



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**El fruto de *Mammea americana*: análisis
proximal y evaluación farmacológica de
cumarinas presentes en la familia
Clusiaceae**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

BRENDA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora Perla Carolina Castañeda López

VOCAL: Profesora María Eva González Trujano

SECRETARIO: Profesor Ignacio González Sánchez

1er. SUPLENTE: Profesor Alejandro Alfaro Romero

2° SUPLENTE: Profesora Ariana Elizabeth Vargas Castillo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 2-6, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM. Laboratorio 206, Edificio F, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Ignacio González Sánchez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

SUSTENTANTE:

Brenda Hernández Rodríguez

Agradezco al proyecto DGAPA-PAPIIT IG 2005-13 "Compuestos antivirales (VIH-1) de Árboles Tropicales (Clusiaceae) de México: Estudio Químico y Toxicogenómico" por la financiación de la presente investigación.

Índice

Lista de abreviaturas.....	I
Lista de figuras.....	II
Lista de tablas.....	IV
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Antecedentes	4
3.1 Cáncer.....	4
3.1.1 Apoptosis	5
3.1.2 Métodos de detección de la muerte celular por apoptosis	6
3.1.3 El cáncer y los alimentos	9
3.1.4 Tratamiento contra el cáncer	10
3.1.5 Productos naturales contra el cáncer	11
3.2 VIH-SIDA.....	12
3.2.1 El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	12
3.2.3 Enzima Transcriptasa Reversa (TR)	12
3.2.4 Terapia contra el VIH/SIDA	13
3.2.5 Productos naturales con actividad contra el VIH	14
3.3 Análisis proximal	14
3.3.1 Agua (humedad).....	15
3.3.2 Proteínas	16
3.3.3 Grasas y lípidos	17
3.3.4 Carbohidratos	17
3.3.5 Fibra cruda y fibra dietética	19
3.3.6 Cenizas.....	20
3.4 Compuestos bioactivos presentes en los alimentos	20
3.5 Cumarinas.....	21
3.5.1 Actividad biológica de las cumarinas.....	22
3.6 Generalidades de la familia Clusiaceae	23
3.7 <i>Mammea americana</i> L.....	23
3.7.1 Descripción botánica, morfología y estructura.....	23

3.7.2	Importancia mundial	24
3.7.3	Usos culinarios y valor nutricional	25
3.7.4	Usos tradicionales y actividad biológica	26
3.7.5	Toxicidad	27
3.8	Género <i>Calophyllum</i> y <i>Calophyllum brasiliense</i>	27
3.8.1	<i>Calophyllum brasiliense</i>	28
4.0	Las cumarinas y el soulatrólido	29
4.	Justificación	29
5.	Hipótesis	30
6.	Objetivo General	30
6.1	Objetivos Particulares	30
7.	Procedimiento experimental (Materiales y métodos)	31
7.1	Colecta del material vegetal	31
7.2	Aislamiento de cumarinas tipo mammea	32
7.3	Identificación del compuesto aislado	35
7.4	Evaluación farmacológica	36
7.4.1	Ensayo de citotoxicidad (determinación de CI_{50} de la mameigina y soulatrólido sobre las líneas tumorales humanas)	36
7.4.2	Determinación de la fragmentación del ADN (Ensayo de TUNEL)	38
7.4.3	Evaluación de la actividad inhibitoria de la mameigina sobre la enzima transcriptasa reversa del virus de VIH-1	39
7.5	Análisis proximal de la pulpa del fruto de <i>Mammea americana</i>	40
7.5.1	Determinación del contenido de humedad por secado en estufa	40
7.5.2	Determinación del contenido de cenizas	41
7.5.3	Determinación del contenido de proteína	42
7.5.4	Determinación del contenido de lípidos	45
7.5.5	Determinación del contenido de fibra cruda	46
7.5.6	Determinación de carbohidratos totales	47
8.	Resultados	49
8.1	Aislamiento e identificación de cumarinas	49
8.1.1	Espectroscopia infrarroja	49
8.1.2	Resonancia magnética nuclear 1H (RMN 1H , 300 MHz)	51
8.1.3	Espectrometría de masas (HRMS)	53
8.1.4	Difracción de rayos X	55

8.2 Evaluación farmacológica	55
8.2.2 Ensayo de citotoxicidad	56
8.2.2.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) de la mameigina	56
8.2.2.2 Efecto de la mameigina sobre la línea celular HeLa	57
8.2.2.3 Determinación de la Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀) del soulatrólido.....	57
8.2.2.4 Efecto del soulatrólido sobre la línea celular HeLa.....	60
8.2.2.5 Ensayo de TUNEL	61
8.2.3 Actividad de la mameigina sobre la transcriptasa reversa del VIH-1	62
8.3 Análisis proximal del fruto de <i>Mammea americana</i>	62
9. Discusión.....	63
9.1 Identificación del compuesto aislado.....	63
9.2 Ensayo de citotoxicidad.....	64
9.3 Ensayo TUNEL.....	65
9.4 Actividad de la mameigina sobre la transcriptasa reversa del VIH-1	66
9.5 Análisis proximal	66
10. Conclusiones.....	68
11. Bibliografía	69

Lista de abreviaturas

AACC	The American Association of Cereal Chemist	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
AcOEt	acetato de etilo	INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
AOAC	Association of Official Analytical Chemist	IR	infrarrojo
BrdUTP	bromo-desoxiuridina trifosfato	Kcal	kilocaloría
DCM	Diclorometano	MeOH	metanol
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle's Medium	mg	miligramo
DMSO	Dimetilulfóxido	m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	NCCN	National Comprehensive Cancer Network
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	nm	Nanómetro
ELN	extracto libre de nitrógeno	PBS	tampón fosfato salino
EM	espectrometría de masas	pNPP	paranitrofenilfosfato
EtOH	Etanol	RMN ¹H	resonancia magnética nuclear ¹ H
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
FDA	Food and Drug Administration	SiO₃	silicato
g	gramo	TR	enzima transcriptasa reversa
h	Hora	TR VIH-1	enzima transcriptasa reversa del VIH-1
HCl	ácido clorhídrico	UMA	Unidad de masa atómica
Hex	hexano	°C	grado centígrado
H₂SO₄	ácido sulfúrico	µl	microlitro
CI₅₀	concentración inhibitoria media		

Lista de figuras

Figura 1.	Estructura del (+)-calanólido A	22
Figura 2.	Estructura básica de compuestos tipo cumarina	22
Figura 3.	Fotografía de <i>Mammea americana</i> : a) fruto, b) flor, c) árbol, d) fruto	24
Figura 4.	Esquema de la especie de <i>Mammea americana</i>	24
Figura 5.	Fotografía de <i>Calophyllum brasiliense</i> : a) hojas, b) flores, c) corteza, d) árbol	28
Figura 6.	Fotografía de sitio de recolección de <i>Mammea americana</i> . San Andrés Tuxtla, Veracruz	32
Figura 7.	Disolventes utilizados como fase móvil en el fraccionamiento de la columna cromatográfica	34
Figura 8.	Diagrama de reunión de fracciones en grupos que mostraron similitud cromatográfica	35
Figura 9.	Cumarinas evaluadas en el presente estudio: A) mameigina, aislada de <i>Mammea americana</i> , y B) soulatrólido, compuesto aislado previamente de <i>Calophyllum brasiliense</i>	37
Figura 10.	Representación esquemática de la determinación de la transcriptasa reversa del virus de VIH-1	40
Figura 11.	Espectro IR de la mameigina	50
Figura 12.	Espectro Resonancia magnética nuclear ¹ H del compuesto aislado	52
Figura 13.	Espectro de masas del compuesto aislado	54
Figura 14.	Estructura molecular de la mameigina obtenida por difracción de rayos X	55
Figura 15.	Viabilidad de células K-562 tratadas con mameigina	56
Figura 16.	Efecto de la mameigina sobre la línea celular SKLU-1	57

Figura 17.	Viabilidad de la línea celular SW-620 tratada con solumetrólido a diferentes concentraciones durante 48 h	58
Figura 18.	Viabilidad de la línea celular HeLa tratada con solumetrólido a diferentes concentraciones durante 48 h	59
Figura 19.	Efecto del solumetrólido sobre la morfología de la línea celular HeLa a diferentes tiempos de exposición	60
Figura 20.	Fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con solumetrólido, paclitaxel (control positivo de apoptosis) y el vehículo DMSO (control negativo), expuestas a distintos tiempos.	61
Figura 21.	Estructura de rayos X de la mammeigina	63

Lista de tablas

Tabla 1.	Compuestos bioactivos presentes en frutas, hortalizas y verduras	10
Tabla 2.	Contenido de agua en algunos alimentos	16
Tabla 3.	Contenido de carbohidratos en algunas frutas	18
Tabla 4.	Valor nutricional del fruto de <i>Mammea americana</i>	25
Tabla 5.	Ficha de colecta del fruto de <i>Mammea americana</i>	31
Tabla 6.	Espectroscopia infrarroja	49
Tabla 7.	Resonancia magnética nuclear ^1H (RMN ^1H , 300 MHz)	51
Tabla 8.	Valores de CI_{50} del soulatrólido al ser evaluado a 48 h	59
Tabla 9.	Análisis proximal de la pulpa del fruto de <i>Mammea americana</i>	62
Tabla 10.	Comparación del análisis proximal entre lo reportado previamente y lo obtenido	67

1. Resumen

El cáncer es considerado como una de las principales causas de mortalidad alrededor del mundo y se prevé que el número de nuevos casos aumente en un 70% en los próximos veinte años (OMS, 2017). Por otro lado, en el 2014 se reportaron alrededor de 37 millones de personas infectadas con el virus del VIH a nivel mundial, de las cuales sólo el 40% recibió terapia retroviral (OMS, 2016). Actualmente el cáncer y el VIH se han convertido en graves problemas de salud pública a nivel mundial debido al gran número de casos reportados además de la complejidad y costo elevado de su tratamiento.

Ya que se ha demostrado que en los alimentos que consume el hombre se encuentran presentes compuestos preventivos contra el cáncer y debido a que compuestos que presentan actividad contra el VIH se han aislado a partir de productos naturales, esta tesis se centra en averiguar si es que en el zapote Domingo (*Mammea americana*) se encuentran compuestos activos que puedan ayudar a la prevención y tratamiento de dichas afecciones. Para ello se aisló de la cáscara de este fruto la cumarina mameigina y posteriormente se evaluó su posible actividad anticancerígena y anti-VIH-1. De igual forma se evaluó la posible actividad anti-VIH-1 de la cumarina soulatrólido (aislada previamente del árbol de *Calophyllum brasiliense* y de modo complementario, se realizó el análisis proximal de la pulpa del zapote Domingo con objeto de conocer su composición aproximada y compararlo con lo reportado previamente. Los resultados obtenidos sugieren que la mameigina posee actividad inhibitoria moderada contra la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 (43%), mientras que no se pudo determinar su actividad citotóxica debido a que se presentaron problemas con su solubilidad. Al evaluar el efecto citotóxico del soulatrólido se encontró que esta cumarina disminuye la viabilidad celular por debajo del 50% en todas las líneas celulares en las que se probó. Con respecto al análisis proximal de la pulpa del zapote Domingo, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado anteriormente en la literatura y con lo reportado para este tipo de alimentos.

2. Introducción

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades crónico-degenerativas son la principal causa de mortalidad en el mundo al ocasionar el 63% de las muertes. En México, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 55.6% de los fallecimientos de adultos mayores son ocasionados por este grupo de enfermedades (INEGI, 2016). Las enfermedades crónicas son de larga duración y en general de progresión lenta. Son aquellas que degradan física y/o mentalmente, ya que provocan un desequilibrio en los mecanismos de regeneración celular. El cáncer se encuentra en este grupo de enfermedades.

No obstante, las enfermedades crónicas no transmisibles representan uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud debido al gran número de casos reportados, por su contribución a la mortalidad de la población, por ser la razón más frecuente de incapacidad prematura y por la complejidad y el costo elevado de su tratamiento (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008). La incidencia de estas enfermedades va en aumento debido al envejecimiento de la población y la práctica de estilos de vida no saludables, tales como el sedentarismo, dietas inadecuadas, estrés, tabaquismo, alcoholismo, entre otros. Las enfermedades crónicas son en gran medida prevenibles (OMS/FAO, 2003).

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, se reporta que en el 2012 hubo 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Se prevé que el número de casos nuevos aumente en un 70% en los próximos 20 años. Aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos, los cuales son poseer índice de masa corporal elevado, falta de actividad física, consumo de alcohol, consumo de tabaco y una ingesta reducida de frutas y verduras (OMS, 2017). La evidencia experimental de que los hábitos dietéticos pueden influir de manera significativa en el riesgo de padecer cáncer o en el comportamiento de los tumores cancerosos sigue en aumento, así mismo, se ha corroborado la importancia de múltiples componentes en la dieta que modifican uno o más procesos relacionados con el cáncer.

Existen más de 25 000 compuestos activos que están presentes en los alimentos y al menos 500 han sido identificados como posibles modificadores del riesgo de padecer cáncer (Milner, 2006). En los alimentos se encuentran tanto carcinógenos naturales como los pesticidas producidos por las plantas para protegerse de hongos, insectos o depredadores animales, o como las micotoxinas producidas como metabolitos secundarios de hongos filamentosos presentes en el ambiente y pueden contaminar los alimentos (por ejemplo las aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxina). En los componentes de la dieta también se encuentran inhibidores de carcinógenos, como los antioxidantes (por ejemplo la vitamina C, vitamina A, carotenoides, vitamina E y selenio), además de sustancias fitoquímicas (Mahan *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que especies de la familia Clusiaceae tales como *Vismia mexicana* y *Clusia massoniana* poseen compuestos activos por ejemplo cumarinas, xantonas y cromanonas con diferentes propiedades biológicas, dentro de las cuales se encuentran la actividad citotóxica y antiviral (Xiao-Hui *et al.*, 2008). Por su parte, *Mammea americana* L., también conocida comúnmente como zapote Domingo, es una especie perteneciente a esta familia de árboles tropicales y de consumo humano relativamente extendido. Se ha reportado con anterioridad su uso en la medicina tradicional mexicana y de igual forma se ha reportado que posee diversos compuestos bioactivos como carotenoides y compuestos fenólicos (Ordóñez-Santos *et al.*, 2014).

Por otra parte, se sabe que ciertos flavonoides, cumarinas, triterpenos y proteínas poseen actividad anti-VIH al actuar sobre distintas etapas del ciclo de replicación (Dharmaratne *et al.*, 2002). Cabe mencionar que al igual que el cáncer, el VIH/SIDA sigue siendo uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial, especialmente en los países de ingresos bajos o medios. Además se ha reportado que a finales del 2014 había 36,9 millones de personas infectadas por el VIH en todo el mundo, de los cuales 2 millones de personas contrajeron el VIH en 2014 (OMS, 2016). Es por esta razón que es necesario continuar con la búsqueda de posibles fuentes de compuestos activos para combatir estas afecciones.

3. Antecedentes

3.1 Cáncer

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, simplemente en el 2012 se reportaron 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. De igual forma se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente en un 70% en los próximos 20 años. En México el cáncer ocupa el tercer lugar en defunciones y tan solo en el 2015 se reportaron 79 514 defunciones (INEGI, 2016). Los principales tipos de cáncer que causan el mayor número de fallecimientos a nivel mundial son el pulmonar, el hepático, el colorrectal, el gástrico y, por último, el mamario (OMS, 2017).

El cáncer es el nombre que se le da a un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por el crecimiento celular anormal. En todos los tipos de cáncer, algunas células del organismo empiezan a dividirse sin detenerse y se pueden diseminar a los tejidos cercanos. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita y cuando las células normales envejecen o se dañan, éstas mueren y son reemplazadas. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola y las células dañadas o viejas sobreviven cuando deberían morir, mientras que células nuevas se forman cuando no son necesarias. A su vez, estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden llegar a formar masas (tumores). Las células cancerosas se distinguen de células sanas ya que presentan varias características fisiológicas que derivan de diversas alteraciones genéticas, como lo son la autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad en las señales inhibitorias del crecimiento, la evasión de la muerte celular programada, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011; NIH, 2015).

El cáncer es de etiología multifactorial y en ella juegan un papel importante la interacción entre factores genéticos del paciente y factores externos. Estos factores externos se dividen en tres categorías: carcinogénicos físicos como pueden ser radiaciones UV y ionizantes; carcinogénicos químicos como los asbestos, arsénico, aflatoxinas; y

carcinogénicos biológicos como pueden ser las infecciones causadas por determinados virus; bacterias o parásitos. El consumo de tabaco y alcohol, una dieta inadecuada y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo (OMS, 2017). Esto sugiere que la modificación de estos factores, como la dieta, puede reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Al ser el cáncer, como ya se mencionó previamente, una de las principales causas de muerte a escala mundial, es necesaria la búsqueda de nuevas formas de prevención y control de este conjunto de enfermedades.

3.1.1 Apoptosis

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la proliferación y muerte de las células que lo componen, con el fin de mantener un tamaño constante. Cuando este equilibrio es alterado ocurren situaciones patológicas como el cáncer, en el cuál hay un aumento de la proliferación celular o no hay muerte celular (Alfaro *et al.*, 2000).

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada ya que requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo. En ella, las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación, ni dejar cicatrices en los tejidos, como ocurre en la necrosis. Este tipo de muerte celular puede ser activado por diferentes estímulos, como lo son el daño al ADN, citocinas, pérdida de la matriz extracelular, etc (Alfaro *et al.*, 2000).

La apoptosis fue descrita por primera vez durante los años 70 y se basó en las características morfológicas que presentaban las células, tales como la organización de la membrana citoplasmática y la condensación de la cromatina, entre otras (Kerr *et al.*, 1972). Fue hasta los años 80 cuando se describe la participación de la apoptosis en procesos patológicos y fisiológicos. Durante los años 90 se vuelve uno de los temas principales de estudio dentro de la biología, y en la actualidad se ha demostrado que las alteraciones en el proceso de apoptosis son fundamentales para el

desarrollo del cáncer, estando presente desde los procesos iniciales de carcinogénesis hasta en la respuesta a la quimioterapia o radioterapia (Alfaro *et al.*, 2000).

Se utilizan distintos marcadores de apoptosis debido a que este tipo de muerte celular es un proceso dinámico y se presentan distintas características dependiendo del momento en el cual la célula se encuentre, por lo cual, no todos los marcadores están presente en todas las células ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso (Alfaro *et al.*, 2000).

Debido a que la definición de la apoptosis fue creada con base en parámetros morfológicos, es el primer parámetro a ser revisado en los métodos de detección de muerte celular (Alfaro *et al.*, 2000).

3.1.2 Métodos de detección de la muerte celular por apoptosis

Existen diversos métodos utilizados para llevar a cabo la detección de este tipo de muerte celular, los más utilizados se describen a continuación.

Observación de los cambios morfológicos celulares

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos como la alteración de la conformación del citoesqueleto, que como consecuencia aparece una deformación; condensación y fragmentación de la cromatina; cambios en el retículo endoplásmico, en donde se observan fusiones con la membrana citoplasmática; se puede observar la aparición de la fragmentación nuclear conforme el proceso avanza. Para determinar estos cambios morfológicos en la célula apoptótica se pueden utilizar tanto la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia), como la microscopía electrónica. Por medio de la microscopía de luz se pueden observar cambios en la organización celular tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante éste proceso de muerte. Para observar alteraciones celulares como cambios en la mitocondria o retículo endoplásmico es necesaria la microscopía electrónica (Schwartzman y Cidlowsky, 1993; Alfaro *et al.*, 2000).

