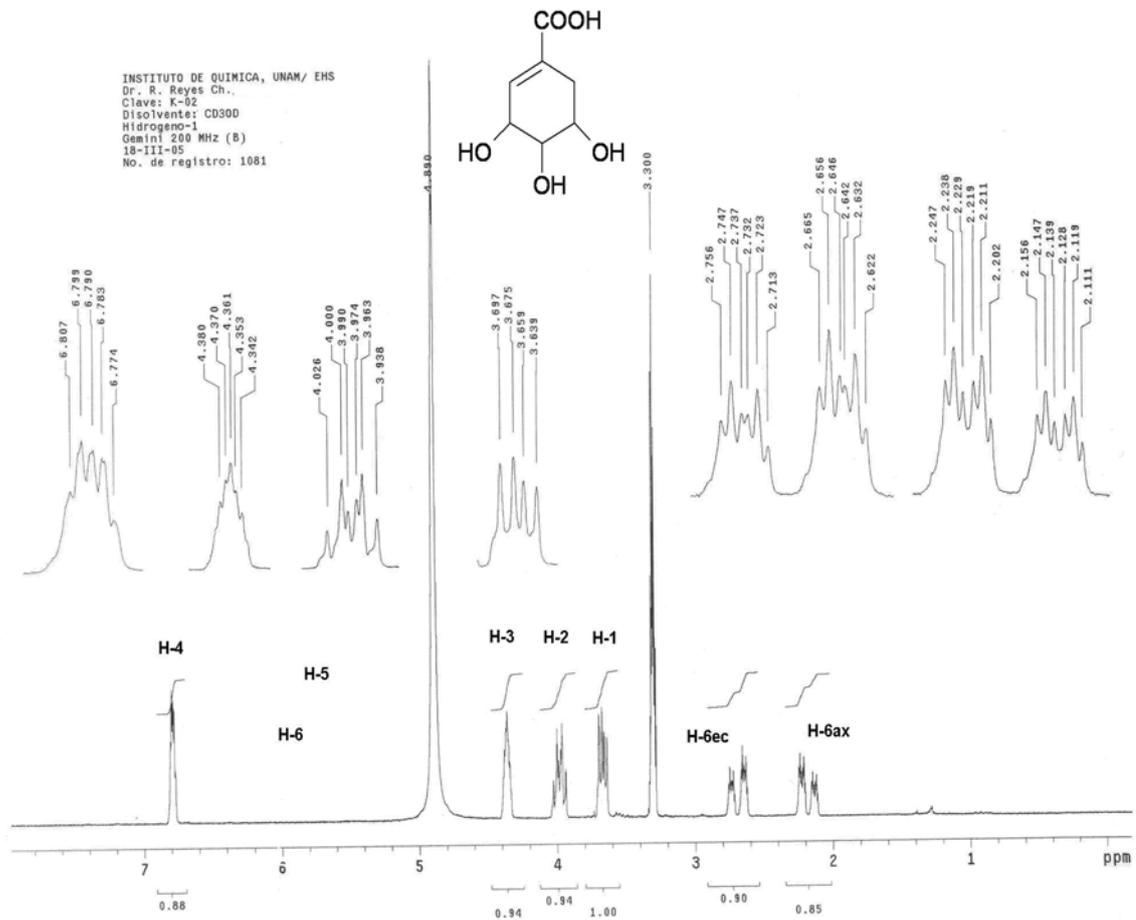
ácido siquímico



C₇H₁₀O₅ cristales cafés, p.f. (185-186 °C)

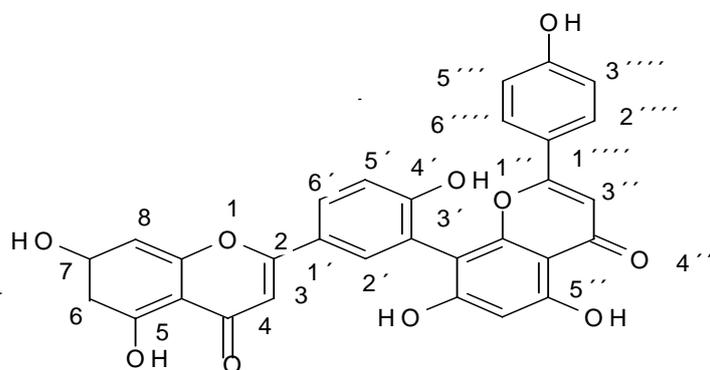
Tabla 1. Espectro de ¹HRMN (200 MHz) del compuesto; ácido siquímico

Protón	δ ¹ 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 ^a	2.16	<i>ddt</i>	16, 5.6 y 1.6	
CH-6 ec ^b	2.65	<i>ddt</i>	16, 5.6 y 1.6	1



