



**Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo**

**Instituto de Investigaciones Químico
Biológicas**

**Estudio citotóxico de las cumarinas y
bitiofenos naturales y modificados de *Tagetes lucida*
Cav.**

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Jorge Arturo Mejía Barajas

Asesor:

D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco

Morelia, Michoacán. Agosto del 2012

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Productos naturales.....	1
1.2 Cáncer.....	4
1.3 Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>.....	6
1.4 <i>Artemia salina</i>.....	7
1.5 Cultivo celular.....	9
1.6 Cumarinas.....	11
1.7 Tiofenos.....	16
1.8 Modificaciones químicas.....	22
1.9 Luz UV-A.....	24
1.10 Género <i>Tagetes</i>.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	33
3. HIPÓTESIS.....	33
4. OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo general.....	33
4.2 Objetivos particulares.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1 Estrategia experimental.....	35
5.2 Material biológico.....	37
5.2.1 Material vegetal.....	37
5.2.2 <i>A. salina</i>.....	37

5.2.3 Líneas celulares.....	37
5.3 Obtención de extractos.....	38
5.4 Análisis químico.....	39
5.4.1 Rendimiento de los compuestos puros.....	39
5.4.2 Espectrometría de resonancia magnética nuclear.....	40
5.4.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría masas.....	40
5.5 Modificación química.....	41
5.6 Análisis biológico de toxicidad en <i>A. salina</i>	41
5.6.1 Agua de mar.....	41
5.6.2 Bioensayo en <i>A. salina</i>	41
5.7 Análisis biológico de toxicidad en líneas celulares.....	42
5.7.1 Medios de cultivo.....	42
5.7.2 Antibióticos.....	43
5.7.3 Cultivo celular.....	43
5.7.4 Aplicación de UV-A.....	45
5.7.5 Método de MTT.....	46
5.8 Análisis estadístico.....	48
6. RESULTADOS	49
6.1 Obtención de los extractos hexánicos de <i>Tagetes lucida</i>	50
6.2 Obtención de los compuestos mayoritarios de los extractos hexánicos de hoja y raíz de <i>T. lucida</i>	50
6.3 Análisis espectroscópico de los compuestos mayoritarios aislados del extracto hexánico de hoja.....	53
6.3.1. Análisis espectroscópico del primer compuesto aislado	

del extracto hexánico de hoja.....	53
6.3.2. Análisis espectroscópico del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de hoja.....	59
6.3.3. Análisis espectroscópico del primer compuesto aislado del extracto hexánico de raíz.....	66
6.3.4. Análisis espectroscópico del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de raíz.....	73
6.3.5. Parte experimental.....	80
6.3.5.1. Purificación e identificación de las cumarinas aisladas del extracto hexánico de hoja.....	80
6.3.5.2. Purificación e identificación de los bitiofenos aislados del extracto hexánico de raíz.....	81
6.3.6. Rendimiento de los extractos hexánicos de hoja y raíz de <i>T. lucida</i>.....	83
6.3.7. Modificación química de las cumarinas y bitiofenos mayoritarios de los extractos hexánicos de hoja y raíz de <i>T. lucida</i>.....	83
6.3.7.1. Obtención de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	83
6.3.7.2. Obtención de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.....	84
6.3.7.3. Obtención de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina..	84
6.3.7.4. Obtención del 5-butil-2,2'-bitiofeno.....	84
6.3.8. Análisis espectroscópico de las cumarinas modificadas químicamente.....	85
6.3.8.1. Análisis espectroscópico de la primer cumarina modificada químicamente.....	85
6.3.8.2. Análisis espectroscópico de la segunda cumarina modificada químicamente.....	90
6.3.8.3. Análisis espectroscópico de la cumarina obtenida de la clorometilación de la 6,7-dimetoxi cumarina.....	97
6.3.9. Análisis espectroscópico del producto de la reducción del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2, 2'-bitiofeno.....	98

6.4. Parte experimental.....	102
6.4.1. Identificación de las cumarinas modificadas químicamente.....	102
6.4.2. Identificación del bitiofeno modificado químicamente.....	103
6.4.3. Actividad citotóxica de las cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i> y modificadas químicamente.....	104
6.4.4. Actividad citotóxica de las cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i>	104
6.4.5. Actividad citotóxica de los bitiofenos aislados de <i>T. lucida</i> y modificados químicamente.....	109
6.4.6. Actividad citotóxica de los bitiofenos aislados <i>T. lucida</i>	109
6.4.7. Actividad citotóxica del bitiofeno modificado químicamente.....	111
6.4.8. Actividad citotóxica en presencia de luz UV-A.....	113
6.4.9. Efecto citotóxico de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente en presencia de luz UV-A.....	113
6.4.10. Efecto citotóxico de los bitiofenos aislados y modificados químicamente en presencia de luz UV-A.....	113
6.4.11. Actividad tóxica en <i>A. salina</i> de las cumarinas y bitiofenos aislados de <i>T. lucida</i> y modificados químicamente	114
6.4.12. Actividad tóxica en <i>A. salina</i> de las cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i>	114
6.4.13. Actividad tóxica en <i>A. salina</i> de las cumarinas modificadas químicamente.....	115
6.4.14. Actividad tóxica de los bitiofenos mayoritarios purificados de <i>T. lucida</i>	116
6.4.15. Actividad tóxica del bitiofeno modificado químicamente.....	117
6.4.16. Análisis estructura-actividad de las cumarinas y bitiofenos aislados de <i>T. lucida</i> y modificados químicamente.....	118