Determinación de la fragmentación del ADN

Uno de los procesos que se asocian generalmente con la apoptosis es la fragmentación del ADN de forma específica entre nucleosomas. Durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la activación de endonucleasas que cortan el ADN a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas que contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de ADN de células apoptóticas se puede observar la aparición de un patrón característico de ADN conocido como escalera de ADN, el cual posee fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma, que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera (Evan y Littlewood, 1998). Existen diversos métodos para aislar el ADN y poder evaluar la fragmentación asociada a apoptosis, uno de los más comúnmente utilizados es la extracción de ADN con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol para después, realizar el análisis electroforético (Park y Patek, 1988). Otro método que se ha utilizado para estudiar la fragmentación internucleosomal es la detección de las proteínas presentes en los nucleosomas (histonas), en placas de 96 pozos a través de un anticuerpo acoplado con una enzima que genera una reacción colorida, conocida como ensayo ELISA (Holian *et al.*, 1998). En este método se cuantifica la presencia de nucleosomas en el sobrenadante de cultivos celulares, por lo tanto puede existir la incertidumbre del origen de dichos nucleosomas, ya que una célula necrótica puede también liberar ADN y nucleosomas al medio cuando ocurre la lisis celular (Alfaro *et al.*, 2000).

Detección de fragmentación de ADN en células individuales por medio del marcaje del ADN

Ya que la degradación del ADN es una de las características más importantes de la apoptosis, se han desarrollado distintos métodos que permiten analizar individualmente cada célula en busca de dicha fragmentación. Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de ADN de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal que adiciona nucleótidos marcados al ADN en el extremo 3'-OH libres (Gavrieli *et al.*, 1992). Estos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia, o se pueden detectar por medio de inmunohistoquímica. Este método se conoce como método de TUNEL (*transferase-*

mediated dUTP Nick end-labeling) y puede ser utilizado analizado tanto por citometría de flujo como por microscopía. Esta técnica permite determinar la presencia de fragmentación de ADN en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento. Sin embargo, durante la necrosis también se observa la fragmentación de ADN aunque ésta no exhibe el patrón de degradación internucleosomal presente en la apoptosis, pero esto no es posible de distinguir por el ensayo de TUNEL (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995), por lo que se sugiere que se complemente con otra técnica, como la evaluación morfológica (Alfaro *et al.*, 2000).

Evaluación de la activación de caspasas

En la detección de la muerte celular por apoptosis, la determinación de la activación de las moléculas que disparan este proceso ha adquirido gran importancia. Tal es el caso de las caspasas, que son cistein-proteasas que se encuentran en forma de un zimógeno en todas las células (Thornberry y Lazebnik, 1998). La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis. La determinación de la activación de la caspasa 3 tiene la gran ventaja de que es un evento que presenta una alta tasa de correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que es un marcador muy confiable de que la muerte ocurre por apoptosis (Alfaro *et al.*, 2000).

Externalización de fosfatidil serina

En este tipo de muerte celular, la integridad de la membrana se mantiene, sin embargo, se presentan cambios en ella. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidil serina (Van Engeland *et al.*, 1996). Esta es una molécula que se encuentra en la cara interna de la membrana celular y cuando el proceso de muerte celular por apoptosis se lleva a cabo, la fosfatidil serina se expone en la cara externa de la membrana celular. Debido a este cambio se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidil serina en el exterior de la membrana celular al agregar anexina V, la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana y que tiene gran afinidad por la fosfatidil serina, por lo que aquellas células que sean marcadas con anexina V, serán aquellas que se encuentran en apoptosis. La detección con anexina V se puede

acompañar de una tinción con yoduro de propidio, el cual es un agente intercalante que no atraviesa la membrana plasmática y por lo tanto permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido. Mediante esta técnica se puede saber si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular o si se encuentra en una etapa tardía donde se encuentra presente la necrosis secundaria (Alfaro *et al.*, 2000).

Como se puede observar, en la determinación de la apoptosis están relacionados diversos parámetros, y es necesario considerar distintos aspectos para elegir el o los métodos a utilizar. Sin embargo, los métodos que resultan más confiables son la determinación de alteraciones morfológicas, el ensayo de TUNEL, así como la detección de cambios en la simetría de la membrana celular y la activación de las caspasas (Alfaro *et al.*, 2000).

3.1.3 El cáncer y los alimentos

La evidencia de que los hábitos dietarios pueden influir de manera significativa en el riesgo de padecer cáncer y en el comportamiento de tumores cancerosos sigue en aumento. Los compuestos bioactivos pueden provenir de plantas, de fuentes animales, de hongos o del metabolismo de los componentes de los alimentos por las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal. Esta diversa gama de compuestos es la que puede modificar de manera positiva o negativa el riesgo de padecer la enfermedad y el comportamiento de los tumores. Definir cuál es el compuesto que modifica el proceso de la enfermedad es sumamente difícil debido a la complejidad en el contenido de moléculas presentes en los hongos, plantas y más aún, en los alimentos y a la alta diversidad de dianas celulares donde los compuestos activos presentes en los alimentos pueden actuar. Por ejemplo, algunos de los beneficios anticancerígenos del jitomate son atribuidos no sólo al licopeno, sino también a otros carotenoides, flavonoides, vitaminas y minerales (Erdman *et al.*, 2012).

A continuación se muestran algunos de los compuestos activos contra el cáncer, presentes en frutas, hortalizas y verduras que se pueden considerar como sustancias protectoras frente ésta enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos bioactivos presentes en frutas, hortalizas y verduras

Sustancia	Frutas, hortalizas y verduras
Lycopeno	Tomate y productos a base de tomate, toronja, sandía
Antocianinas, polifenoles	Bayas, uvas, vino tinto, ciruelas
α - y β - caroteno	Zanahoria, mango, calabaza
β -criptoxantina, flavonoides	Melón cantalupo, melocotón, naranja, papaya, nectarina
Luteína, ceaxantina	Espinacas, aguacate, melón de piel amarilla, hojas de col y grelos
Sulforafano, índoles	Repollo, brócoli, col de Bruselas, coliflor
Sulfuro de alilo	Puerros, cebolla, ajo, cebollinos

(Mahan *et al.*, 2013)

Otros productos naturales que se están investigando actualmente son los polifenoles (Santos-Buelga y San Feliciano, 2017) presentes en frutas, verduras y hortalizas, el té verde y el resveratrol de uvas y bayas. Los polifenoles más abundantes son el ácido fenólico, flavonoides, estilbenos y lignanos. Estas son algunas de las razones por la cual los hábitos alimenticios son importantes en la prevención de este tipo de enfermedad. Para reducir el riesgo de padecer cáncer se recomienda llevar una dieta rica en frutas, hortalizas, verduras y hierbas culinarias (Mahan *et al.*, 2013).

3.1.4 Tratamiento contra el cáncer

El tratamiento contra el cáncer en EE.UU., y en más de 115 países está dirigido por los estándares terapéuticos basados en el *National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology (2010)*. Las modalidades terapéuticas convencionales incluyen tratamientos antineoplásicos (quimioterapia), la radioterapia y la cirugía, o la combinación de los mismos (Mahan *et al.*, 2013).

El tratamiento que recibe el paciente depende del tipo de cáncer que padezca y lo avanzado que esté. Dentro de los tratamientos convencionales ampliamente utilizados

se encuentra la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En esta última modalidad de tratamiento se emplean fármacos citotóxicos, mismos que se pueden clasificar en agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, antracíclicos, epipodofilotoxinas, alcaloides de la vinca, taxanos y análogos de camptotecinas (Granados *et al.*, 2013).

3.1.5 Productos naturales contra el cáncer

El descubrimiento de varias moléculas pequeñas (algunas de ellas sintetizadas por organismos vivos como la penicilina y la estreptomina) y de vacunas en la primera parte del siglo XX empezó con una cadena de eventos que culminaron en el control de distintas enfermedades; sin embargo, hoy en día la humanidad se enfrenta a una nueva epidemia de enfermedades provocadas en parte por el estilo de vida, de las cuales, el cáncer es una de las principales, en donde los productos naturales forman parte de los recursos para tratar esta enfermedad. Aproximadamente el 60% de los fármacos usados comúnmente para tratar el cáncer han sido aisladas a partir de fuentes naturales (Gordaliza, 2007). Los ejemplos incluyen a los taxanos, los alcaloides de la vinca, podofilotoxinas y la camptotecina (Mondal *et al.*, 2012).

Durante la búsqueda de nuevos compuestos derivados de plantas contra el cáncer, se descubrió el GUT-70. Este compuesto es una cumarina tetracíclica que fue aislada del tallo de *Calophyllum brasiliense* colectado en Brasil y se observó que inhibe significativamente el crecimiento de células de leucemia, por lo tanto, se cree que este compuesto puede ser un potente agente para tratar dicha enfermedad (Kimura *et al.*, 2004).

México posee una gran diversidad botánica y un amplio uso de la medicina tradicional basada en la herbolaria, sin embargo; sólo una pequeña parte de estas plantas han sido sometidas a estudios científicos para evaluar sus potenciales efectos anticancerígenos, es por ello que se requiere incrementar el número de estudios científicos con plantas mexicanas (Alonso-Castro *et al.*, 2011).

3.2 VIH-SIDA

La incidencia de infecciones asociadas al Virus de Inmunodeficiencia Humana /Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH/SIDA), sigue siendo uno de los más graves problemas de salud pública del mundo, especialmente en los países de ingresos bajos o medios. A finales de 2015 había 36.7 millones de personas infectadas por el VIH en todo el mundo, de los cuales 2.1 millones de personas contrajeron el VIH en 2015 (OMS, 2016).

Se estima que en el 2014 en América Latina, 1.7 millones de personas vivían con el VIH y se reportaron en ese año 87 000 nuevas infecciones. Se calcula que en México 190 000 personas vivían con el VIH en el 2014 (ONU/SIDA, 2016).

3.2.1 El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

En 1983 el virus del VIH fue identificado como el agente causal del SIDA, que se caracteriza por provocar un severo daño del sistema inmunológico, de igual modo se identificó que el principal blanco del virus son los linfocitos CD4⁺, que en personas infectadas presentan una disminución progresiva (Dagleish *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1985). Se conocen dos tipos de VIH: el VIH-1, siendo el más predominante en el mundo y el VIH-2, que se presenta principalmente en África occidental (Coffin, 1986).

El VIH es un retrovirus (familia *Retroviridae*) del género *Lentivirus*, los cuales poseen largos periodos de incubación y tienen como blancos diversos linajes de células hematopoyéticas, en especial los linfocitos (Freed y Martin, 2001). Las partículas maduras del VIH poseen un diámetro de 100-120 nm y dos copias de ARN, así como las enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa (Freed y Martin, 2001).

3.2.3 Enzima Transcriptasa Reversa (TR)

La TR ha sido uno de los blancos importantes en la terapia contra el VIH. Esta enzima cataliza la retrotranscripción de una cadena sencilla de ARN en una doble cadena de ADN durante la fase temprana del proceso infeccioso junto con la RNasa H. La TR de

VIH realiza tres funciones enzimáticas: dirige la síntesis de ADN a partir de ARN para la formación de ADN de polaridad negativa cuando actúa como polimerasa; degrada el iniciador de ARNt y el ARN molde presente en el híbrido intermedio de ADN-ARN cuando actúa como RNasaH; y por último actúa polimeriza la cadena positiva de ADN (Flint *et al.*, 2000; Goff, 2001) . Debido a que la RT carece de un dominio de exonucleasa para la reparación, presenta una alta tasa de mutación durante la replicación (Evans y Levi, 1993; Coffin, 1995).

3.2.4 Terapia contra el VIH/SIDA

Los fármacos antiretrovirales se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a su mecanismo de acción: 1) inhibidores de la transcriptasa reversa que a su vez se subdividen en dos grupos: análogos a nucleósidos, que actúan sobre el sitio activo de la enzima y en no nucleósidos, que inhiben por interacción con un sitio de unión alostérico (De Clercq, 1993); 2) inhibidores de la proteasa, que se unen al sitio activo de la proteasa viral y evitan el procesamiento de las proteínas virales a enzimas funcionales; 3) inhibidores de la integrasa, que inhiben la acción de esta enzima y evitan la inserción del material genético del virus en el material genético del hospedero (Markowitz *et al.*, 2006); y por último 4) inhibidores de la fusión, que evitan la fusión del virus con la célula (Kilby *et al.*, 1998) (Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009).

Existen 24 fármacos aprobados por la FDA de los cuales, 11 son inhibidores de la transcriptasa reversa (7 son análogos a nucleósidos y 4 son no nucleósidos), 10 son inhibidores de la proteasa, 2 son inhibidores de la fusión y 1 es inhibidor de la integrasa. Actualmente se administra la “terapia antiretroviral altamente activa” que consiste en la combinación de inhibidores de las enzimas transcriptasa reversa y proteasa, que produce la reducción sostenida de la carga viral plasmática, aumenta el número de linfocitos CD4⁺ y atrasa la progresión del SIDA en los pacientes con VIH; sin embargo a esta terapia se le atribuyen riesgos asociados con el uso prolongado del tratamiento como trastornos metabólicos y reacciones farmacológicas cruzadas y toxicidad en el sistema cardiovascular, hígado, riñón, cerebro, páncreas y piel. Igualmente este tipo de medicamentos pueden provocar efectos adversos como diarreas, dolores de cabeza,

anemia, anorexia, dolor abdominal entre otros. Al tomar en cuenta estos antecedentes es necesario realizar la búsqueda de nuevas fuentes de fármacos para el tratamiento de este padecimiento (De Clercq, 1999; Hupfeld y Efferth, 2009).

3.2.5 Productos naturales con actividad contra el VIH

Los productos naturales han sido fuente de compuestos potencialmente útiles en el tratamiento de distintas enfermedades. Hasta el 2011 han sido descritos alrededor de 160 compuestos naturales que presentan actividad contra el VIH provenientes principalmente de plantas aunque también han sido extraídos de bacterias, hongos, invertebrados marinos y mamíferos (Sing y Bodiwala., 2010). Estos compuestos poseen gran diversidad en cuanto su estructura, dentro de los cuales se encuentran alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanos, fenoles, quinonas, saponinas, diterpenos, triterpenos, xantonas y polisacáridos sulfatados (Yang *et al.*, 2001). De acuerdo a algunos autores el (+)-calanólido A, dos derivados semisintéticos de la suksdorfina, una cumarina aislada de *Lomatium suksdorfii* y un derivado semisintético del ácido betulínico (triterpeno común en varias plantas son los compuestos que poseen mayor potencial para convertirse en fármacos contra el VIH al encontrarse en su etapa de estudio clínicos (Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009).

3.3 Análisis proximal

El análisis proximal se diseñó a mediados del siglo XIX en la estación experimental de Weende en Alemania (Henneberg y Stohmann, 1860-1864), por lo que este análisis se conoce también como análisis proximales Weende. Este sistema fue creado en un principio para obtener una clasificación muy amplia y con un nivel máximo de los componentes de los alimentos. Estos análisis se elaboraron en un momento en el que sólo se conocía en parte la química de la mayoría de los componentes de los alimentos y a pesar de que para los estudios nutricionales se necesita un enfoque más detallado y con una orientación más bioquímica, el análisis proximal, incluyendo a los métodos originales, sigue siendo la base del análisis de los alimentos con fines legislativos en muchos países (Greenfield y Southgate, 2006).

El análisis consiste en la determinación analítica del agua (humedad), las cenizas, grasas brutas, proteínas brutas y la fibra bruta. El extracto libre de nitrógeno, que está constituido principalmente por carbohidratos digeribles, se calcula por diferencia en lugar de medirlo por este análisis (Greenfield y Southgate, 2006).

3.3.1 Agua (humedad)

Los valores del agua siguen siendo un componente esencial de las bases de datos de composición de alimentos, porque el contenido del agua es uno de los elementos más variables, especialmente en los alimentos vegetales. Esta variabilidad afecta la composición del alimento considerando en conjunto, y a su vez, influye en las propiedades de éstos. El agua se encuentra en los alimentos hasta en un 96-97% como es el caso de algunas frutas donde la frescura es un factor fundamental. En varios deshidratados que en apariencia son totalmente secos, contienen un 10-12% de agua (Badui, 2006). En la Tabla 2 se muestra el contenido de agua de algunos alimentos.

Tanto en los tejidos animales como vegetales, se puede decir que el agua se encuentra en dos formas generales: agua libre y agua ligada. El agua libre o absorbida es la forma predominante, se libera con gran facilidad y es la que se determina a través de los distintos métodos para el cálculo del agua, se encuentra también disponible para el crecimiento de los microorganismos. Por otro lado, el agua ligada se halla en los alimentos como agua de cristalización o ligada a proteínas y a moléculas de sacáridos (Badui, 2006).

Las características específicas de un producto alimenticio como la textura, apariencia y el color, se ven afectadas por la cantidad, forma molecular y localización del agua dentro de éste. En las frutas y vegetales, la textura está en gran medida relacionada con la turgencia, que es función de la presión osmótica dentro de la célula vegetal. De igual forma, en los productos vegetales, el contenido acuoso puede ser un índice de su grado de maduración y un criterio de calidad para valorar su textura (Bello, 2000).

Algunas de las distintas razones por las cuales la industria de los alimentos determina el contenido de humedad son: a) el comprador de materias primas no desea adquirir agua en exceso; b) puede facilitar el desarrollo de microorganismos si el agua está presente por encima de ciertos niveles; c) los materiales pulverulentos se aglomeran en presencia de agua como el azúcar y la sal; f) la cantidad de agua presente puede afectar la textura del alimento (Iturbe y Sandoval, 2007).

Tabla 2. Contenido de agua de algunos alimentos

<i>Frutas, verduras y hortalizas</i>	g*
Lechugas, escarolas	95.3
Pimientos	94
Fresa, frambuesa, espinacas	98.6
Naranja	88.6
Alcachofas	88.1
Manzana	85.7
Papa	77.3
Plátano	75.1
Kiwi	72.2

*g por 100 g de porción comestible

(Rodríguez-Rivera y Simón-Magro,2008)

3.3.2 Proteínas

Las proteínas juegan un papel importante en los alimentos, ya que poseen propiedades nutricionales, pueden ser ingredientes de productos alimenticios y ayudan a establecer la estructura y las propiedades de un alimento debido a las propiedades funcionales que poseen. Las proteínas son macromoléculas formadas por 20 aminoácidos distintos unidos mediante enlaces peptídicos y en la dieta humana proceden de fuentes animales y vegetales. Se puede definir también a las proteínas alimentarias como aquellas que se digieren fácilmente, nutricionalmente adecuadas, no tóxicas, útiles en los alimentos y disponibles en abundancia. Las proteínas vegetales conforman una fuente de nutrimentos de interés por su disponibilidad y costo. Este tipo de proteínas se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y en baja proporción de hojas verdes. Los ingredientes vegetales poseen un lugar importante en la dieta de la

población menos favorecida económicamente y de quienes por distintas razones (filosóficas, religiosas, etc.) optan por regímenes alimentarios libres de productos animales. A pesar de la gran cantidad de plantas utilizables para su alimentación, en el mercado hay pocas variedades que se explotan ampliamente. Por otro lado, con lo que respecta a las frutas, éstas no se caracterizan por ser una fuente de proteínas vegetales, los compuestos nitrogenados se encuentran en un rango de entre el 0.1 y 1.5% de su composición y las pocas proteínas presentes están asociadas a las enzimas que participa en los procesos de maduración (Badui, 2006).

3.3.3 Grasas y lípidos

Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de compuestos insolubles en agua pero solubles en disolventes orgánicos, tales como el éter, cloroformo, benceno o acetona. Están constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno, formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas, que pueden contener fósforo y nitrógeno. Son la fuente energética más importante ya que cada gramo genera 9 Kcal, debido a que en su estructura poseen más átomos de carbonos que las proteínas y los hidratos de carbono. Las grasas y los aceites son los principales lípidos que se encuentran en los alimentos, contribuyen a la textura y a las propiedades sensoriales y de nutrición. Las semillas oleaginosas y los tejidos animales terrestres y marinos son sus fuentes principales. Las frutas y hortalizas presentan normalmente muy bajas concentraciones de grasas y aceites, a excepciones como el aguacate y algunos tipos de nueces (Badui, 2006).

3.3.4 Carbohidratos

Sin considerar el agua, los carbohidratos constituyen el principal componente de los productos alimenticios de origen vegetal y también los más consumidos por los seres humanos, en algunos países constituyen entre el 50 y el 80% de la dieta poblacional. Los carbohidratos o hidratos de carbono, son compuestos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, que presentan la fórmula general $C_n(H_2O)_n$ y con grupos funcionales $-C=O$ y $-OH$. Su papel fundamental en los alimentos es energético, aportan 4 Kcal/g y aunque

las grasas poseen mayor potencia energética (9 Kcal/g), los carbohidratos interaccionan con el agua y se utilizan como combustible de uso inmediato. La estructura química de los carbohidratos determina su funcionalidad y características, las cuales se manifiestan de distintas formas en los alimentos, principalmente en el sabor, la viscosidad, la estructura y el color. El almidón de los vegetales y el glucógeno de los animales son carbohidratos de almacenamiento que pueden ser utilizados para formar glucosa (Badui, 2006).