Espectro No. 1 Espectro de ^1H RMN (200 MHz) del ácido siquímico

amentoflavona

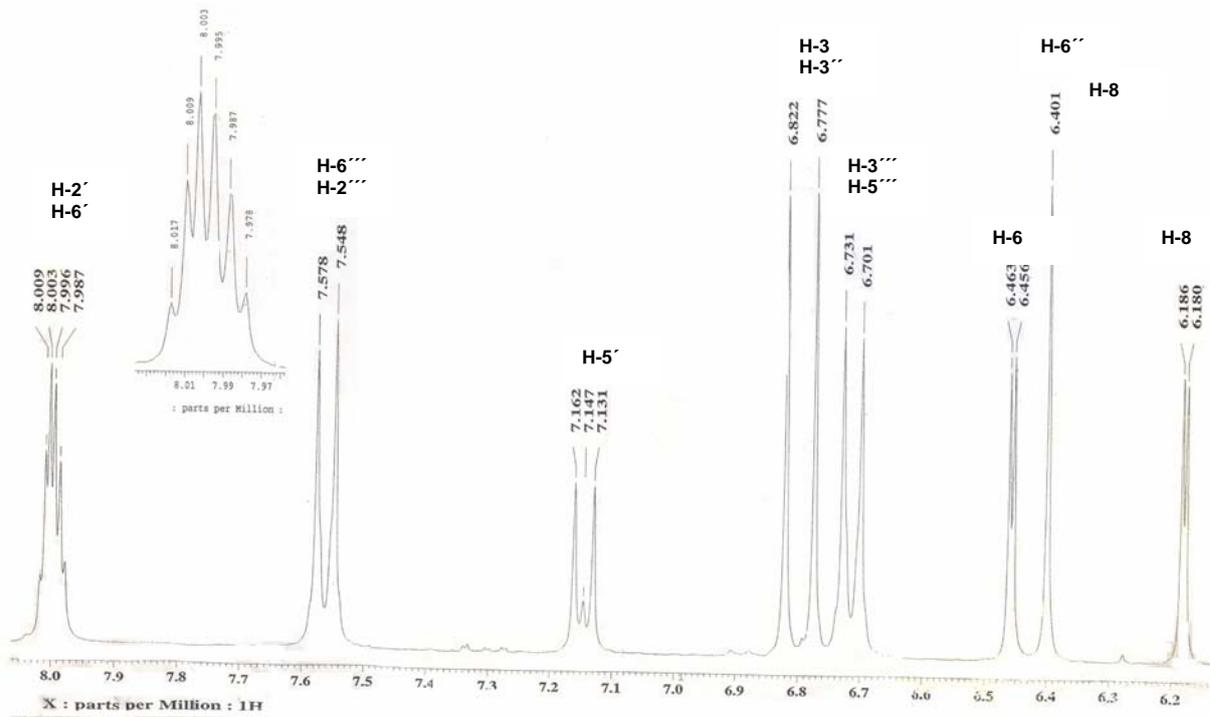
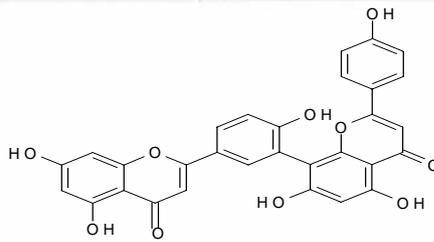


$C_{30}H_{18}O_{10}$ cristales amarillos, p.f. (299-300°C)

Tabla 2. Espectro de 1H RMN (300 MHz) del compuesto; amentoflavona.

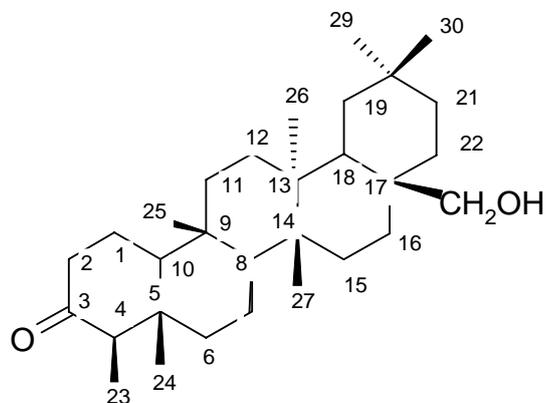
Protón	δ 1H ppm (300 MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
H-3	6.82	<i>s</i>	-	1
H-6	6.46	<i>d</i>	2.1	1
H-8	6.18	<i>d</i>	1.8	1
H-2'	7.99	<i>d</i>	2.4	1
H-5'	7.14	<i>d</i>	9.3	1
H-6'	7.99	<i>dd</i>	2.4 y 9	1
H-6''	6.41	<i>s</i>	-	1
H-3''	6.77	<i>s</i>	-	1
H-2''' y H-6'''	7.56	<i>d</i>	9	2
H-3''' y H-5'''	6.71	<i>d</i>	9	2