6.4.17. Análisis estructura-actividad de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente.....	118
6.4.18. Análisis estructura-actividad de los bitiofenos aislados y modificados químicamente.....	119
7. DISCUSIÓN.....	120
8. CONCLUSIÓN.....	132
9. BIBLIOGRAFÍA.....	133

INDICE DE FIGURAS

1. Principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial.....	4
2. Estructura del esqueleto de las cumarinas	11
3. Estructura de la Warfarina.....	13
4. Cumarinas aisladas del extracto metanólico de <i>Hedyotis biflora</i>	15
5. Ejemplos de tiofenos con actividades farmacológicas.....	18
6. Interacción molecular obtenida del experimento “Docking” del tiofeno y la enzima superóxido dismutasa.....	19
7. Bitiofenos de <i>Echinops grijissi</i> con el mayor potencial antitumoral...	21
8. Derivados de la morfina.....	22
9. Principales características morfológicas <i>T. lucida</i>	29
10. Estrategia experimental.....	36
11. Ilustración de la raíz y hoja seca de <i>T. lucida</i> utilizadas en la obtención de extractos crudos.....	38
12. Reacción de la reducción del MTT a sal de Formazán.....	46
13. Estructuras de las bases normales de pirimidinas y del 5-fluoruracilo.....	47

14. Cromatograma de gases y espectro de masas del primer compuesto aislado del extracto hexánico de hoja.....	54
15. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 7-metoxi cumarina.....	56
16. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C de la 7-metoxi cumarina.....	58
17. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi cumarina	59
18. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi cumarina.....	60
19. Cromatograma de gases y espectro de masas del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de hoja.....	62
20. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 6,7-dimetoxi cumarina.....	63
21. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C de la 6,7-dimetoxi cumarina.....	64
22. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 6,7-dimetoxi cumarina	65
23. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 6,7-dimetoxi cumarina.....	66
24. Cromatograma de gases y espectro de masas del primer compuesto aislado del extracto hexánico de raíz.....	67
25. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H del 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') – bitiofeno.....	69
26. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C del 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno	70
27. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno	71
28. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') – bitiofeno.....	72

29. Cromatograma de gases y espectro de masas del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de raíz.....	74
30. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H del 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitiofeno.....	76
31. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C del 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitiofeno.....	77
32. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitiofeno.....	78
33. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitiofeno.....	79
34. Cromatograma de gases y espectro de masas de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	86
35. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina	88
36. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	89
37. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	90
38. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina	91
39. Cromatograma de gases y espectro de masas de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.....	93
40. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina	94
41. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹³C de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.....	95
42. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.....	96
43. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina	97
44. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 6,7-	

dimetoxi-3-cloro metil cumarina	99
45. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina.....	100
45. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina	100
46. Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹ H del 5-butiril-2,2'-bitiofeno	101
47. Estructura de las cumarinas y bitiofenos aislados y semi-sintetizados.....	131

ÍNDICE DE CUADROS

1. Medicamentos a base de productos naturales en diferentes etapas de desarrollo.....	1
2. Uso clínico de algunos principios activos aislados de fuente vegetales.....	2
3. 3.Categorías terapéuticas de los fármacos derivados de productos naturales en diferentes etapas de desarrollo.....	2
4. Principales Instituciones que realizan investigación de productos vegetales.....	3
5. Principales causas de mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos en el 2008.....	5
6. Principales mecanismos de acción de algunos fármacos anticancerígenos obtenidos a partir de recursos naturales vegetales.....	6
7. Estudios relacionados con el bioensayo de A. salina.....	9
8. Estudios realizados en líneas celulares tumorales.....	10
9. Trabajos en los que se reporta una actividad citotóxica, antitumoral o anticancerígena de cumarinas.....	13
10. Actividades farmacológicas del α -tertienilo, tiofeno y derivados del tiofeno.....	20