Conocer el contenido y tipo de azúcares presentes en las frutas, vegetales, mieles y productos derivados de éstos (en donde los azúcares son los componentes predominantes) permite saber, junto con el resultado de otros análisis (pigmentos, ácidos orgánicos, etc.) si un producto derivado de los mismos ha sido adulterado mediante la adición de azúcares de un origen distinto. El contenido de carbohidratos de los alimentos es muy variable cuantitativa y cualitativamente y en las en las frutas, el contenido de azúcares es utilizado como indicio de su calidad y madurez. En la Tabla 3 se muestra el contenido de carbohidratos de algunas frutas (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008).

El contenido de carbohidratos totales puede ser calculados por diferencia con el resto de los componentes (grasas, proteína, agua y cenizas), es decir, que no se cuantifican el laboratorio; sin embargo, errores por exceso o defecto en las determinaciones del resto se suman como error en el cálculo de los carbohidratos cuando se determinan por este método (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008).

Tabla 3. Contenido de carbohidratos de algunas frutas

<i>Fruta</i>	<i>g*</i>
Plátano	20
Uva	16
Manzana	13
Melón	7
Pepino	2

* g por cada 100 g de porción comestible

(Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008)

3.3.5 Fibra cruda y fibra dietética

El concepto de fibra hace referencia a un grupo muy amplio de polisacáridos vegetales de los considerados estructurales, y la lignina que no son digeridos por las enzimas del tracto gastrointestinal. La propiedad biológica más característica de la fibra es la resistencia a la acción de las enzimas digestivas, esto hace que la fibra no sea digerida, absorbida y metabolizada como un nutriente. Sin embargo, la fibra regula el tránsito intestinal, ralentiza la digestión y la posterior absorción de determinados nutrientes y favorece la eliminación de compuestos no digeridos procedentes de la dieta. Los componentes presentes en la fibra son en su mayoría polisacáridos no amiláceos de las paredes celulares vegetales, tales como celulosas, hemicelulosas, pectinas, gomas y mucílago. En estos componentes también se incluyen a los oligosacáridos, el almidón resistente a la digestión y la lignina (Badui, 2006).

Existen dos tipos de fibra dietética: a) fibra dietética soluble, que retiene el agua y se transforma en gel durante la digestión y ayuda a la absorción de nutrientes; y la b) fibra dietética insoluble, que acelera el paso de los alimentos a través del intestino y agrega volumen a las heces (Badui, 2006).

La fibra que poseen las frutas y verduras es rica en hemicelulosa y pobre en celulosa. Su contenido es relativamente bajo aproximadamente entre el 1 y 10% por la elevada proporción de agua que poseen. En el caso de las frutas, las que se consumen con piel aportan más fibra que las que se pelan, ya que la piel es fuente de pectina y lignina. Según varios autores, las frutas y verduras son la fuente idónea de fibra, ya que son más equilibradas que los cereales en cuanto a la proporción de fibra soluble e insoluble (Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008).

Es importante hacer la distinción entre la fibra cruda y la fibra dietética. La fibra cruda es la que se consigna generalmente en la tabla de composición de los alimentos y se determina analíticamente sometiendo al alimento a un tratamiento en caliente con ácido sulfúrico y después con hidróxido de sodio. Bajo estas condiciones se pierden polisacáridos que sí se incluyen en la fibra dietética. Es decir, la fibra cruda normalmente

es menor que la fibra dietética, ya que ésta última representa el contenido total de los polímeros (Badui, 2006).

3.3.6 Cenizas

Los minerales son micronutrientes esenciales en la dieta ya que el organismo no es capaz de sintetizarlos. Su contenido en los alimentos es muy pequeño. Una dieta balanceada aporta todos los nutrimentos inorgánicos suficientes para el hombre. Sin embargo, varios de ellos como el calcio, hierro, sodio y cinc son adicionados. Por otra parte, ciertos minerales como el plomo o el mercurio son altamente tóxicos y pueden aparecer en los alimentos, generando reacciones adversas y alteraciones graves en el ser humano (Badui, 2006; Rodríguez-Rivera y Simón-Magro, 2008).

Las cenizas de un alimento es un término analítico que hace referencia al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. La cuantificación de cenizas supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos. En las cenizas animales predominan los derivados de sodio, mientras que en las vegetales predominan los derivados de potasio (Iturbe y Sandoval, 2007).

3.4 Compuestos bioactivos presentes en los alimentos

La creencia en el poder medicinal que poseen los alimentos y sus compuestos no es un concepto nuevo. Hace casi 2 500 años Hipócrates dijo “que el alimento sea tu medicina, y la medicina tu alimento” y así, esa creencia ha sido transmitida de generación en generación. Los efectos que éstos poseen sobre los beneficios a la salud se observaron por primera vez a partir de estudios de poblaciones y su preferencia por cierto tipo de alimentos, por ejemplo, se observó que las comunidades que consumían aceite de pescado en grandes cantidades padecían en menor proporción enfermedades cardiovasculares. Este tipo de observaciones han derivado en la investigación y caracterización de compuestos bioactivos responsables de estos efectos en modelos animales o *in vitro* (Erdman *et al.*, 2012).

En años recientes, varias investigaciones han exhibido los beneficios y los posibles riesgos asociados con los compuestos bioactivos presentes en los alimentos. Se estima que existen alrededor de 25 000 compuestos bioactivos distintos presentes en los alimentos que consume el hombre y aproximadamente 5 000 (Liu, 2003; Heber, 2004) de ellos han sido identificados, mientras que muchos más siguen siendo desconocidos. Adicionalmente, alrededor de 500 compuestos provenientes de la dieta han sido identificados como modificadores potenciales de la salud. Compuestos que abarcan distintas categorías como minerales, aminoácidos, ácidos grasos, metabolitos secundarios como los flavonoides, entre otros, mismos que pueden influir en varias vías asociadas con crecimiento, desarrollo y resistencia a enfermedades. Por ejemplo, el ajo (*Allium sativum*) ha sido estudiado ampliamente por sus propiedades medicinales durante siglos. Se ha sugerido que este alimento puede reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y del cáncer, debido que es una fuente de compuesto antioxidantes y reduce el daño a los tejidos. Esto sugiere que los efectos en la salud de los compuestos activos son diversos y que no pueden ser explicados mediante un solo mecanismo celular (Milner, 2006; Erdman *et al.*, 2012).

En resumen, los alimentos son un conjunto complejo de compuestos y biomoléculas con diversas funciones por descubrir. Investigar estos compuestos y biomoléculas permite conocer lo efectos benéficos que aportan a la salud además de los ya conocidos, y realizar estrategias nutricionales como medida preventiva principal ante distintas patologías y problemas de salud (Mahan *et al.*, 2013).

3.5 Cumarinas

El (+)-calanólido A (Figura 1) fue aislado por primera vez de brotes y frutos de *Calophyllum lanigerum*, un árbol tropical de Malasia, caracterizándolo como un potente inhibidor de la transcriptasa reversa del VIH-1. Actualmente esta cumarina se encuentra en la fase II/III de evaluación clínica en pacientes con VIH-1. El interés en este compuesto ha alentado el estudio químico de la familia Clusiaceae (Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009).

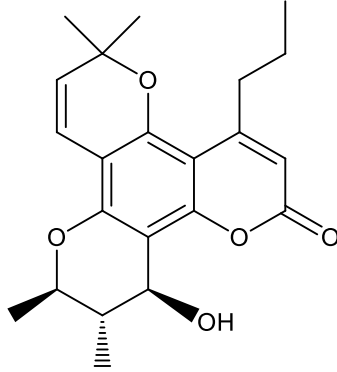


Figura 1. Estructura del (+)-calanólido A.

Las cumarinas se pueden definir como compuestos que presentan esqueleto benzo- α -pirona (2H-1-benzopiran-2-ona) (Figura 2), pueden tener distintas sustituciones en su estructura básica lo que provoca que presenten diferente actividad biológica (Yang *et al.*, 2005; Xiao-Hui *et al.*, 2008). Las cumarinas se dividen en 1) cumarinas tipo mammea en donde se encuentran la mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomameigina; y 2) dipiranocumarinas tetracíclicas y cumarinas tricíclicas; donde podemos encontrar a su vez a distintos grupos que difieren entre sí en el sustituyente del carbono C4: inófilums (fenilo en C-4), calanólidos (prenilo en C-4) y cordatólidos (metilo en C-4) (Ishikawa, 2009).

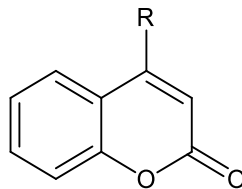


Figura 2. Estructura básica de compuestos tipo cumarina.

3.5.1 Actividad biológica de las cumarinas

A las cumarinas se les han atribuido diversas actividades biológicas; algunas de ellas son actividad antiinflamatoria, anticoagulante, antipsoriática, antiplaquetaria, antimutagénica, citotóxica, inhibición de la activación de las células T (Xiao-Hui *et al.*, 2008). De igual forma se destacan propiedades antivirales y se han descrito propiedades

insecticidas (Matern *et al.*, 1999). Así mismo se han descrito usos veterinarios y farmacéuticos (Meléndez y Capriles, 2002).

3.6 Generalidades de la familia Clusiaceae

La familia Clusiaceae, anteriormente conocida como Gutiferae, está conformada por árboles, arbustos y plantas herbáceas con jugos resinosos o glándulas oleosas amarillentas o verdosas, de hojas simples, a menudo engrosadas que se conservan generalmente verdes, con flores bisexuales o unisexuales en plantas separadas. Poseen frutos drupáceos o capsulares con semillas a veces aladas (UNAM, 2015).

Esta familia está conformada por 1600 especies agrupadas en 36 géneros. *Clusia* y *Calophyllum* son dos de los géneros más importantes pertenecientes a la familia Clusiaceae (Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009), debido a que numerosas plantas de estos géneros han sido utilizadas de una forma tradicional como hierbas medicinales en el tratamiento de distintas enfermedades como la malaria, infecciones de la piel e inflamación, por mencionar algunas (García-Zebadúa, 2014). Se ha demostrado también que estos géneros son una fuente importante de compuestos con actividad biológica relevante. Estos compuestos biológicamente activos se clasifican en los siguientes grupos: cumarinas, xantonas, cromanonas, esteroides y triterpenos (Xiao-Hui *et al.*, 2008).

3.7 *Mammea americana* L.

3.7.1 Descripción botánica, morfología y estructura

Mammea americana es una especie perteneciente a la familia Clusiaceae (Figura 3), conocida comúnmente como zapote Domingo, zapote Santo Domingo o zapote de América del Sur. Es nativa de las Antillas y de la zona norte de América del Sur (Morton, 1987). Es un árbol perenne que puede alcanzar desde los 18 hasta los 21 m de altura, con corona oval, con hojas opuestas, elípticas u elípticas ovaladas de 8 a 16 cm, rígidas y brillantes. Con flores solitarias, pétalos blancos abovados de hasta 2 cm. El fruto es una drupa globosa, con mesocarpio amarillo y dulce, con pocas semillas, de 8 cm de

diámetro y con un peso de 300 a 500 g. Posee un sabor similar al albaricoque, melocotón, o frambuesa (Germosén-Robineau, 2005). En la Figura 4, se muestra una representación esquemática de esta especie.

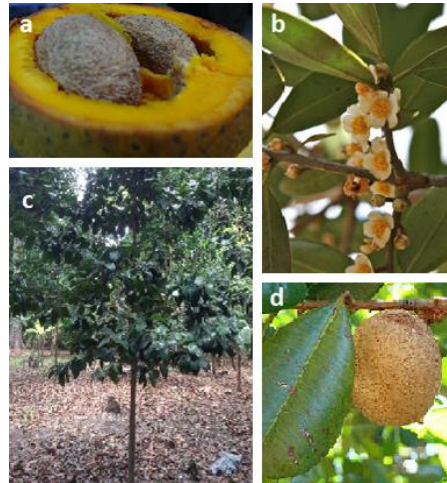


Figura 3. Fotografías de *Mammea americana*: a) fruto, b) flor, c) árbol, d) fruto.



Figura 4. Esquema de la especie de *Mammea americana* (Germosén-Robineau, 2005)

3.7.2 Importancia mundial

El zapote Domingo es cultivado comúnmente en las Bahamas y en las Antillas Mayores y Menores. Rara vez se cultiva en México y América Central, pero se puede encontrar en Costa Rica, El Salvador y Guatemala. En algunas zonas la especie se planta por su

fruta, otros usos incluyen al árbol como una barrera contra el viento y como una planta ornamental (Morton, 1987).

3.7.3 Usos culinarios y valor nutricional

El fruto de *Mammea americana* constituye un alimento de consumo humano relativamente extendido. Se consume normalmente la pulpa cruda y sin cáscara, en ensaladas, se usa como ingrediente para sorbetes y helados, en pies y tartas. El alto contenido en pectina en la fruta madura hace al zapote un ingrediente óptimo para hacer gelatinas, en especial, cuando se combina con frutas como la piña que presentan un bajo contenido de pectina y acidez alta. Se han identificado cincuenta y un compuestos volátiles responsables de sabor agradable en el zapote. La fruta es una fuente importante de carotenoides y vitamina A (Yahia y Gutiérrez-Orozco, 2010). El valor nutricional de la fruta se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Valor nutricional del fruto de *Mammea americana*

Constituyente	Cantidad*	Constituyente	Cantidad*
Humedad	85.5-87.6 %	trans-β-caroteno	1000-1820 µg
Calorías	44.5-45.3	9-cis-β-caroteno	10-50 µg
Proteínas	0.470-0.088 g	trans-β-zeacaroteno	70-90 µg
Carbohidratos	11.52-12.67 g	trans-β-apo-10'-carotenal	360-640 µg
Grasa	0.15-0.99 g	trans-β-apo-8'-carotenal	740-1480 µg
Fibra	0.80-1.07 g	Tiamina	0.017-0.030 mg
Cenizas	0.17-0.29 g	Riboflavina	0.025-0.068 mg
Calcio	4.0-19.5 mg	Niacina	0.160-0.738 mg
Fósforo	4.0-19.5 mg	Ácido ascórbico	10.2-22.0 mg
Hierro	0.15-2.51 mg	Triptófano	5 mg
Vitamina A	688 RE	Metionina	5-6 mg
Carotenoides totales	6.25 mg	Lisina	14-35 mg
13-cis-β-caroteno	40-60 µg		

* Valores aproximados por 100 g de fruta fresca
(Morton, 1987; Godoy y Rodríguez-Amaya,
1994; De Rosso y Mercadante, 2007)

(Morton, 1987; Godoy y Rodríguez-Amaya,

3.7.4 Usos tradicionales y actividad biológica

Las hojas de *Mammea americana* se utilizan de manera tradicional como un complemento al tratamiento médico en casos de reumatismo aplicando de manera local. Por otra parte, la semilla y la corteza de esta especie se utilizan en maceración con agua en el tratamiento contra piojos. Mientras que la cáscara del fruto se utiliza en el tratamiento de indigestión (Germosén-Robineau, 2005).

Se ha reportado que las hojas contienen los carbohidratos pinitol y el isoprenoide solanesol. La semilla contiene cumarinas como la mesuagina, derivados de la seselina, 4-hidroxi-xantona, mameigina, isomameína, neomameína, 1,5- y 2-hidroxi-xantona, diterpenos como el mameol, ácido succínico y sacarosa. Por otra parte, el mesoderma del fruto contiene el triterpeno friedelina y las cumarinas mameigina y la 2-hidroxixantona. La planta entera contiene a la cumarina mameína (Germosén-Robineau, 2005).

A la mameína y otras cumarinas derivadas del floriglucinol se les atribuyen propiedades antitumorales, el aceite fijo de semilla mostró actividad citotóxica *in vitro* sobre el modelo de sarcoma 180-asc, con $CI_{50} = 0.3 \mu\text{g/ml}$ (Crombie, 1972).

La planta ha mostrado poseer actividad insecticida sobre *Aedes aegyptii*, mientras que la semilla fue larvicida contra *Laphygma sp.* y *Plutella sp.* (Plank, 1944).

Se han descrito también cualidades citotóxicas y antimicrobianas *in vitro* de extractos de la planta. Diversas cumarinas aisladas de la corteza del tallo del árbol mostraron poseer actividad citotóxica contra la línea celular humana 9K-B (carcinoma nasofaríngeo) y actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Quince cumarinas isopreniladas identificadas en el zapote han mostrado potente actividad citotóxica en las líneas celulares humanas de cáncer de colon HT-29, SW-480 y HCT-116, induciendo apoptosis (Ouahouo *et al.*, 2004).

A los extractos y compuestos obtenidos de esta planta se les reconoce actividad insecticida y larvicida (Grainge y Ahmed, 1988; Sukh y Openden, 1997).

Por otra parte, diez cumarinas encontradas en el zapote han exhibido alta actividad antioxidante (Yang *et al.*, 2006).

3.7.5 Toxicidad

La aplicación tópica de la hoja fresca machacada y de 1 ml del preparado fresco de hoja fresca (10.57 g) licuada en 20 ml de agua (528.5 mg/ml) sobre lomo depilado de conejo macho de la cepa Neva Zelanda (en grupos de dos) durante 4 días consecutivos, no mostraron irritación cutánea evidente (Germosén-Robineau, 2005; Yahia y Gutiérrez-Orozco, 2010).

3.8 Género *Calophyllum* y *Calophyllum brasiliense*

El género de *Calophyllum* consiste en un grupo de alrededor de 200 especies distintas de árboles, es conocido por ser una fuente rica de cumarinas y xantonas bioactivas, especialmente en el aislamiento de calanólidos (=bezo-tripiranonas), compuestos que forman parte de una subclase única dentro de los inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa reversa del VIH-1. El (+)-calanólido A, es un compuesto de este tipo que ha sido ampliamente estudiado y aislado por primera vez de brotes y frutos de *Calophyllum lanigerum* de Malasia (Kashman *et al.*, 1992). Actualmente se encuentra en la fase II/III evaluación clínica en pacientes VIH-1 positivos. Las cromanonas también son compuestos distintivos de este género y un gran número de plantas pertenecientes a *Calophyllum* son utilizadas tradicionalmente como plantas medicinales, por ejemplo, como plantas diuréticas, en el tratamiento de la malaria, enfermedades venéreas y para la presión arterial, reumatismo, hemorroides y úlceras crónicas, así como infecciones de la piel, heridas, dolor, enfermedades oculares e inflamación. Así mismo, desde un enfoque farmacológico se ha demostrado que este género posee varias actividades, como actividad antiviral, antitumoral, antibacteriana, así como actividad citotóxica. El interés en este tipo de compuestos ha promovido los estudios químicos sobre la familia Clusiaceae y el género *Calophyllum* (Huerta-Reyes *et al.*, 2004; Xiao-Hui *et al.*, 2008; Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009).

3.8.1 *Calophyllum brasiliense*

Calophyllum brasiliense (Figura 5) es un árbol que puede alcanzar hasta los 40 m de altura, posee frutas que son drupas de 1 a 3 cm de diámetro ovoides o esféricos, con color verde-amarillo. Crece en la sabana y en la selva tropical de Brasil donde es conocido comúnmente *guanandí* o *guarandí*, y en México se le conoce como *Bari*, *Santa María* o *Guaya* en los estados de Chiapas y Tabasco (CONABIO, 2016).

Las hojas y la corteza de esta planta son utilizadas frecuentemente en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades como el dolor, infecciones, inflamación y úlceras (Cechinel *et al.*, 2009; Reyes Chilpa y Huerta Reyes, 2009). De igual forma, sus propiedades antimicrobiales, citotóxicas, antineoplásticas, antiespasmódicas, anti-VIH y antiulcerosas han sido descritas anteriormente (Cechinel *et al.*, 2009). Los compuestos que se han aislado a partir de esta especie se clasifican estructuralmente en siete grupos principales: compuestos fenólicos simples, triterpenos, esteroides, flavonoides, xantonas, cromanonas y cumarinas (García-Zebadúa *et al.*, 2014) que a su vez, estas últimas se pueden clasificar en cumarinas tipo mammea y dipiranocumarinas tetracíclicas.