UNAM, INSTITUTO DE QUÍMICA, s.p.e.
 Dr. Ricardo Reyes / Adriana P. Jimenez;
 Clave: F 10
 Disolvente: DMSO-d6
 Hidrogeno-1
 Eclipse 300 MHz Jeol (E)
 8-IV-2005
 No. Reg. 989



Espectro No. 2 Espectro de ¹HRMN (300 MHz) de amentoflavona.

canofilol

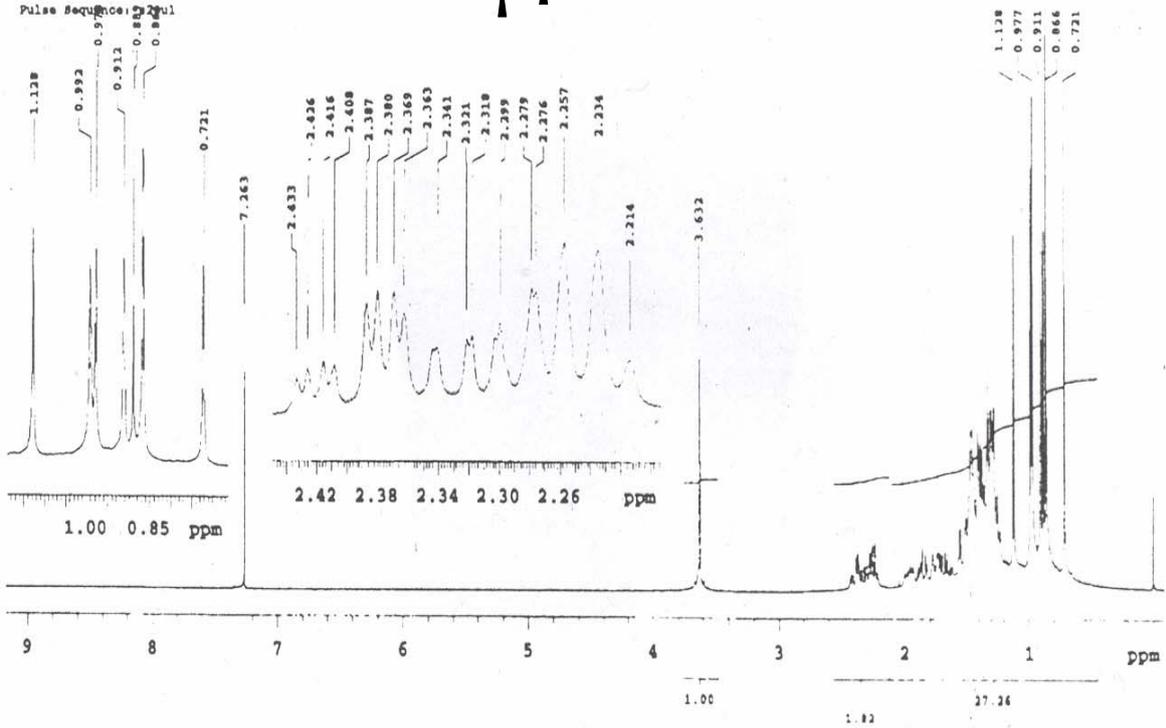
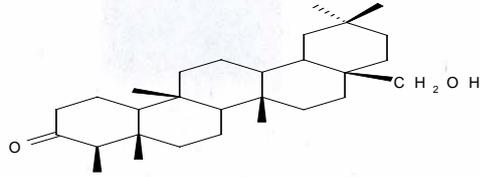


C₃₀H₅₀O₂ Cristales blancos, p.f. 281 – 282 °C

Tabla 3. Espectro de ¹HRMN (300 MHz) del compuesto; canofilol.

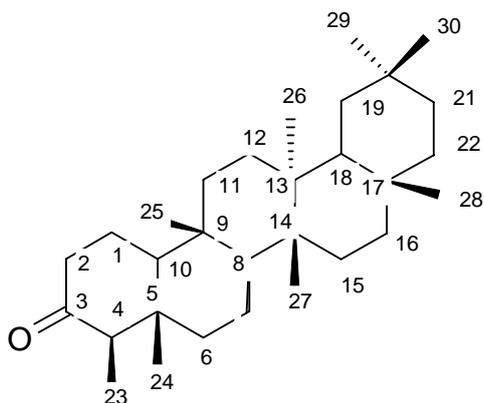
Protón	δ ¹ H ppm (300 MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
CH ₃ -24	0.72	s	-	3
CH ₃ -25	0.86	s	-	3
CH ₃ -23	0.88	s	-	3
CH ₃ -27	0.91	s	-	3
CH ₃ -26	0.97	s	-	3
CH ₃ -29	0.99	s	-	3
CH ₃ -30	1.12	s	-	3
CH ₃ -28	3.63	s	-	2