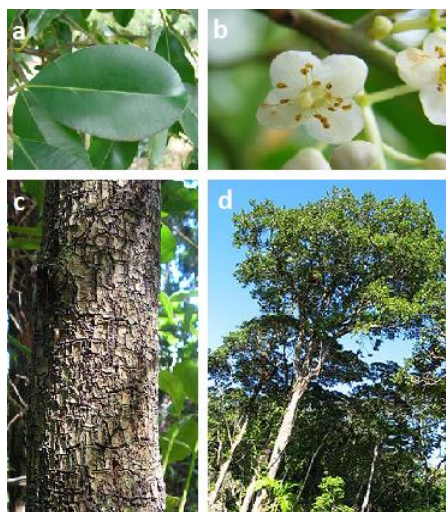


Figura 5. Fotografías de *Calopyllum brasiliense*: a) hojas, b) flores, c) corteza, d) árbol

4.0 Las cumarinas y el soulatrólido

Algunas de las cumarinas tipo mammea que han sido aisladas de esta especie con actividad biológica relevante incluyen a la mammea A/BA, A/BB, B/BA, B/BB, C/OA, C/OB, B/BA ciclo F, B/BB ciclo F e isomameigina (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004).

Dentro de las dipiranocumarinas tetracíclicas se pueden encontrar a los inófilums: inófilum A, C, D y E; a los calanólidos: (+)-calanólido A, (-)-calanólido B, (+)-calanólido C; cordatólidos y al soulatrólido (García Zebadúa, 2012). Se ha demostrado que el soulatrólido es un potente inhibidor de la transcriptasa reversa del VIH-1 y también de *Mycobacterium tuberculosis* (Gomez-Verjan *et al.*, 2015).

4. Justificación

Debido a que el cáncer y el VIH se han convertido en problemas de salud pública importantes, es necesario encontrar nuevas moléculas que posean actividad biológica y que puedan ser empleadas en el tratamiento de estas afecciones.

5. Hipótesis

Se aislarán e identificarán cumarinas biológicamente activas de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae, mismas que presentarán actividad citotóxica frente a distintas líneas tumorales humanas, además de inhibir a la enzima transcriptasa reversa del VIH-1.

6. Objetivo General

Evaluar la actividad citotóxica de las cumarinas aisladas de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae frente a líneas celulares de tumores humanos, así como determinar su actividad inhibitoria sobre la enzima transcriptasa reversa de VIH-1 y de modo complementario, realizar en análisis proximal del fruto de *Mammea americana* L.

6.1 Objetivos Particulares

- a. Aislar e identificar cumarinas tipo mammea a partir de extractos obtenidos de la cáscara del fruto de *Mammea americana* L.
- b. Caracterizar la citotoxicidad de las cumarinas aisladas en las líneas celulares de diferentes tipos de cáncer en humanos K-562, HaCaT, SW-620, MCF-7, SKLU-1 y HeLa a través del ensayo de MTT.
- c. Analizar la fragmentación del ADN inducida por cumarinas citotóxicas en una línea celular
- d. Evaluar si las cumarinas aisladas pueden inhibir a la enzima transcriptasa reversa del virus VIH-1.
- e. Realizar el análisis proximal de la pulpa del fruto de *Mammmea americana* L.

7. Procedimiento experimental (Materiales y métodos)

7.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal objeto de estudio se recolectó en el estado de Veracruz (Figura 6). El ejemplar de respaldo se depositó en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número de colecta 16 400. En la Tabla 5, se muestra la muestra la ficha de colecta.

Tabla 5. Ficha de colecta del fruto de *Mammea americana*

Especie	<i>Mammea americana</i>
Municipio	San Andrés Tuxtla
Localidad	San Andrés Tuxtla, al sur del Colegio Militar (Ejército nacional N. 25) sobre la calle Juan de la Barrera
Altitud	300 m.s.n.m
Tipo de vegetación	Selva perturbada, cerca de un cultivo de mango
Coordenadas	18°26'34" N 95°12'27" W
Vegetación asociada	Hierbas
Información ambiental	Huerto familiar, en el patio
Altura	20 m
Abundancia	Escasa
Forma biológica	Árbol
Suelo	De coloración negra
Nombre común	zapote Domingo
Uso	Consumo humano
Colector y fecha de colecta	Dulce Yehimi López Miranda, 28/06/2015



Figura 6. Fotografía de sitio de recolección de *Mammea americana*. San Andrés Tuxtla, Veracruz

7.2 Aislamiento de cumarinas tipo mammea

El aislamiento de cumarinas tipo mamea se encuentra reportado en estudios anteriores, entre las que se encuentran las cumarinas mammea A/AA ciclo D y mammea A/AB ciclo D, junto con otras 14 cumarinas (Yang *et al.*, 2005; Hernández, 2007). En este estudio se decide utilizar la cáscara del fruto para el aislamiento de cumarinas mediante una cromatografía en columna.

Material y reactivos

- Rotaevaporador
- Columna cromatográfica de vidrio con filtro de borosilicato
- Sílica gel clase 70/230
- Aparato para punto de fusión Fisher Johns
- Hexano
-

- Acetato de etilo
- Diclorometano
- Metanol

Para aislar las cumarinas presentes en el zapote Domingo, se inició con la preparación del extracto de la cáscara del fruto.

- Preparación del extracto

Se pesaron 236 g de cáscara del fruto del zapote Domingo se dejó secar a la sombra durante una semana. Cuando el material se encontró seco se molió manualmente y se maceró de forma sucesiva utilizando una mezcla de DCM:MeOH en una porción 1:1 como disolvente por un periodo de dos semanas, para después concentrar el extracto y eliminar el disolvente por medio de un rotavapor.

En seguida, se realizó el fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna La metodología utilizada se muestra a continuación:

- Preparación de la columna cromatográfica

a) Preparación de la muestra:

Se pesaron 7.43 g del extracto y se disolvió en una mezcla de 15 ml MeOH-AcOEt 1:1, posteriormente a esta disolución se le agregó celita lavada hasta la formación de una pasta. La mezcla de los disolventes utilizados se evaporó en la campana de extracción.

b) Preparación de la columna cromatográfica:

Se depositaron 100 g de sílica gel suspendida en hexano en el interior de la columna cromatográfica hasta que se compactó y se cuidó que no hubiera la formación de burbujas en el interior. Posteriormente la muestra ya preparada y adsorbida se colocó en la parte superior de la fase estacionaria y se agregó hexano como fase móvil hasta cubrir la columna.

c) Columna cromatográfica:

Se siguió con la separación de los compuestos orgánicos y las cumarinas presentes en la muestra. Se monitoreó el cambio de disolvente por medio de cromatografía en capa fina. Esta separación se realizó colectando 193 fracciones de 25 ml cada una. En la Figura 7, se muestra la fase móvil que se utilizó para la separación de éstas fracciones.

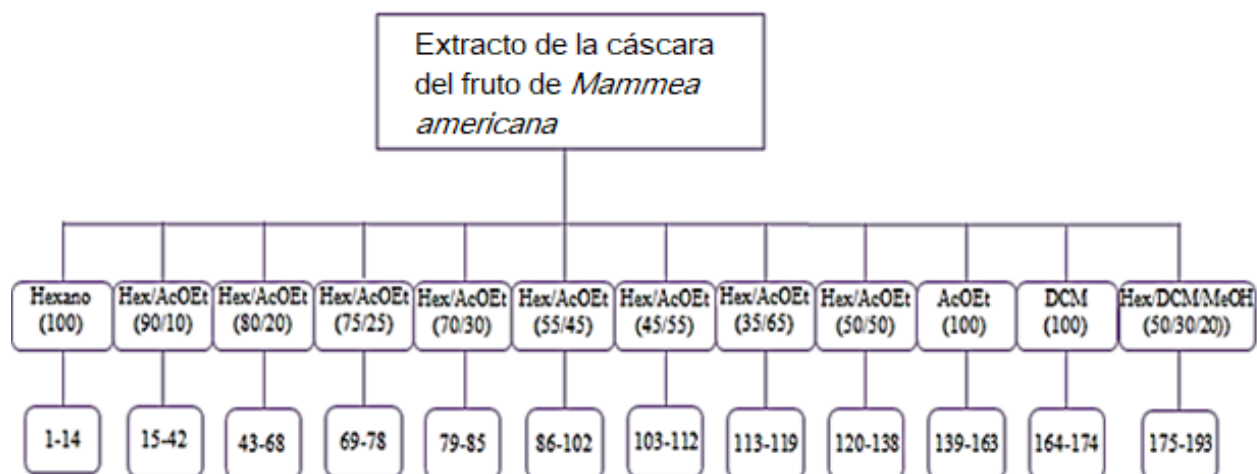


Figura 7. Disolventes utilizados como fase móvil en el fraccionamiento de la columna cromatográfica

d) Reunión de las fracciones:

Las fracciones se analizaron mediante cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a la similitud cromatográfica que presentaron. En la Figura 8, se muestran los grupos de fracciones reunidas. En el diagrama se muestra a partir de la fracción 23, cabe mencionar que en las fracciones 1-22 no se observó aún la presencia de compuestos en las placas cromatográficas.

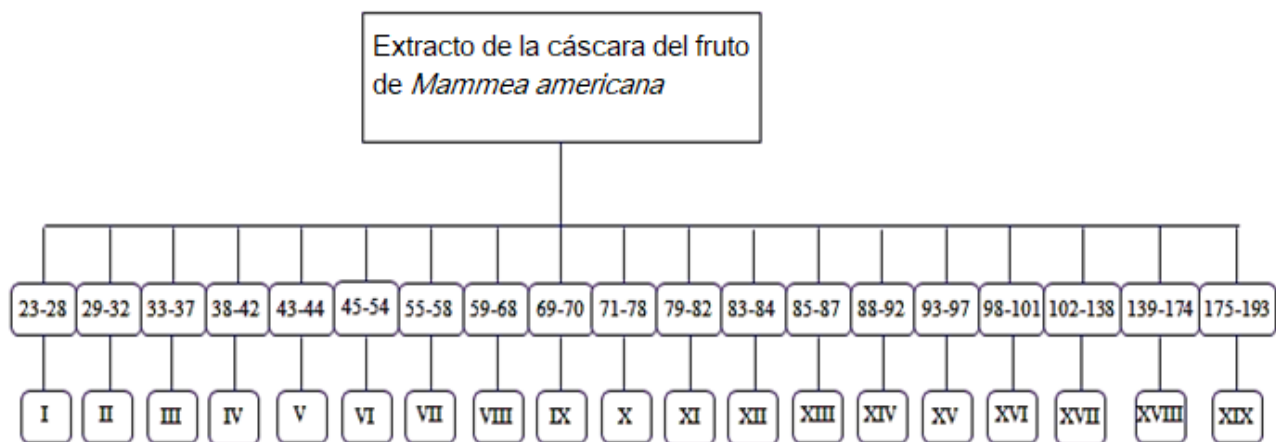


Figura 8. Diagrama de reunión de fracciones en grupos que muestran similitud cromatográfica

Se observó que en los grupos II y III hubo formación de cristales amarillos y se decidió analizar estos grupos mediante cromatografía en columna y se reunieron en uno sólo ya que presentaron similitudes cromatográficas. Posteriormente se decidió purificar el compuesto aislado de los grupos II y III.

Para purificar el compuesto aislado se decidió hacer una recristalización en caliente utilizando como disolvente MeOH.

Después de purificar el compuesto, se procedió a determinar el punto de fusión utilizando un equipo Fisher Johns.

7.3 Identificación del compuesto aislado

Cuando se obtuvo el compuesto puro se procedió a su identificación mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas en el Instituto de Química de la UNAM.

Su estructura se determinó por RMN ¹H, IR, EM y difracción de rayos X. Los parámetros espectroscópicos y espectrométricos obtenidos fueron comparados con los previamente descritos en la literatura.

7.4 Evaluación farmacológica

7.4.1 Ensayo de citotoxicidad (determinación de CI_{50} de la mameigina y soulatrólido sobre las líneas tumorales humanas)

Para evaluar la citotoxicidad de las cumarinas se utilizó el ensayo de MTT. Este ensayo requiere de la incubación del reactivo de MTT Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) con una población de células viables con metabolismo activo, mismas que convierten este sustrato (sales amarillas de tetrazolio) en un producto colorido (un derivado de formazán de coloración azul) y que puede ser detectado por medio de un lector de placas con una absorbancia máxima de 570 nm. El formazán producto de la reducción del MTT se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células, en la superficie celular y en el medio de cultivo, por lo que es necesario solubilizarlo antes de realizar las lecturas.

En condiciones de cultivo estándar, la incubación del sustrato con células viables resultará en la generación de una señal que es proporcional al número de células viables presentes. Cuando las células mueren, pierden la habilidad de convertir el sustrato MTT en el producto formazán, es por ello que se convierte en un marcador de células viables ampliamente utilizado (Mossman, 1983).

El mecanismo celular exacto de reducción del MTT en formazán aún no se conoce bien, pero se cree que involucra la reacción con NADH o reducción de moléculas similares que transfieren electrones al MTT. También se especula que el MTT mide la actividad mitocondrial debido a la participación de enzimas mitocondriales específicas, como la succinato deshidrogenasa (Riss *et al.*, 2013).

Material y reactivos

- Lector de placas multipozo
- Incubadora de cultivo celular
- Placas de 96 pozos
- Solución de MTT en PBS/EDTA
-

- Solución buffer fosfato salino con EDTA (PBS/EDTA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Medio de cultivo fresco DMEM

En la realización de este ensayo, la cumarina soulatrólido (Figura 9B) se aisló previamente del árbol de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química de la UNAM, mientras que la cumarina mameigina se aisló como previamente se describió (Figura 9A).

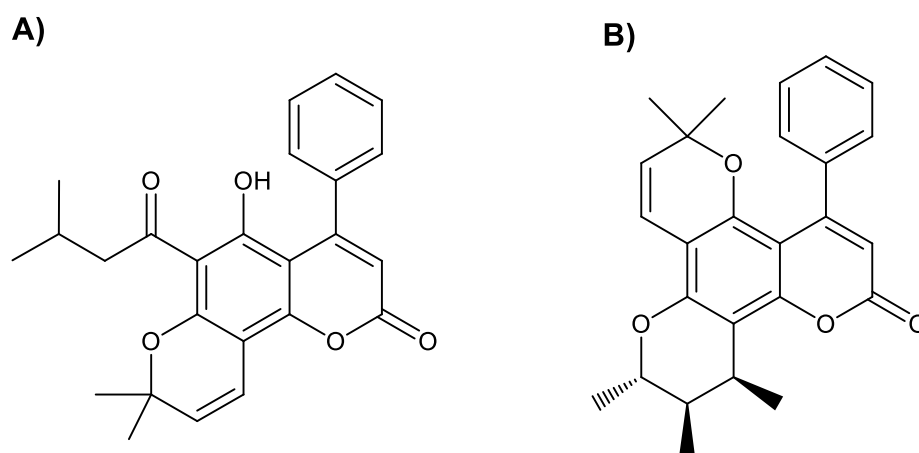


Figura 9. Cumarinas evaluadas en el presente estudio. A) mameigina, aislada de *Mammea americana* y B) soulatrólido, compuesto aislado previamente de *Calophyllum brasiliense*

Las cumarinas se disolvieron por separado en DMSO y se mezclaron con medio de cultivo fresco DMEM para lograr diversas concentraciones finales. El MTT se diluyó en PBS/EDTA para obtener una solución stock con una concentración de 2.5 mg/ml.

Las células K-562, HaCat, SW-620, MCF-7, SKLU-1 y HeLa fueron cultivadas y sembradas a una densidad final de 7 000 células por pozo en una placa de 96 pozos. Estas líneas celulares se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo (95% de humedad, 37 °C de temperatura y 5% de CO₂). Después de 24 horas de incubación fueron expuestas por 48 h con las cumarinas, paclitaxel como control positivo y con

DMSO al 0.28% como vehículo. Cabe mencionar que en este ensayo la cantidad final de DMSO no altera el crecimiento celular ni las mediciones cuando se compara con cultivos libres de vehículo. Después de la exposición de las células con diferentes concentraciones de las cumarinas, las células fueron incubadas con 20 µL de MTT (2.5 mg/ml en PBS) por 2 h. Posteriormente se retiró todo el sobrenadante y los cristales de formazán que precipitaron fueron disueltos en 200 µL de DMSO, para finalmente medir la absorbancia a 550 nm con un lector de placas multipozo.

El porcentaje de viabilidad en cada pozo, tanto tratamiento como vehículo, fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$viabilidad = 100 - (100 \times \frac{absorbancia\ leída}{absorbancia\ del\ control\ negativo})$$

Los datos obtenidos de los porcentajes de viabilidad celular se ajustaron a una curva sigmoïdal dosis-respuesta mediante el software OriginPro® 7.0 (RockWare, Golden, CO) y se calculó el valor de CI_{50} a partir de la ecuación de la curva.

7.4.2 Determinación de la fragmentación del ADN (Ensayo de TUNEL)

Para realizar esta determinación se utilizó el ensayo de TUNEL. El ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) es un método que se ha diseñado para detectar la fragmentación de ADN. Este método se basa en el marcaje de ADN de hebra sencilla por medio de la transferasa terminal (TdT) que adiciona nucleótidos marcados (dUTP) al ADN en los extremos 3'OH libres. Dichos nucleótidos pueden estar marcados por fluorescencia y detectarse posteriormente por medio de microscopía o citometría de flujo (Alfaro *et al.*, 2000).

La fragmentación del ADN fue evaluada usando células HeLa previamente tratadas con la cumarina soulatrólido, usando el Kit *In situ cell death detection kit-fluorescein* (Roche, Basel, SW) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para lo anterior, se cultivaron células HeLa en tres cajas Petri de 60 mm bajo condiciones estándar hasta alcanzar una concentración final de 4×10^5 células por caja, a las cuales se les colocaron 4 cubreobjetos a cada una. Posteriormente se les añadió solumetrólido 24 μM , DMSO al 0.28% (vehículo) y paclitaxel 0.25 μM (control positivo de apoptosis) a cada caja. Después de 3, 6, 12, 18, 24 y 48 h de tratamiento, las células ya adheridas a los cubreobjetos se fijaron en 4% de paraformaldehído durante 45 min en una cama de hielo y a continuación se lavaron con PBS (pH 7.4). Las células se permeabilizaron por 2 min en Tritón X-100 al 1.0% en citrato de sodio al 0.1% y a continuación se lavaron con PBS y se incubaron con la reacción de TUNEL durante 1 h a 37 °C en la oscuridad. Pasado este tiempo, las células se lavaron dos veces con PBS y los cubreobjetos ya tratados se montaron en portaobjetos con medio de montaje Fluoroshield.

La fragmentación del ADN se analizó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse® y se tomaron fotografías con la cámara Nikon Digital Sight-DS-LI® de los diferentes tratamientos.

7.4.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de la mameigina sobre la enzima transcriptasa reversa del virus de VIH-1

La actividad inhibitoria de la mameigina sobre la enzima transcriptasa reversa (TR) se evaluó mediante el ensayo Lenti-RT® Activity Assays (Cavidi Tech) y previamente estandarizado en el laboratorio del Dr. Ricardo Reyes Chilpa en el Instituto de Química de la UNAM (Huerta-Reyes *et al.*, 2004). Se siguió el protocolo descrito por el fabricante con el fin de calcular el porcentaje de inhibición de la enzima transcriptasa reversa del virus de VIH-1 por la mameigina. Este es un método colorimétrico, en donde a una microplaca de 96 pozos con poliadenina (Poli A) inmovilizada, se le agrega el compuesto a analizar. En presencia de bromo-desoxiuridina trifosfato (BrdUTP) y la enzima transcriptasa reversa se construye la cadena complementaria Poli U (paso 1). Posteriormente se adiciona un anticuerpo monoclonal conjugado a fosfatasa alcalina que reconoce la cadena complementaria de Poli U (paso 2). Finalmente con la adición del reactivo paranitrofenilfosfato (pNPP), el cual es sustrato de la fosfatasa alcalina, el grupo fosfato es hidrolizado a paranitrofenil, generando una reacción colorida (paso 3). Esta

reacción se registra con un lector de placas multipozo a 405 nm, ya que es una reacción colorida. En la Figura 10, se esquematiza esta reacción. La mameigina fue probada a una concentración de 50 µg/ml, usando como vehículo DMSO (0.28% v/v) y el fármaco Nevirapina (0.001 µM-1 mM) como control positivo de inhibidor de la transcriptasa reversa.

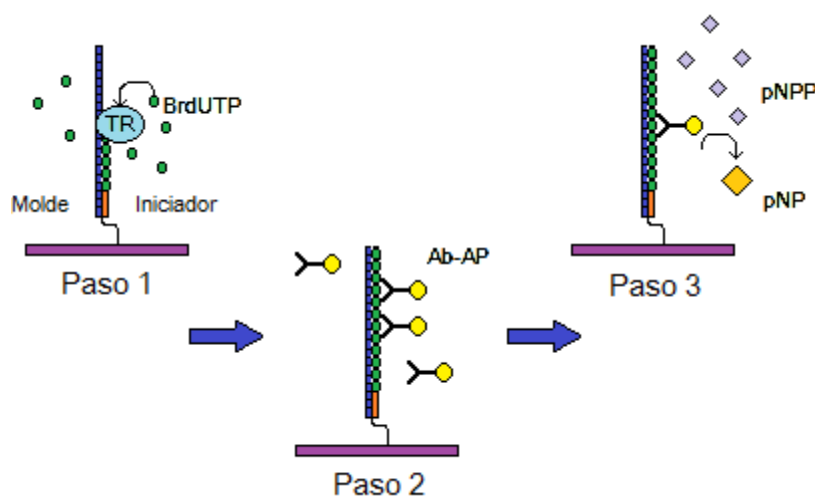


Figura 10. Representación esquemática de la determinación de transcriptasa reversa del virus de VIH-1.

7.5 Análisis proximal de la pulpa del fruto de *Mammea americana*

Estas determinaciones se realizaron con ayuda de la Dra. Areli Flores Morales del Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. En la pulpa del fruto se determinaron los siguientes parámetros: humedad, cenizas, proteínas, lípidos, fibra cruda y carbohidratos totales. Para realizar estas determinaciones se utilizaron los métodos establecidos por la AOAC (AOAC, 1995).

7.5.1 Determinación del contenido de humedad por secado en estufa

Considerando que la muestra es térmicamente estable y no contiene una cantidad significativa de compuestos volátiles, se procedió a determinar el contenido de humedad

mediante secado en estufa. Este método se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación de agua (Iturbe y Sandoval, 2007).

Material

- Estufa de circulación forzada Lab-line imperial®
- Balanza analítica Sartorius analytic®
- Desecador de vidrio
- Pesafiltros

Se pesaron 6.0 g de muestra de la pulpa del fruto y se distribuyeron en el fondo de una pesafiltro, el cual se secó hasta alcanzar peso constante. A continuación, la muestra se secó en la estufa a 98 °C durante 4 h. Pasado este tiempo se sacó de la estufa y se colocó en el desecador durante 30 min. Posteriormente se pesó 2 veces sucesivamente hasta que no hubiera una diferencia de 3 mg.

Para realizar el cálculo de porcentaje de humedad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(P_i - P_f)}{m} \times 100$$

Donde:

P_i = peso del pesafiltro + muestra antes de secar (g)

P_f = peso del pesafiltro+ muestra después de secar (g)

m= peso de la muestra (g)

7.5.2 Determinación del contenido de cenizas

Las cenizas se consideran como el contenido de minerales totales o material inorgánico presentes en la muestra. En este estudio se usó el método 923.03 de la AACC para la determinación de cenizas (AACC, 2000). En dicho método se calcina la muestra en seco, en otras palabras, el alimento se destruye calentándolo suavemente con un mechero

Bunsen para carbonizarlo y posteriormente, calcinarlo a 500 °C en un horno de mufla hasta obtener un residuo blanco o gris claro.

Material

- Mufla Termolyne®
- Balanza analítica Sartorius analytic®
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio

Se colocaron 4.0 g de muestra en un crisol de porcelana puesto previamente a peso constante en una estufa a 100 °C, posteriormente se calcinó la muestra con un mechero Bunsen hasta que la muestra dejó de producir humo. En seguida, se colocó el crisol en una mufla a 500 °C durante 5 h. Pasado este tiempo, el crisol se sacó de la mufla, se dejó enfriar en el desecador y se pesó hasta que se registró peso constante.

Para cuantificar las cenizas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = peso del crisol + muestra después de ser calcinada (g)

Po = peso del crisol a peso constante (g)

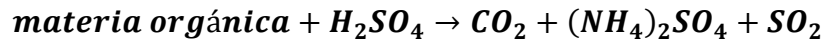
m = peso de la muestra (g)

7.5.3 Determinación del contenido de proteína

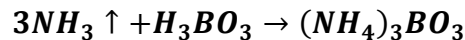
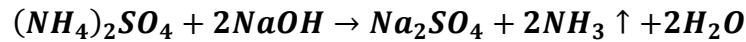
Esta determinación se llevó a cabo a través del método de Kjeldahl, el cual se caracteriza por digerir la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado caliente y la reducción del nitrógeno a amoníaco. El amoníaco es retenido como bisulfato de amonio y éste puede ser determinado por destilación alcalina y titulación (FAO, 2016).

El método Kjeldahl consta de las siguientes etapas:

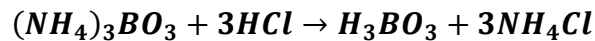
a) Digestión



b) Destilación



c) Titulación



Este método determina la materia nitrogenada total. Para convertir el nitrógeno a proteína se emplea el factor de 6.25, el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno (Iturbe y Sandoval, 2007), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Factor} = \frac{100 \text{ g de Proteína}}{16 \text{ g Nitrógeno}} = 6.25$$

Material y reactivos

- Unidad de digestión Kjeldahl Tecator®
- Unidad de destilación Tecator®
- Tubos de digestión Tecator®
- Mezcla digestiva
- Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada (HCl)
- Solución de hidróxido de sodio al 45% (NaOH)
- Solución de ácido bórico con indicadores
-

- Verde de bromocresol al 0.1% en metanol
- Rojo de metilo al 0.1% en metanol
- Fenolftaleína al 0.1% en metanol

Preparación de soluciones

- Solución de ácido bórico con indicadores

Se pesan 40 g de H₃BO₃ y se disuelven en 800 ml de agua destilada, a continuación se agregan 35 ml de fenolftaleína al 0.1% en alcohol y 10 ml de una mezcla de rojo de metilo al 0.1% con verde de bromocresol al 0.1% en alcohol. Finalmente se afora a 1 L.

La muestra se colocó en los tubos de digestión Kjeldahl y se adicionaron de 5 g de mezcla digestiva y 25 ml de H₂SO₄ concentrado. El tubo se colocó en posición inclinada en el bloque de calentamiento del aparato digestor (precalentado a 360 °C) y se calentó hasta que la espuma producida cesara. A continuación se hirvió hasta la total destrucción de la materia orgánica, es decir, hasta que la solución adquirió una coloración azul verdosa. Una vez terminada la digestión se continúa con la destilación, para esto, el tubo se dejó enfriar y se agregaron 200 ml de agua destilada. Se agregaron perlas de ebullición y 75 ml de NaOH al 45% por agitación. Inmediatamente conectó a un matraz de destilación con la salida del condensador sumergida dentro del matraz Erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico con indicadores. Se destiló hasta obtener un volumen de 150 ml. A continuación se titula el exceso de ácido con una solución de HCl 0.1 N.

Para calcular la cantidad de proteína en la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = \frac{(\text{Vol. blanco} - \text{Vol. problema}) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ de proteína} = \% \text{ de Nitrógeno} \times 6.25$$

Donde:

N= normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno = 0.014

m= peso de la muestra (g)

7.5.4 Determinación del contenido de lípidos

El contenido total de lípidos se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos como lo son las metodologías de Soxhlet, Goldfisch, Mojonnier, aunque también pueden determinarse por métodos instrumentales que se basan en las propiedades físicas o químicas de los lípidos. Esta determinación se realizó con el método de Soxhlet, que es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método, la muestra queda sumergida en el disolvente cuando éste se calienta, se volatiliza y se condensa en el matraz de calentamiento, para que, a continuación, este mismo disolvente sea sifoneado nuevamente al matraz de calentamiento para repetir el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre el matraz que contiene el extracto etéreo y el matraz a peso constante (Iturbe y Sandoval, 2007).

Material y reactivos

- Dispositivo tipo Soxhlet Labconco®
- Balanza analítica Sartorius analytic®
- Manta de calentamiento
- Cartucho de celulosa
- Éter de petróleo (Q.P)

Se pesó la muestra deshidratada y molida. Se colocó en un cartucho de celulosa tarado. El cartucho se puso con la muestra en el extractor Soxhlet y éste se conectó al condensador y al matraz. El condensador se cargó con éter de petróleo por el extremo superior hasta llenar tres cuartas partes del matraz. Posteriormente se calentó el matraz en el plato caliente a una temperatura que permitió gotear al éter del condensador para salir por la parte superior y caer en el matraz nuevamente. La extracción duró por lo

menos 4 h. Pasado este tiempo el calentamiento y la extracción se suspendieron, se dejó enfriar y se sacó el aparato y el cartucho del extractor. Por último se desecó el cartucho en la estufa, se dejó enfriar y se pesó.

Para calcular el contenido de lípidos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de extracto etéreo} = \frac{(Pf - Pi)}{m} \times 100$$

Donde

Pf = peso del matraz después de la extracción (g)

Pi = peso del matraz antes de la extracción (g)

m = peso de la muestra (g)

7.5.5 Determinación del contenido de fibra cruda

Este método se basa en la digestión ácida y alcalina de la muestra, obteniéndose un residuo de fibra cruda y sales que se calcinan. La diferencia de pesos después de la calcinación indica la cantidad de fibra presente (NMX-F-090-S-1978, 1978).

Material y reactivos

- Aparato de digestión Labconco®
- Embudo Buchner con malla metálica tipo California
- Vasos Berzelius de 600 ml
- Mufla Termolyne®
- Estufa de vacío Lab-Line Duo Vac Oven®
- Crisoles a peso constante
- Antiespumante
- Silicato de Aluminio (SiO₃)
- Ácido sulfúrico al 1.25% m/v (H₂SO₄)
- Hidróxido de sodio al 1.25% m/v (NaOH)
- Alcohol etílico (etOH)

Se pesó la muestra seca y desengrasada resultante de las determinaciones de humedad y extracto etéreo, se pasó cuantitativamente a los vasos de Berzelius a los que se les agregó 0.5 g de silicato de aluminio y perlas de ebullición. Posteriormente se adicionaron 200 ml de H₂SO₄ al 1.25% (m/v) caliente y 3 gotas de antiespumante, se colocó inmediatamente en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente: la mezcla se digirió por 30 min. Transcurrido este tiempo, se vació el contenido sobre un embudo Buchner y se filtró con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aproximadamente 500 ml). Una vez lavado el residuo se transfirió nuevamente al vaso de Berzelius de forma cuantitativa y se adicionaron 200 ml de NaOH al 1.25% (m/v) caliente y 3 gotas de antiespumante, se vuelve a colocar inmediatamente en el aparato LABCONCO para una segunda digestión por 30 min. Se repitió el tipo de filtrado y lavado. Se retiraron las perlas de ebullición lavándolas con agua, para recuperar el material. Por último se adicionaron al residuo 25 ml de etanol. A continuación, se carbonizó el residuo seco en la flama del mechero y se introdujo en la mufla para su incineración. Los crisoles se pesaron periódicamente hasta que alcanzaron peso constante.

Para calcular la cantidad de fibra cruda en la muestra se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ de fibra} = \frac{Ps - Pc}{m} \times 100$$

Donde:

Ps = peso crisol con residuo después del secado (g)

Pc = peso crisol con residuo después de calcinado (g)

m = peso de muestra (g)

7.5.6 Determinación de carbohidratos totales

Las principales mediciones de carbohidratos totales (como se especifica en las tablas de composición de alimentos) son en primer lugar las obtenidas por diferencia y, en segundo lugar, por medición de los componentes individuales que se combinan para proporcionar

una cantidad total. El contenido de proteínas, grasas, cenizas y humedad de un alimento se determina, se resta del peso total de la muestra y la diferencia obtenida se considera que corresponde a la cantidad de carbohidratos presentes. En la cifra por diferencia se incluye un número de componentes distintos de los carbohidratos, tales como lignina, ácidos orgánicos, taninos, ceras. La desventaja de este método radica en que además de este error, combina los errores analíticos de los otros análisis (FAO/OMS, 1997).

Para calcular la cantidad de carbohidratos totales en la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de carbohidratos totales} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lípidos})$$

8. Resultados

8.1 Aislamiento e identificación de cumarinas

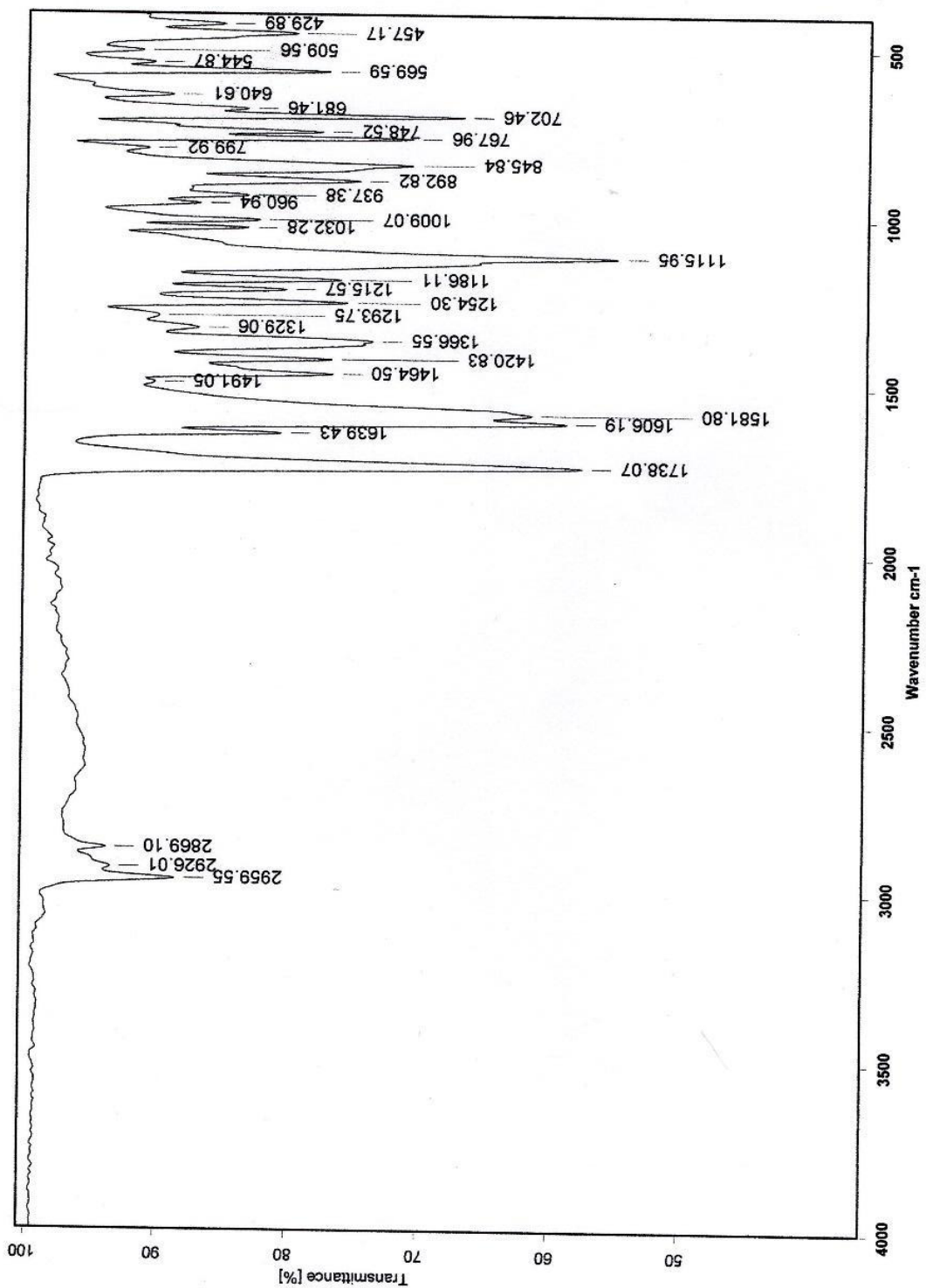
De las fracciones 29 a la 37 (grupos II y III) obtenidas del fraccionamiento mediante una columna cromatográfica del extracto obtenido de la cáscara del fruto de *Mammea americana* se obtuvieron 0.0284 g de cristales color amarillo, que presentó un rango de punto de fusión de 145-146 °C. Este compuesto se identificó y caracterizó como mameigina. Su estructura se determinó mediante el uso de técnicas espectroscópicas (IR, RMN 1H), y espectrométricas (EM), así como difracción de rayos X.

8.1.1 Espectroscopia infrarroja

En la Figura 11, se presenta el espectro de IR en el que se puede observar la frecuencia (cm^{-1}) a la que vibran los enlaces de los diferentes grupos funcionales que posee la molécula aislada debido a la absorción de la energía infrarroja. En la Tabla 6, se condensan estos resultados.

Tabla 6. Espectroscopia infrarroja

Grupo Funcional	Tipo de Vibración	Frecuencia (cm^{-1})
Carbonilo	Estiramiento	1738.07
Vinilo	Estiramiento	1639.43
Metilo	Torsión asimétrica	1464.50
Metilenos	Estiramiento asimétrico	2926.01
Isoprenilo	Estiramiento	1366.55
Éter	Estiramiento asimétrico	1115.95



C:\Infrarrojo\AIR-LEP-IQJUI-004_14\1963.0 Dr.R.Reyes MAF+F2 KBr/Pastilla RPM 03/06/2014

Figura 11. Espectro de IR de la mameigina.

8.1.2 Resonancia magnética nuclear ^1H (RMN ^1H , 300 MHz)

Para ayudar a elucidar la estructura molecular del compuesto aislado, se realizó un estudio de Resonancia magnética nuclear. El espectro de RMN ^1H da a conocer el número y tipo de protones que se encuentran en ambientes diferentes presentes en la molécula. En la Figura 12 se presenta el espectro de *RMN ^1H* . En este espectro se observan diez señales que integran para 24 protones. En la Tabla 7, se muestran los resultados del desplazamiento químico de las señales (δ ppm), la multiplicidad de la señal, constantes de acoplamiento J (Hz), así como la integración para el número de protones equivalentes y la comparación con lo reportado en la bibliografía (Crombie y Games, 1967).