Instituto de Química UNAM MX
Dr. Ricardo Reyes
Clave:Ca
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. Orden:3540



Espectro No. 3 Espectro de ^1H RMN (300 MHz) del canofinol.

friedelina

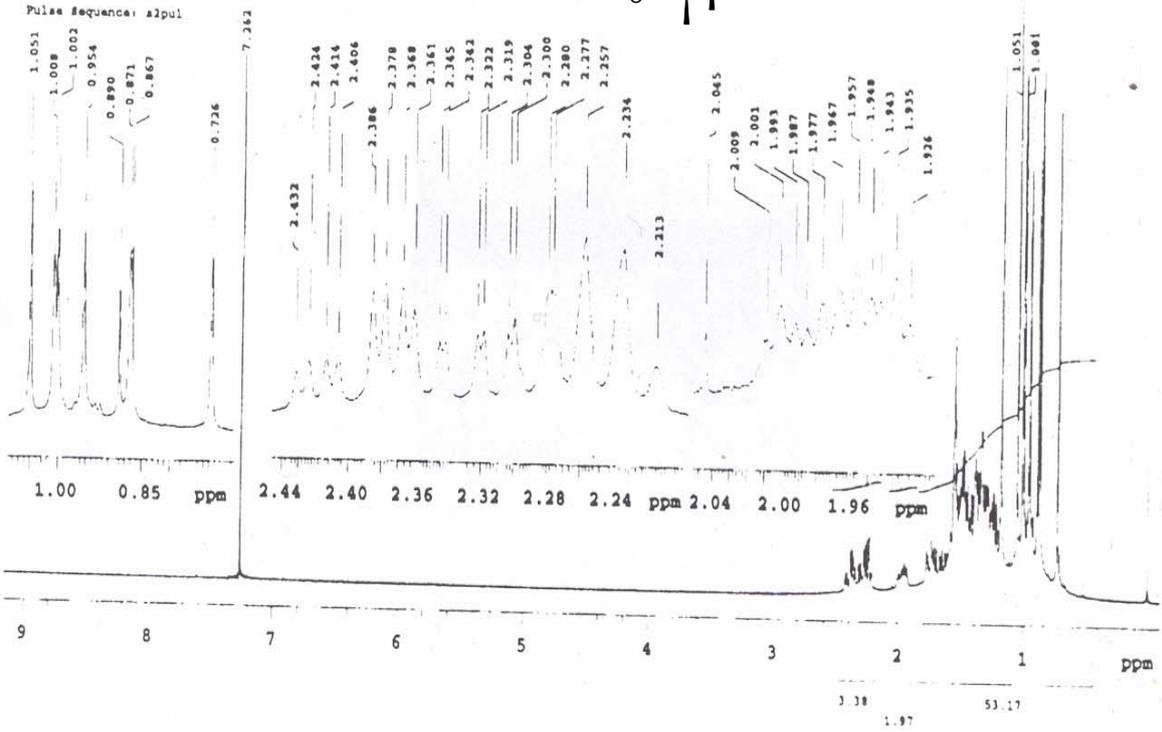
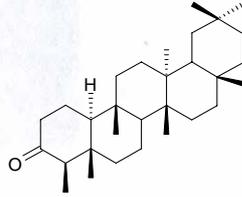


$C_{30}H_{50}O_2$ Cristales blancos, p.f. 260 – 261 °C.

Tabla 4. Espectro de 1H RMN (300 MHz) del compuesto; friedelina.

Protón	δ 1H ppm (300 MHz)	Multiplicidad	J(Hz)	No. protones
CH ₃ -24	0.72	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -25	0.86	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -23	0.87	<i>d</i>	6.6	3
CH ₃ -29	0.95	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -26	1.00	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -30	1.00	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -27	1.05	<i>s</i>	-	3
CH ₃ -28	1.18	<i>s</i>	-	3
H-8	1.34	<i>m</i>	-	1
H-10	1.48	<i>m</i>	-	1
H-18	1.55	<i>m</i>	-	1
H-1	1.67	<i>m</i>	-	1
H-1	1.95	<i>m</i>	-	1
H-4	2.24	<i>m</i>	-	1
2H-2	2.37	<i>m</i>	-	2

Instituto de Química UNAM MX
Dr. Ricardo Reyes
Clave: Pr
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1M
No. Orden: 3539



Espectro No. 4 Espectro de ^1H RMN (300 MHz) de la friedelina.