Tabla 7. Resonancia magnética nuclear ^1H (RMN ^1H , 300 MHz)

Resultados Experimentales					Crombie y Games, 1967
δ (ppm)	Multiplicidad	J	H⁺	Tipo de protón	δ (ppm)
14.67	Singulete		1	OH ⁻	14.75
7.40	Multiplete		3	Ar	7.36
7.31	Multiplete		2	Ar	-----
6.89	Doblete	12	1	H ⁺	6.6
5.98	Doblete		1	H ⁺	5.98
5.62	Singulete	9	1	H ⁺	5.59
2.96	Doblete	6	2	H ⁺	2.93
2.23	Multiplete		1	H ⁺	2.0
1.57	Singulete		6	CH ₃	1.24
0.96	Doblete	6	6	CH ₃	0.93

*J: constante de acoplamiento (Hz)

• H⁺: Integración

0842_apg_14/1H
U.N.A.M. Instituto de Química, apg
Dr. Ricardo Reyes / Brenda Hernandez
Clave: MA FI F2
Disolvente: CDCl3
Experimento 1H
Bruker Avance 300 MHz
23-04-2014
No. Reg. 0842

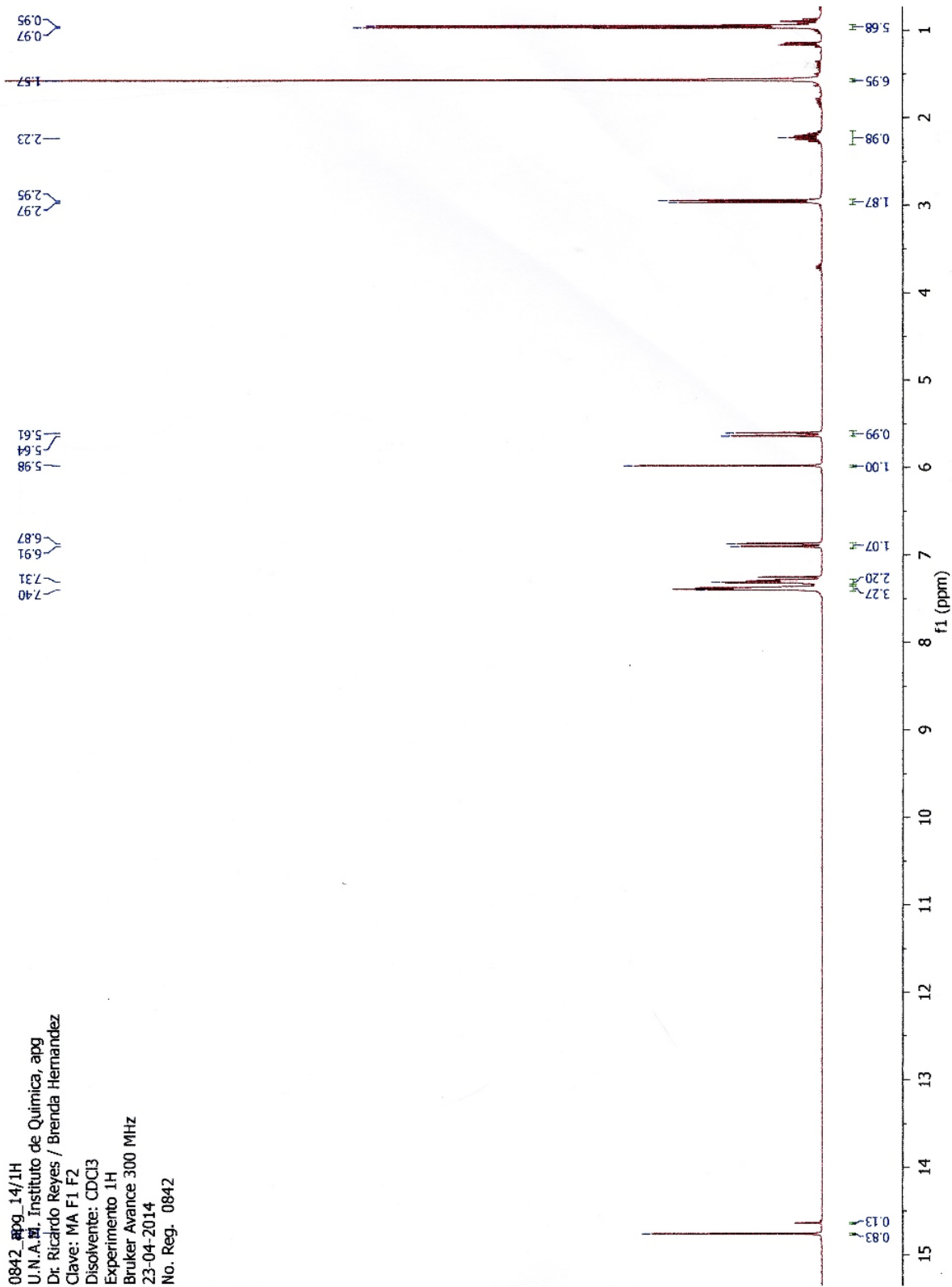


Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹H del compuesto aislado.

8.1.3 Espectrometría de masas (HRMS)

Se realizó un estudio de Espectrometría de masas del compuesto aislado para determinar su peso molecular y ayudar en la elucidación de la estructura molecular (Plascencia, 2003). El espectro obtenido arroja información sobre la abundancia de los diferentes tipos de iones presentes en la molécula en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos. En la Figura 13, se presenta el espectro de masas obtenido, con el cual se determinó que el compuesto aislado tiene una masa de 404.1333 UMA.

Experiment Title: -

Acq. Data Name: 1021 MAF1F2

Creation Parameters: Average(MS[1] Time:0.23..0.32)

Comment: Dr. Reyes Ricardo

x10³ Intensity (239130)

Experiment Date/Time: 5/13/2014 6:26:48 PM

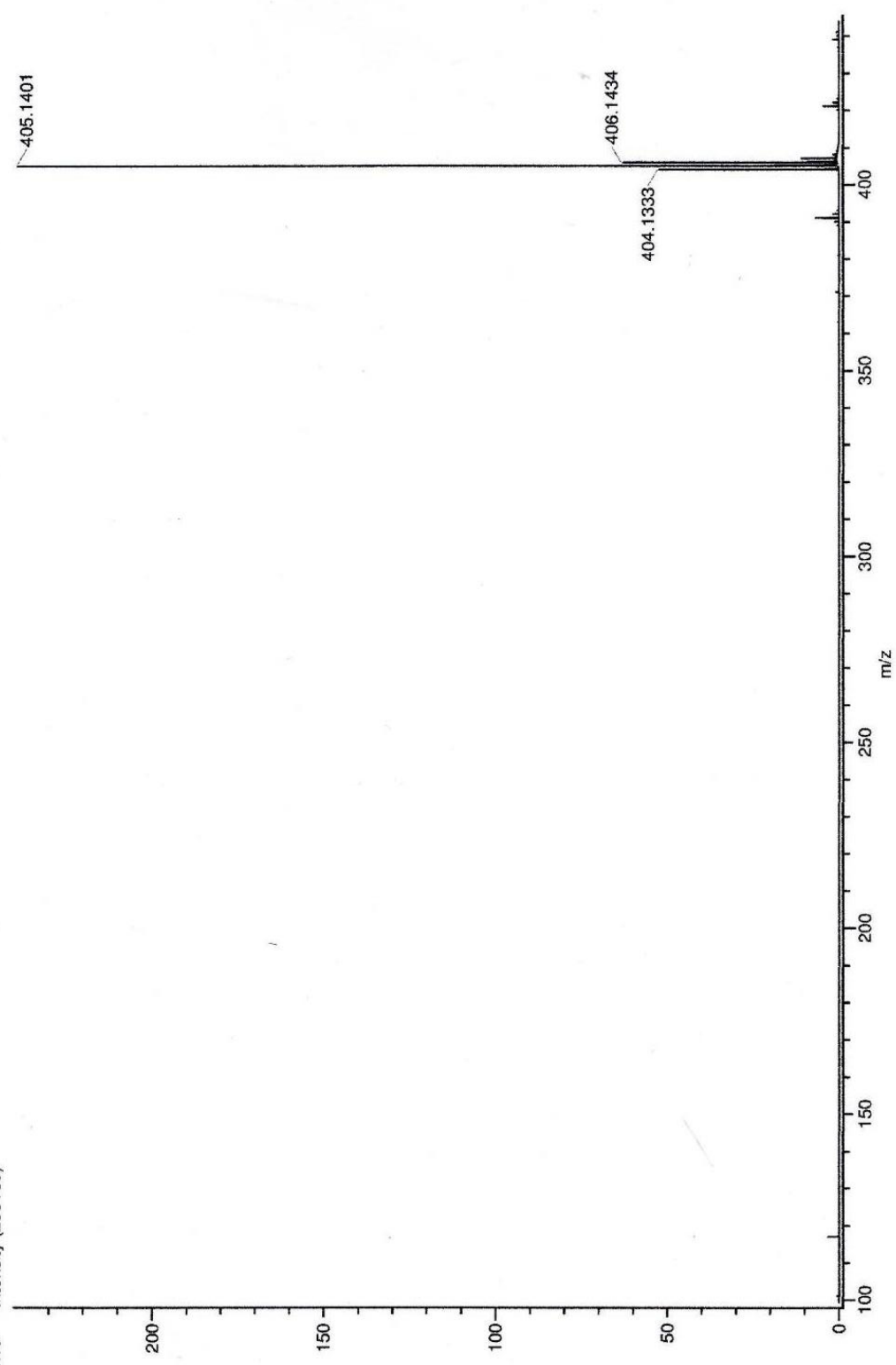


Figura 13. Espectro de masas del compuesto aislado. El patrón de fragmentación corresponde al peso Molecular de la mameigina

Una vez teniendo estos espectros de identificación y caracterización para el compuesto y después de comparar estos resultados experimentales con lo reportado previamente en la literatura (Crombie y Games, 1967; Nagem y Silva, 1988; Doriguetto *et al.*, 2006) se determinó que la estructura del compuesto corresponde a la mameigina, también llamada mammea A/AA ciclo D o 5-hidroxi-8,8-dimetil-6-(3-metilbutanoil)-4-fenilpirano[2,3-h]croman-2-ona.

8.1.4 Difracción de rayos X

Para confirmar que la identidad del compuesto que se aisló corresponde a la mameigina, se decidió hacer un ensayo de difracción de rayos X. La cristalografía de rayos X proporciona una imagen más adecuada de las estructuras cristalinas. En la Figura 14, se muestra la estructura molecular obtenida de dicho ensayo.

Formula:	C ₂₅ H ₂₄ O ₅					
Compound Name:	5-Hydroxy-8,8-dimethyl-6-(3-methylbutanoyl)-4-phenyl-2H,8H-pyrano(2,3-f)chromen-2-one					
Synonym:	Mammeigin					
Space Group:	Cc	Cell:	a 16.727(1)	b 14.152(1)	c 8.718(1)	
Space Group No.:	9	(A,°)	α 90.00	β 90.79(1)	γ 90.00	
R-Factor (%) :	4.36	Temperature(K) :	150	Density(g/cm³) :	1.302	

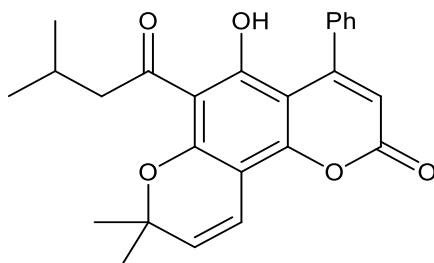


Figura 14. Estructura molecular de la mameigina obtenida por difracción de rayos X.

8.2 Evaluación farmacológica

Después de realizar los ensayos de caracterización e identificación, se continuó con la evaluación farmacológica de la mameigina. Dichos estudios incluyeron ensayo de

citotoxicidad frente a líneas tumorales humanas *in vitro* y la evaluación de la actividad inhibitoria de la transcriptasa reversa del VIH-1.

8.2.2 Ensayo de citotoxicidad

8.2.2.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de la mameigina

Para evaluar la citotoxicidad de la mameigina sobre las distintas líneas celulares se realizó un ensayo de reducción de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio).

Al efectuar este ensayo, no fue posible determinar los valores de CI₅₀ de la mameigina sobre las líneas celulares humanas K-562, HaCaT, SW-620, MCF-7, SKLU-1 y HeLa debido a que la cumarina no indujo una disminución considerable de la viabilidad de las líneas celulares. A manera de ejemplo, en la Figura 15, se muestra una gráfica representativa de la viabilidad que presentó la línea celular K-562 en función de la concentración del compuesto, donde se puede observar que la cumarina no causó una disminución de la viabilidad por debajo de un 80% a dicha línea celular.

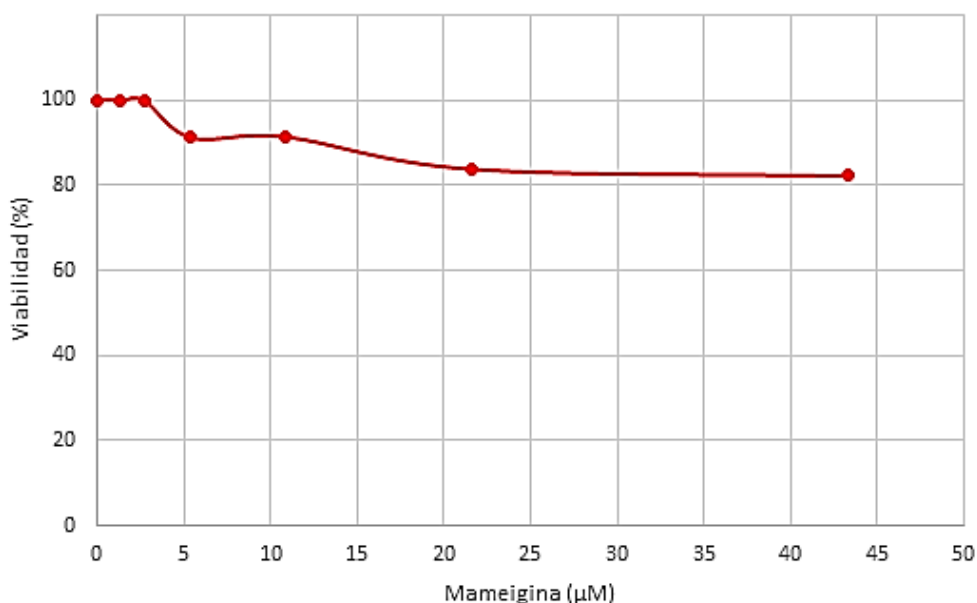


Figura 15. Viabilidad de células K-562 tratadas con mameigina. La mameigina no afectó considerablemente la viabilidad de las células expuestas durante 48 h.

8.2.2.2 Efecto de la mameigina sobre la línea celular HeLa

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón HeLa tratada con mameigina se observó bajo microscopía óptica (Figura 16), esperando observar cambios producidos en la morfología de las células. Sin embargo, se puede notar que la mameigina no produce cambios morfológicos en las células al ser evaluada a 10 μM y 40 μM y a 48 h de exposición. No obstante, se observa que la mameigina precipita en el medio de cultivo y forma cristales desde una concentración de 20 μM . Este inconveniente en la solubilidad fue la limitante por la cual no se pudo determinar el valor de CI_{50} de la mameigina sobre las distintas líneas celulares.

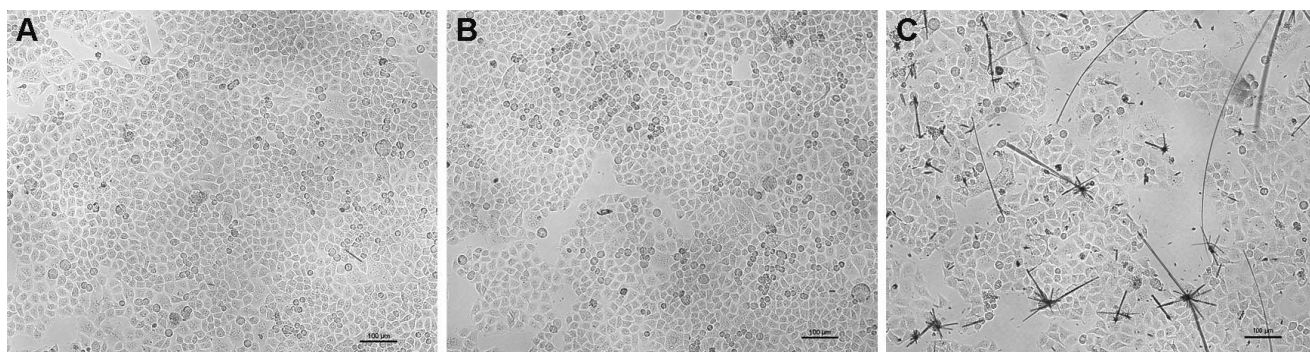


Figura 16. Efecto de la mameigina sobre la línea celular HeLa. La microscopía óptica indica que no hay cambio morfológicos debidos al tratamiento a las 48 h. Sin embargo, se observa que el compuesto precipita. a) línea celular sin tratar, b) mameigina (10 μM), c) mameigina (40 μM).

8.2.2.3 Determinación de la Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del soulatrólido

Al no poder determinar los valores de CI_{50} de la mameigina sobre las diferentes líneas celulares se decidió evaluar la cumarina soulatrólido en las mismas líneas tumorales probadas antes; ya que el soulatrólido se encuentra presente en especies pertenecientes a la misma familia de plantas (Clusiaceae) de donde fue aislada la mameigina. Además de que se ha observado con anterioridad que el soulatrólido no presenta problemas de solubilidad en el medio de cultivo ni en el vehículo utilizado. El soulatrólido que se evaluó fue aislado de *Calophyllum brasiliense* por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa en el Instituto de Química de la UNAM.

De forma gráfica se puede observar la disminución de la viabilidad que presentan las líneas celulares humanas SW-620 y HeLa en función de la concentración de soulatrólido. Se puede observar que los valores de viabilidad celular en ambos casos disminuye por debajo del 50% (Figura 17 y 18).

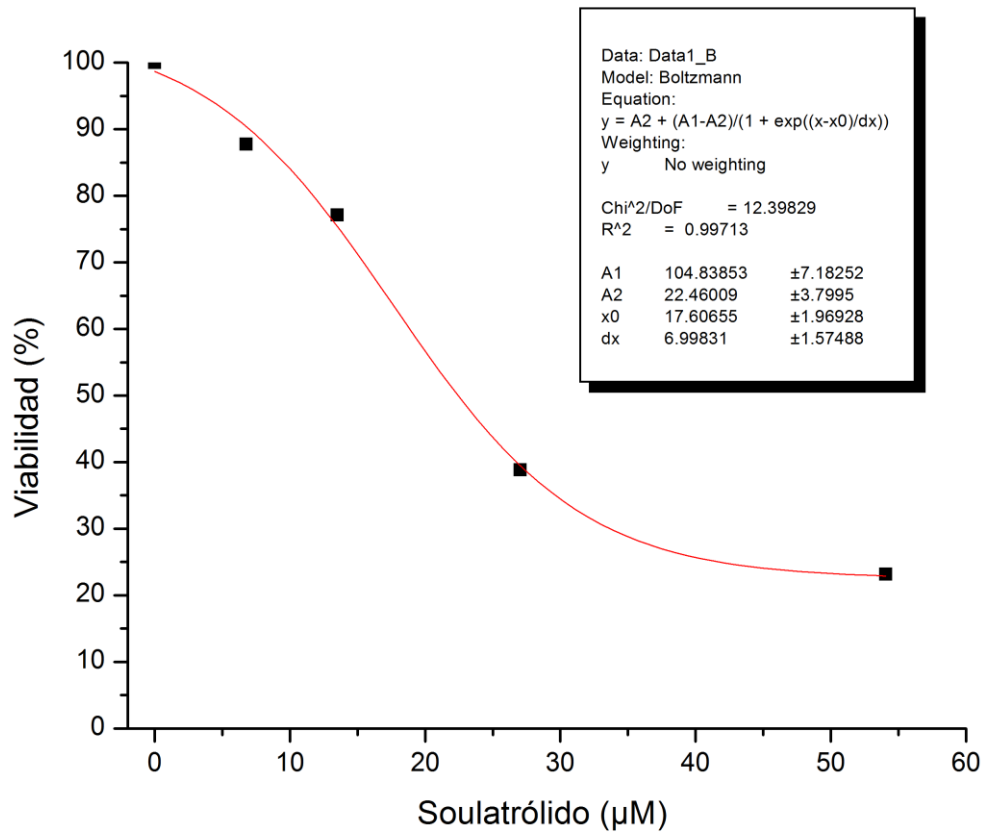


Figura 17. Viabilidad de la línea celular SW-620 tratada con soulatrólido a diferentes concentraciones durante 48 h.

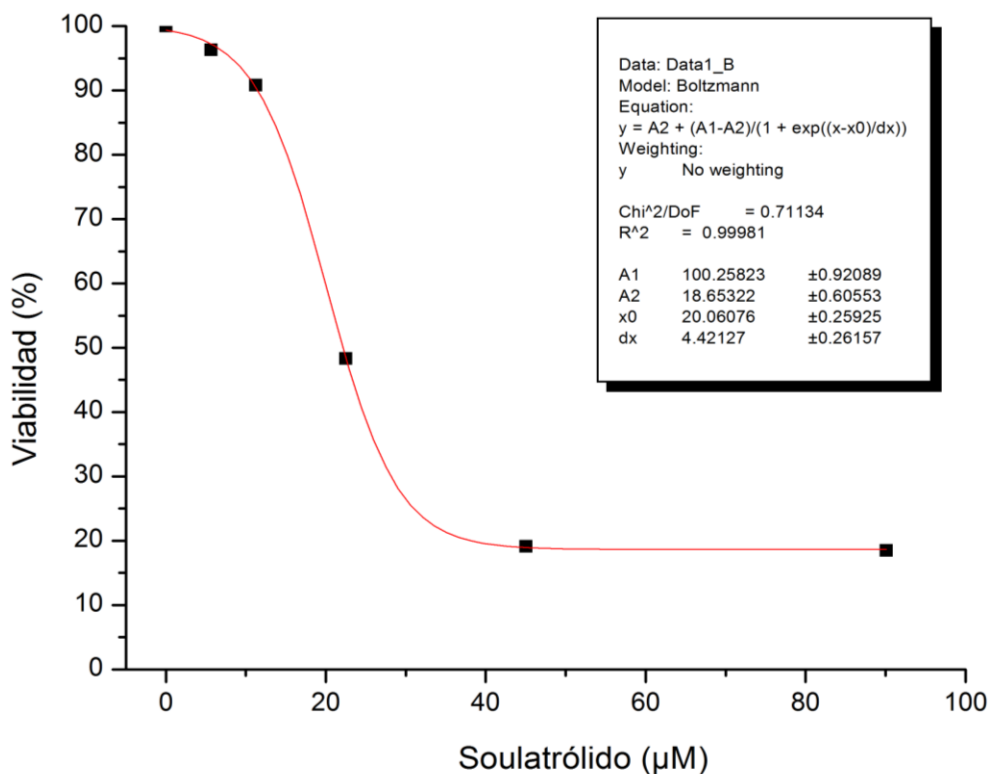


Figura 18. Viabilidad de la línea celular HeLa tratada con soulatrólido a diferentes concentraciones durante 48 h.

A partir de las curvas de viabilidad se hizo un ajuste por regresión no lineal y de la ecuación de la curva de ajuste se calculó el valor de CI_{50} . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores de CI_{50} del soulatrólido al ser evaluado a 48 h.

<i>Línea celular</i>	<i>CI₅₀ (µM)</i>
<i>K-562</i>	26.05 ± 5.03
<i>SW-620</i>	26.75 ± 5.66
<i>SKLU-1</i>	27.49 ± 3.26
<i>HaCaT</i>	30.26 ± 3.70
<i>HeLa</i>	30.73 ± 7.83
<i>MCF-7</i>	37.76 ± 3.72

*Los datos representan la media de los valores obtenidos ($x \pm D.E.$)

8.2.2.4 Efecto del soulatrólido sobre la línea celular HeLa

De igual forma, la línea celular de cáncer cervico-uterino HeLa tratada con soulatrólido se observó bajo microscopía óptica para observar los efectos producidos por la cumarina sobre la morfología celular. En la Figura 19 se puede notar que el soulatrólido induce cambios en la morfología de las células HeLa sugerentes de muerte celular por apoptosis, como la contracción celular y la condensación del citoplasma. La apoptosis se caracteriza también por afectar a células aisladas y no a grupos celulares, como ocurre en la necrosis. En la Figura 19 se puede observar el efecto del soulatrólido sobre la línea celular HeLa, así como el efecto del paclitaxel (control positivo de apoptosis) y el vehículo (DMSO 0.28%) al ser evaluados a 24 y 48 h.

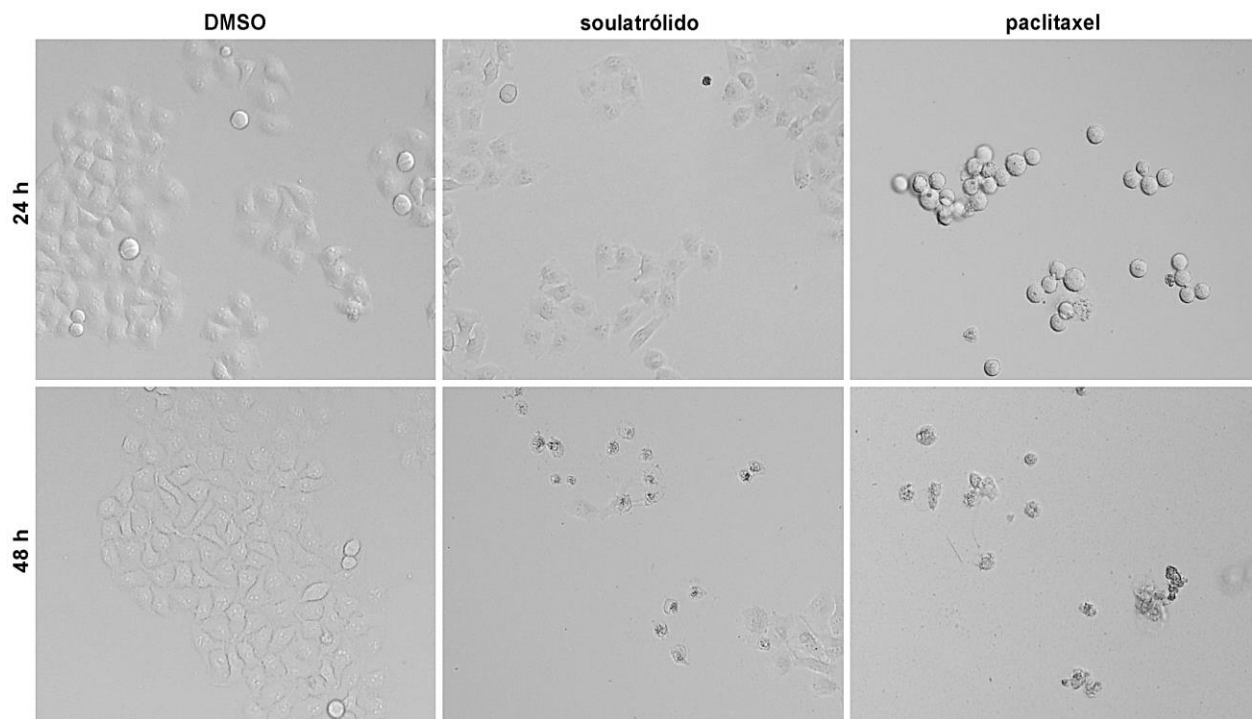


Figura 19. Efecto del soulatrólido sobre la morfología de la línea celular HeLa a diferentes tiempos de exposición. Las imágenes de microscopía óptica muestran cambios morfológicos sugerentes de muerte celular después del tratamiento con soulatrólido y el control positivo (paclitaxel), indicados con las flechas, mientras que el vehículo no afectó la morfología de las células HeLa.

8.2.2.5 Ensayo de TUNEL

Con el fin de observar si el soulatrólido produce muerte celular al inducir fragmentación de ADN sugerente de apoptosis sobre las células HeLa se realizó el ensayo de TUNEL, para lo cual, las células se trataron con soulatrólido, paclitaxel como control positivo de apoptosis y el vehículo DMSO como control negativo a distintos tiempos. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 20, se puede observar que el control negativo no induce fragmentación de ADN a ningún tiempo evaluado mientras que el soulatrólido induce fragmentación del ADN desde las 18 h de exposición (marcaje positivo de la fragmentación del ADN en color rojo) siendo evidente a las 24 h. Como control positivo de fragmentación de ADN se usó paclitaxel, donde se puede observar a las células positivas en color rojo a partir de las 24 h de exposición.

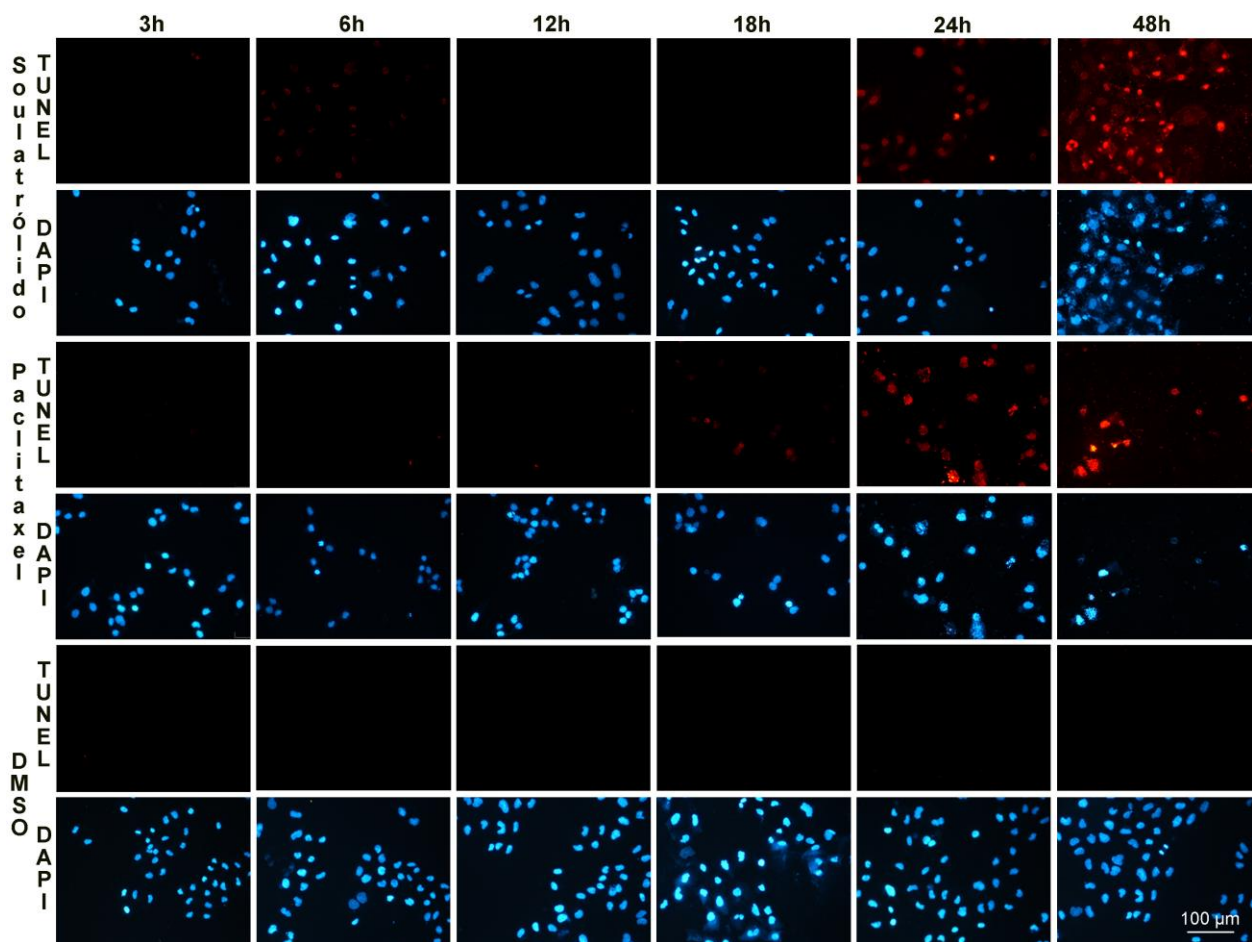


Figura 20. Fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con soulatrólido, paclitaxel (control positivo de apoptosis) y el vehículo DMSO (control negativo), expuestas a distintos tiempos.

8.2.3 Actividad de la mameigina sobre la transcriptasa reversa del VIH-1

La actividad enzimática de la mameigina, se determinó mediante el ensayo colorimétrico Lenti-RT Activity Assays de CaviDi-Tech. La mameigina fue evaluada a una concentración de 50 µg/ml (123.62 µM). Se determinó un 49.43% de inhibición sobre la enzima transcriptasa reversa del VIH-1 usando como vehículo DMSO (0.28% v/v), mientras que el fármaco de referencia Nevirapina (0.001 µM-1 mM) presentó una inhibición del 96%.

8.3 Análisis proximal del fruto de *Mammea americana*

Para determinar la composición en términos nutrimentales de la pulpa del fruto, se realizó el análisis proximal de la pulpa del fruto. A continuación, en la Tabla 9, se condensan los resultados obtenidos.

Tabla 9. Análisis proximal de la pulpa del fruto de *Mammea americana*

Constituyente	g/100g de fruta fresca
Humedad	61.4 ± 0.12
Cenizas	0.6 ± 0.01
Proteína	1.012 ± 0.002
Extracto etéreo	0.62 ± 0.001
Carbohidratos*	31.14 ± 0.11
Fibra cruda	5.24 ± 0.1

*Los datos representan la media ($\bar{x} \pm D.E.$) (n=3)

Proteína cruda= N × 6.25

Carbohidratos totales calculados por diferencia

9. Discusión

9.1 Identificación del compuesto aislado

Se ha reportado que la familia Clusiaceae contiene metabolitos secundarios de tipo cumarina (Xiao-Hui *et al.*, 2008; Cechinel *et al.*, 2009). La fenilcumarina mameigina (o también llamada mammea A/AA ciclo D) ha sido aislada con a partir de extractos de plantas pertenecientes a esta familia anterioridad (Crombie y Games, 1967; Yang *et al.*, 2005). En este proyecto esta cumarina se aisló a partir del fruto de zapote Domingo.

Después de hacer un extracto de la cáscara del fruto de zapote Domingo y de obtener un compuesto aislado por medio de cromatografía en columna, se logró establecer su estructura molecular mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas (IR, RMN ^1H , EM). Inicialmente, la comparación de los espectros obtenidos con estas técnicas con los reportados con anterioridad (Crombie y Games, 1967; Nagem y Silva, 1988; Doriguetto *et al.*, 2006), sugieren que la estructura aislada es la fenilcumarina mammea A/AA ciclo D, también llamada mameigina, ya que es la alternativa que más coincide con los datos reportados de estudio anteriores de entre varias estructuras posibles. Al comparar los resultados obtenidos con los reportados (Figura 21), se puede decir que la estructura del compuesto aislado corresponde a la mameigina. A continuación se muestra la estructura de cristalografía de rayos X de la mameigina.

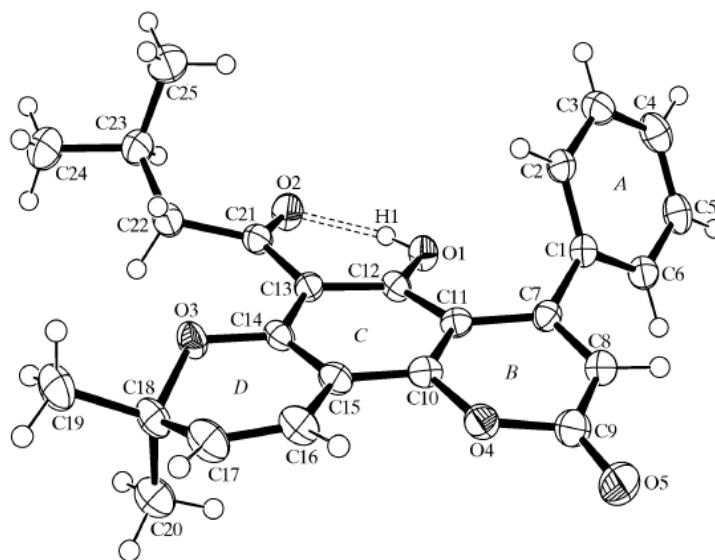


Figura 21. Estructura de rayos X de la mameigina (Doriguetto *et al.*, 2006).

9.2 Ensayo de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* forman parte de las primeras determinaciones que se hacen para saber si un compuesto tiene potencial actividad antitumoral. Para determinar la CI_{50} de la mameigina sobre las distintas líneas celulares se empleó el ensayo de MTT. Sin embargo, no se pudieron determinar dichos valores. Se observó que la mameigina no produce una disminución de la viabilidad por debajo del 50% en las líneas celulares en las que fue evaluada (Figura 15). Esto pudo deberse probablemente a que la mameigina tiene una baja solubilidad, lo que fue corroborado mediante observaciones al microscopio, donde se apreciaron cristales de mameigina a una concentración de 40 μ M como se pudo observar en la microscopía óptica (Figura 16). Lo cual nos impidió alcanzar concentraciones mayores de la mameigina en el cultivo donde pueda ejercer algún efecto biológico. Es necesario tener en cuenta que si durante el ensayo de MTT el producto que se evalúa precipita, los resultados deben de ser descartados (Arencibia *et al.*, 2003).

Es necesario mencionar que aunque la mameigina no presentó actividad biológica relevante en este estudio, se ha encontrado anteriormente que el zapote Domingo contiene más cumarinas con actividad citotóxica contra varias líneas celulares de cáncer y con alto poder antioxidante, como lo son la mammea E/BD, mammea E/BC, mammea E/BA y mammea B/BD hidroxiciclo F, por mencionar algunas (Yang *et al.*, 2005).

Adicionalmente se evaluó la actividad citotóxica del soulatrólido, la cual es una cumarina que ha sido aislada de especies pertenecientes a la misma familia de *Mammea americana*. Se pudo determinar que el soulatrólido afecta la viabilidad celular ocasionando su disminución por debajo del 50% en todas las líneas celulares en las que se probó (Tabla 8). El mayor efecto citotóxico se presentó en la línea celular de leucemia K-562, seguido de línea celular de cáncer de colon SW-620, la línea celular de cáncer de pulmón SKLU-1, la línea celular proveniente de queratinocitos humanos HaCaT, la línea celular de cáncer cérvico-uterino HeLa, y por último, la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los criterios para la evaluación del potencial citotóxico establecidos por el *National Cancer Institute* consideran que extractos vegetales con actividad citotóxica

relevante deben ser aquellos cuyo valor de $CI_{50} < 20 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ y para compuestos puros un valor de $CI_{50} < 4 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (Geran *et al.*, 1972). A pesar de que en este estudio se determinó el valor de CI_{50} del soulatrólido en concentración μM y no se pudo hacer una comparación con los criterios establecidos, estos resultados indican que al presentarse un efecto citotóxico por parte del soulatrólido, éste puede ser investigado más a fondo en estudios moleculares o estudios *in vivo* para conocer su comportamiento. Cabe mencionar que este efecto citotóxico es muy cercano al reportado para el fármaco antineoplásico de uso clínico cisplatino ($CI_{50} = 15.62 \pm 0.48 \mu\text{M}$ en células de cáncer cervico-uterino HeLa (González-Sánchez *et al.*, 2012)

Estudios recientes han revelado que las cumarinas afectan a las células de distintas formas: interfieren con la función de los microtúbulos del huso mitótico, disminuyen la actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), bloquean el ciclo celular en la fase S o G2/M para interferir con los procesos de división celular, inhiben diferentes proteínas cinasas, modulan señalizaciones, entre otras (Wu *et al.*, 2009).

En la microscopía de campo claro de la línea celular HeLa tratada con soulatrólido se pueden observar algunos cambios en la morfología de las células, sugiriendo que esta cumarina induce muerte celular (Figura 19). Sin embargo, para observar cambios celulares como lo son cambios en la mitocondria o retículo endoplásmico debidos a la apoptosis es necesario analizar a las células con microscopía electrónica.

9.3 Ensayo TUNEL

Como se mencionó anteriormente, la muerte celular por apoptosis ha adquirido gran importancia en el área de la oncología, ya que debe haber un equilibrio constante entre muerte y proliferación de las células. Cuando este equilibrio se rompe, se presentan situaciones patológicas como el cáncer.

La detección de éste tipo de muerte celular por medio del ensayo de TUNEL se llevó a cabo para detectar si el soulatrólido induce fragmentación al ADN sugerente de apoptosis en células HeLa. En La Figura 20 se muestra la microscopía de fluorescencia del ensayo

de TUNEL, donde se puede observar a cada célula individual apoptótica marcada en rojo. Se puede notar que la fragmentación de ADN de las células tratadas con soulatrólido empieza desde las 18 h de exposición y a las 48 h se observa una alta proporción de células positivas al ensayo de TUNEL. Un comportamiento similar se encontró en las células tratadas con paclitaxel, el cual se ha documentado previamente que induce apoptosis en células HeLa (Maldonado *et al.*, 1996). Estos resultados en conjunto con los de microscopía de campo claro nos sugieren que el soulatrólido puede estar ocasionando una muerte de tipo apoptótico en las células Hela.

9.4 Actividad de la mameigina sobre la transcriptasa reversa del VIH-1

Dentro de la familia Clusiaceae hay especies que poseen metabolitos secundarios con alta actividad inhibitoria sobre la transcriptasa reversa del VIH-1 ($\geq 70\%$). De igual forma se han encontrado especies que poseen compuestos con actividad moderada, que van de un 50 a un 70% (Huerta-Reyes *et al.*, 2004). Al evaluar la actividad inhibitoria de la mameigina sobre la transcriptasa reversa del VIH-1, se encontró que dicha actividad es moderada (49.43%) comparado con la inhibición inducida por la Nevirapina (96%). Por lo que, esta cumarina difícilmente puede ser considerada como un producto natural del que se obtenga un fármaco anti-VIH.

9.5 Análisis proximal

El análisis proximal es un protocolo que se realiza en un alimento para conocer su composición. Este protocolo se aplica también para conocer del valor nutritivo de un producto y como un control de calidad para verificar que un alimento cumpla con las especificaciones establecidas (FAO, 1993). En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis proximal de la pulpa del fruto de *Mammea americana* en base húmeda y en la Tabla 10 se muestran los resultados de este análisis y su comparación con los reportados con anterioridad en la literatura. Al hacer la comparación de los resultados del análisis entre lo reportado previamente y lo obtenido, los datos se trabajaron en base seca con el fin de evitar errores durante la comparación.

Tabla 10. Comparación del análisis proximal entre lo reportado previamente y lo obtenido

Constituyente	Reportado*	Obtenido*
Cenizas	1.17-2.0	1.55
Proteínas	0.60-3.24	2.59
Lípidos	1.03-6.82	1.606
Fibra cruda	5.51-7.38	20.725
Carbohidratos totales	79.45-87.9	80.67

* g/100 g de base seca

De esta comparación se observa que los resultados de este estudio coinciden con lo reportado previamente en cuanto al contenido de humedad, proteínas, lípidos y carbohidratos totales. Se contempla también que, como era de esperarse por tratarse de una fruta, el agua es el componente mayoritario y que el contenido de proteínas y lípidos es bajo al igual que en las verduras y hortalizas. Se puede notar que los resultados comparados no coinciden en cuanto al contenido de fibra cruda, presentándose un valor mayor en los resultados de este estudio que en los reportados previamente. Esta diferencia puede deberse al estado de madurez en el que se encontraban las frutas cuando fueron analizadas, a su manejo y a las condiciones climáticas o del suelo donde se cultivaron las especies frutales (Ramulu y Rao, 2003; Figuerola *et al.*, 2005; Pire *et al.*, 2010).

10. Conclusiones

En este estudio se logró aislar e identificar al metabolito secundario de tipo cumarina mameigina, del fruto *Mammea americana*.

La cumarina soulatrólido posee actividad citotóxica relevante *in vitro* sobre las líneas celulares en las que se evaluó, ya que presenta valores de CI_{50} por debajo de 50 μM , lo que convierte al soulatrólido en una molécula interesante para evaluar como posible fármaco para tratar el cáncer.

Los resultados del ensayo de TUNEL sugieren que el soulatrólido provoca apoptosis en las células HeLa de cáncer cervico-uterino.

Los resultados indican que la cumarina mameigina inhibe a la enzima transcriptasa reversa del VIH-I, no obstante su actividad es moderada. Por otro lado, no fue posible determinar su actividad citotóxica debido a su baja solubilidad.

De forma general, los resultados obtenidos del análisis proximal de la pulpa del fruto del zapote Domingo coinciden con lo reportado con anterioridad y son lo esperado para este tipo de alimentos. Adicionalmente, es importante considerar que las variaciones en los resultados dependen del estado de madurez de la fruta, condiciones climáticas de cultivo, entre otras.

11. Bibliografía

- [1] AACC (2000). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists*. St. Paul MN, USA, The Association.
- [2] Alfaro ME, García, C. C., Dueñas, G. A. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología* 2000, **46**(4); 275-280.
- [3] Alonso-Castro AJ, Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology* 2011, **133**; 945-972.
- [4] AOAC (1995). *Official methods of analysis*. Washington DC, USA, Association of Official Analytical Chemists.
- [5] Arencibia AD, Rosario, F. L., Curveco, S. D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *RETEL* 2003; 40-52.
- [6] Badui S (2006). *Química de los alimentos*. México, Pearson
- [7] Bello GJ (2000). *Ciencia Bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Madrid, España, Ediciones Díaz Santos.
- [8] Cechinel FV, Meyre-Silva, C., Niero, R. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* 2009, **6**(3); 313-327.
- [9] Coffin J, Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., Weiss, R. Human immunodeficiency viruses. *Science* 1986, **232**; 697.
- [10] Coffin JM. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995, **267**; 483-489.
- [11] CONABIO. (2016). "*Calophyllum brasiliense*." Consultado el 3 de marzo de 2016, en http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf.
- [12] Córdova-Villalobos JA, Barriguete-Meléndez, J., Lara-Esqueda, A., Barquera, S., Rosas-Peralta, M., Hernández-Ávila, M., León-May, M. Eugenia., Aguilar-Salinas, C. A. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Pública de México* 2008, **50**; 419-427.
- [13] Crombie L. Extractives of *Mammea americana* L. Part IV. Identification of new 7,8-annulated relatives of the coumarins *Mammea* A/AA, A/AB, B/AA, B/AB, & new numbers of the 6-acyl family A/BB, B/AB & B/AC. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1972, **18**; 2248-2254.
- [14] Crombie L, Games, D. E. Extractives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-phenylcoumarins. Isolation and structure of mammea B/AA, A/A cyclo D, A/BA, A/AB and A/BB. *Journal of the Chemical Society C: Organic* 1967, **1967**; 2553-2559.
- [15] Dalglish AG, Beverly, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., Weiss, R. A. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984, **312**; 763-767.
- [16] De Clercq E (1993). Anti-HIV agents interfering with the initial stages of the HIV replicative cycle. *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. Holanda, Morrow WJW, Haigwood NL (Eds): 267-292.
- [17] De Clercq E. Perspectives of non-nucleo-side reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Farmaco* 1999, **54**; 26-45.
- [18] De Rosso VV, Mercadante, A. Z. . Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits,. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, **55**; 5062-5072.

- [19] Dharmaratne HR, Tan, G. T., Marasinghe, G. P., Pezzuto, J. M. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by Calophyllum coumarins and xanthenes. *Planta Medica* 2002, **68**(1).
- [20] Doriguetto AC, Ellena, J., Dos Santos, M. H., Moreira, M. E. C., Nagem, T. J. Mammeigin. *Acta Crystallographica Section C* 2006, **62**; 350-352.
- [21] Erdman JW, Macdonald, I. A., Zeisel, S. H. (2012). *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, D.C., Willey Blackwell.
- [22] Evan G, Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science* 1998, **281**; 1317-1322.
- [23] Evans LA, Levy, J. A. (1993). The heterogeneity and pathogenicity of HIV. *HIV. Molecular Organization, Pathogenicity and Treatment*. H. N. Morrow WJW. Holanda: 29-74.
- [24] FAO. (1993). "Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos." Consultado el 21 de septiembre de 2015, en <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB489S/AB489S00.htm#TOC>.
- [25] FAO. (2016). "Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos." Consultado el 8 de enero de 2016, en <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm>.
- [26] FAO/OMS (1997). *Los carbohidratos en la nutrición humana: informe de consulta mixta FAO/OMS de expertos*. Roma, Italia, FAO.
- [27] Figuerola F, Hurtado, M., Estévez, A., Chiffelle, I., Asenjo, F. . Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* 2005, **91**; 395-401.
- [28] Flint SJ, Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R., Skalka, A. M. (2000). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, EEUU, American Society for Microbiology.
- [29] Freed EO, Martin, M. A. (2001). HIVs and Their Replication. *Fields Virology*. Filadelfia, EEUU, Lippincott Williams & Wilkins: 1971-2041.
- [30] García-Zebadúa JC, Reyes-Chilpa, R., Huerta-Reyes, M., Castillo-Arellano, J. I., Santillán-Hernández, S., Vázquez-Astudillo, B., Mendoza-Espinoza, J. A. El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica *Vitae* 2014, **21**(2); 126-145.
- [31] García Zebadúa JC (2012). Caracterización química y actividad antiviral (VIH-1) de *Calophyllum brasiliense* del Estado de Chiapas, México. *Instituto de Biología*. México, D. F., UNAM. **Doctorado en Ciencias**: 28-32.
- [32] Gavrieli Y, Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. . Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992, **119**; 490-501.
- [33] Geran RI, Greenberg, H. M., McDonald, M., Abbott, B. J. . Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports* 1972, **33**; 1-17.
- [34] Germosén-Robineau L (2005). *Farmacopea Vegetal Caribeña*. Rep. Dominicana, Editorial Universitaria.
- [35] Godoy HT, Rodriguez-Amaya, D. B. Occurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994, **42**; 1306-1313.
- [36] Goff SP (2001). Retroviridae: the Retroviruses and their replication. *Fields Virology*. H. P. Knipe DM. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1987-1939.
- [37] Gomez-Verjan JC, Estrella-Parra, E. A., Gonzalez-Sanchez, I., Rivero-Segura, N. A., Vazquez-Martinez, R., Magos-Guerrero, G., D. Mendoza-Villanueva, D., Cerbón-Cervantes, M. A. Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics Data* 2015, **6**; 258-259.
- [38] Gonzalez-Sanchez I, Lira-Rocha A, Navarrete A, Loza-Mejia MA, Coronel-Cruz C, Mendoza-Rodriguez CA, Cerbon MA. Synergistic anticancer activity of Thiazolo[5,4-

- b]quinoline derivative D3CLP in combination with cisplatin in human cervical cancer cells. *Anticancer Res* 2012, **32**(12); 5159-5165.
- [39] Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical & Translational Oncology Journal* 2007, **9**(12); 767-776.
- [40] Grainge M, Ahmed, S. (1988). *Handbook of plants with pest-control properties*. New York, USA John Willey & Sons.
- [41] Granados GM, Arrieta, R. O., Cantú de León, D. (2013). *Oncología y cirugía. Bases y principios*, Editorial El Manual Moderno.
- [42] Grasl-Kraupp B, Ruttikay-Nedecky, B., Koudelka, H., Bukowska, K., Bursch, W., Schulte-Hermann, R. . In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995, **21**; 1465-1468.
- [43] Greenfield H, Southgate, D. (2006). Examen de los métodos de análisis. *Datos de composición de alimentos*. FAO. Roma, FAO: 108-162.
- [44] Hanahan D, Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell Press* 2011, **144**(5); 646-674.
- [45] Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of Postgraduate Medicine* 2004, **50**; 145-149.
- [46] Henneberg W, Stohmann, F. (1860-1864). Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer I & II. Braunschweig. .
- [47] Hernández TF (2007). Identificación de compuestos de plantas mexicanas (Clusiaceae) y evaluación de posibles propiedades anticancerígenas. *Facultad de Ciencias Básicas, Ingeniería y Tecnología*. Apizaco, Tlaxcala, Universidad Autónoma de Tlaxcala. **Licenciatura en Química Industrial: 60**.
- [48] Holian A, Hamilton, R. F., Morandi, M. T., Brown, S. D., Li, L. . Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 1998, **106**; 127-132.
- [49] Huerta-Reyes M, Basualdo, M. C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. *Biol Pharm Bull* 2004, **27**(9); 1471-1475.
- [50] Huerta-Reyes M, Basualdo, M. C., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., Reyes-Chilpa, R. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biol Pharm Bull* 2004a, **27**; 916-920.
- [51] Hupfeld J, Efferth, T. . Drug resistance of human immunodeficiency virus and overcoming it by natural products. *In vivo* 2009, **23**; 1-6.
- [52] INEGI. (2016). "Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido." Consultado el 20 de junio de 2016, en <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>.
- [53] Ishikawa T. Anti HIV-1 active *Calophyllum* coumarins: distribution, chemistry and activity. *Heterocycles* 2009, **53**(2); 453-473.
- [54] Iturbe Chiñas AF, Sandoval Guillén, B. J. (2007). *Fundamentos y Técnicas de Análisis de los Alimentos*, Facultad de Química, UNAM.
- [55] Kashman Y, Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., Currens, M.J., Buckheit, R. W., Hughes, S.H., Cragg, G. M., Boyd, M. R. The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry* 1992, **35**(15); 2735-2743.
- [56] Kerr JF, Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 1972, **26**(4); 239-257.
- [57] Kilby J, Hopkins, S., Venetta, T., DiMassimo, B., Cloud, G., Lee, J., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M., Nowak, M., Shaw, G., Saag,

- M. Nature, Med. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41 mediated virus entry. *Nature Medicine* 1998, **4**; 1302-1307.
- [58] Kimura SI, C., Jyoko, N., Segawa, H., Kuroda, J., Okada, M., Adachi, S., Nakahata, T., Yuasa, T., Filho, V. C., Furukawa, H., Maekawa, T. Inhibition of Leukemic Cell Growth by a Novel Anti-Cancer Drug (GUT-70) from *Calophyllum Brasiliense* that Acts by Induction of Apoptosis. *International Journal of Cancer* 2004, **113**; 158-165.
- [59] Levy JA, Kaminsky, L. S., Morrow, W. J., Steimer, K., Luciw, P., Dina, D., Hoxie, J., Oshiro, L. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical, biological and molecular features. *Annals of Internal Medicine* 1985, **103**; 694-699.
- [60] Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2003, **78**; 517-520.
- [61] Mahan KL, Escott-Stump, S., Raymond, J. L. (2013). *Krause Dietoterapia*. España, Elsevier.
- [62] Maldonado V, De Anda, J., Meléndez-Zajjla, J. Paclitaxel-induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 1996, **11**(4); 183-188.
- [63] Markowitz M, Morales-Ramírez, J., Nguyen, B., Kovacs, C., Steigbigel, R., Cooper, D., Liporace, R., Schwartz, R., Isaacs, R., Gilde, L., Wenning, L., Zhao, J., Teppler, H. . Antiretroviral activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-0518, a novel inhibitor of HIV-1 integrase, dosed as monotherapy for 10 days in treatment-naive HIV-1-infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2006, **43**; 507-508.
- [64] Matern U, Luer, P., Kreisch, D. (1999). *Biosynthesis of Coumarin*, Elsevier.
- [65] Meléndez PA, Capriles, V. A. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2002, **96**(2); 209-218.
- [66] Milner JA. Diet and cancer: facts and controversies. *Nutrition and Cancer* 2006, **56**; 216-244.
- [67] Mondal S, Bandyopadhyay, S., Ghosh, M. K., Mukhopadhyay, S., Roy, S., Mandal, C. Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2012, **12**; 49-75.
- [68] Morton JF (1987). *Fruits of warm climates*. Miami, USA, Florida Flair Books.
- [69] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, **65**(1-2); 55-66.
- [70] Nagem TJ, e Silva, M. D. A. Xanthonas and phenylcoumarins from *Kielmeyra pumila*. *Phytochemistry* 1988, **27**(9); 2961-2962.
- [71] NIH. (2015). "Cáncer." Consultado el 11 de febrero, 2015, en <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
- [72] NMX-F-090-S-1978 (1978). Determinación de fibra cruda en alimentos. N. mexicanas. México.
- [73] OMS. (2016). "VIH/SIDA." Consultado el 13 de diciembre de 2016, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>.
- [74] OMS. (2017). "Cáncer." Consultado el 5 de marzo de 2017, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- [75] OMS/FAO. (2003). "Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas." Consultado el 21 de enero de 2016, en <http://www.fao.org/3/a-ac911s.pdf>.
- [76] ONU/SIDA. (2016). "Informe de ONU/SIDA 2015 "Cómo el SIDA lo cambió todo"." Consultado el 16 de enero de 2016, en <http://onusidalac.org/1/index.php/america-latina/america-latina>.

- [77] Ordóñez-Santos E, Martínez-Álvarez, G., Vázquez-Riascos, A. Effect of processing on the physicochemical and sensory properties of mammee apple (*Mammea americana* L.) fruit. *Agrociencia* 2014, **48**(4).
- [78] Ouahouo BMW, Azebaze, A. G. B., Meyer, M., Bodo, B., Fomum, Z.T., Nkengfack, A. E. . Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea africana*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2004, **98**; 733-739.
- [79] Park DJ, Patek, P. Q. Detergent and enzyme treatment of apoptotic cells for the observation of DNA fragmentation. *Biotechniques* 1988, **24**; 558-560.
- [80] Pire SMC, Garrido, E., González, H., Pérez, H. . Estudio comparativo del aporte de fibra alimentaria en cuatro tipos de frutas de consumo común en Venezuela. *Interciencia* 2010, **35**(12); 939-944.
- [81] Plank H. Insecticidal properties of mamey and others plants in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology* 1944, **37**; 737.
- [82] Plascencia VG (2003). *Curso de Espectrometría de masas*. Cuernavaca, Morelos, Instituto de Biotecnología, UNAM.
- [83] Ramulu P, Rao, P. . Total, in-soluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 2003, **16**; 667-685.
- [84] Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz, E., Ramírez-Apan, T., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowsky, C., Vázquez-Torres, M. . Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense* *Life Sciences* 2004, **75**; 1635-1647.
- [85] Reyes Chilpa R, Huerta Reyes, M. Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: inhibidores del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1. *Interciencia* 2009, **34**(6); 385-392.
- [86] Riss TL, Moravec R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2013). *Assay Guidance Manual*. C. N. Sittampalam GS, Brimacombe K, et al., editors, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- [87] Rodríguez-Rivera VM, Simón-Magro, E. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. España, Netbiblo.
- [88] Santos-Buelga C, San Feliciano, A. Flavonoids: From Structure to Health Issues. *Molecules* 2017, **22**(3); 6.
- [89] Schwartzman R, Cidlowski, A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993, **14**; 133-151.
- [90] Sing I, Bodiwala, H. Recent advances in anti-HIV natural products. *Natural Products Reports* 2010, **27**; 1781-1800.
- [91] Sukh D, Opende, K. (1997). *Insecticides of natural origin*. Amsterdam, Netherlands, Overseas Publishers Association.
- [92] Thornberry NA, Lazebnik, Y. . Caspases: Enemies within. *Science* 1998, **281**; 1312-1316.
- [93] UNAM IdG. (2015). "Familia Clusiaceae." Consultado el 7 de agosto de 2015, en <http://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/paleo/cevallos/docencia/ppt/familias/clusiaceae.pdf>.
- [94] Van Engeland M, Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture *Cytometry* 1996, **24**; 131-139.
- [95] Wu L, Wang, X., Xu, W., Farzaneh, F., Xu, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Current Medicinal Chemistry* 2009, **16**(32); 4236-4260.
- [96] Xiao-Hui S, Man-Li, Z., Li- Gen, L., Chang-Hong, H., Yu-Cheng, G., Qing-Wen, S. Chemical Constituents of the Plants of the Genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* 2008, **5**.
- [97] Yahia EM, Gutiérrez-Orozco, F. (2010). Mamey apple (*Mammea americana* L.). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. E. M. Yahia. Cambridge, UK, Woodhead Publishing Limited. **3. Coconoa to Mango**: 474-481.

- [98] Yang H, Jiang, B., Reynertson, K. A., Basile, M. J., Kennelly, E. J. . Comparative analyses of bioactive Mammea coumarins from seven parts of *Mammea americana* by HPLC-PDA with LC-MS, . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, **54**; 4114-4120.
- [99] Yang H, Protiva, P., Gil, R., Jiang ,B., Baggett, S., Basile, M.J., Reynertson, K.A., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J. Antioxidant and Cytotoxic Isoprenylated Coumarins from *Mammea americana*. *Planta Medica* 2005, **71**(9); 852-860.
- [100] Yang SS, Cragg, G. M., Newman, D. J., Bader, J. P. . Natural Product-Based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products* 2001, **64**; 265-277.