11. Compuestos identificados en el género <i>Tagetes</i> spp.....	26
11. Continuación de compuestos identificados en el género <i>Tagetes</i> spp.....	27
12. Actividades de los compuestos aislados de <i>Tagetes</i> spp.....	28
13. Actividades farmacológicas de <i>T. lucida</i>.....	30
14. Principales compuestos aislados de <i>T. lucida</i> colectada en distintos sitios.....	31
15. Actividad citotóxica de los extractos de <i>T. lucida</i> en líneas celulares cancerosas y <i>A. salina</i>.....	31
16. Cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i> y actividades relacionadas a actividad antitumoral, anticancerígena o citotóxica.....	32
16. Continuación de cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i> y actividades relacionadas a actividad antitumoral, anticancerígena o citotóxica.....	33
17. Rendimiento de la maceración en hexano de la hoja y raíz de <i>T. lucida</i>.....	50
18. Columna del extracto hexánico de hoja para el aislamiento del primer compuesto mayoritario.....	51
19. Columna del extracto hexánico de hoja para el aislamiento del segundo compuesto mayoritario.....	51
20. Columna del extracto hexánico de raíz para el aislamiento del primer compuesto mayoritario.....	52
21. Columna del extracto hexánico de raíz para el aislamiento del segundo compuesto mayoritario.....	52
22. Desplazamiento de ¹³C-RMN a 400MHz de la 7-metoxi cumarina	57
23. Desplazamiento de ¹³C-RMN a 400MHz de la 6,7-dimetoxi cumarina.....	61
24. Desplazamiento de ¹³C-RMN a 400MHz.....	75
25. Primer cumarina mayoritaria aislada del extracto hexánico de hoja de <i>T. lucida</i>.....	80

26. Segunda cumarina mayoritaria aislada del extracto hexánico de hoja de <i>T. lucida</i>.....	81
27. Primer bitiofeno mayoritario del extracto hexánico de raíz de <i>T. lucida</i>.....	82
28. Segundo bitiofeno mayoritario del extracto hexánico de raíz de <i>T. lucida</i>.....	82
29. Rendimiento de los extractos hexánicos de hoja y raíz de <i>T. lucida</i>.....	83
30. Desplazamiento de ¹³C-RMN a 400MHz de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	87
31. Correlación de las señales de los carbonos de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina con sus hidrógenos.....	87
32. 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.....	102
33. 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.....	102
34. 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina.....	103
35. 5-butil-2,2'- bitiofeno.....	103
36. Concentración letal media de citotoxicidad de las cumarinas de <i>T. lucida Cav</i>.....	106
37. Concentración letal media de las cumarinas modificadas químicamente.....	107
38. Concentración letal media del efecto de los bitiofenos aislados de <i>T. lucida Cav</i> y modificado químicamente sobre líneas celulares.....	111
39. Concentración letal media sobre líneas celulares en presencia de luz V-A de las cumarinas y bitiofenos aislados y modificados químicamente.....	114
40. Análisis estructura-actividad de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente.....	119
41. Análisis estructura-actividad de los bitiofenos aislados y modificados químicamente.....	119

INDICE DE GRAFICAS

1. Efecto citotóxico de las cumarinas aisladas de <i>T.lucida</i> sobre las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3.....	105
2. Efecto citotóxico de las cumarinas modificadas sobre las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3.....	108
3. Efecto citotóxico de los bitiofenos aislados de <i>T.lucida</i> sobre las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3.....	110
4. Efecto citotóxico del bitiofeno modificado químicamente sobre las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3.....	112
5. Efecto tóxico sobre <i>A. salina</i> de las cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i> . 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina.....	115
6. Actividad tóxica en <i>A. salina</i> de las cumarinas modificadas químicamente.....	116
7. Actividad tóxica de los bitiofenos mayoritarios purificados de <i>T. lucida</i>	117

1. Introducción

La naturaleza proporciona una gran diversidad de productos y es una importante fuente de nuevas moléculas biológicamente activas para la detección de drogas. Los productos naturales han sido la fuente de la mayoría de los activos ingredientes de los medicamentos y han inspirado el desarrollo molecular, lo que ha llevado a avances en las metodologías sintéticas y la posibilidad de generar compuestos con mejores propiedades farmacológicas. Los compuestos de los productos de origen natural son estructuras moleculares seleccionadas por los procesos evolutivos para interactuar con una amplia variedad de proteínas y otros objetivos biológicos con fines específicos que pueden ayudar a curar o aliviar enfermedades graves. En general son metabolitos secundarios producidos por los organismos en respuesta a algunos estímulos externos tales como infecciones, heridas, sequedad o cambios nutricionales, algunos son utilizados por las plantas para la atracción y protección.

1.1. Productos naturales

Más de 100 compuestos derivados de productos naturales están actualmente sometidos a ensayos clínicos y por lo menos 100 proyectos similares están en desarrollo de preclínica (Cuadro 1). La mayoría son derivados de las plantas y fuentes microbianas (Butler, 2008).

Cuadro 1. Medicamentos a base de productos naturales en diferentes etapas de desarrollo (Butler, 2008)

Fase de desarrollo	Plantas	Bacterias	Hongos	Animal	Semisintético	Total
Preclínica	46	12	7	7	27	99
Fase 1	14	5	0	3	8	30
Fase 2	41	4	0	10	11	66
Fase 3	5	4	0	4	13	26
Pre-registro	2	0	0	0	2	4
Total	108	25	7	24	61	225

En el cuadro 2 se muestra el uso clínico de algunos principios activos aislados de fuentes vegetal.

Cuadro 2. Uso clínico de algunos principios activos aislados de fuente vegetales
(Damian-Badillo, 2008)

Fuente vegetal	Principio activo	Uso clínico
<i>Agrimonia supatoria</i>	Agrimofol	Antihelmíntico
<i>Colchicum autumnale</i>	Colchicina	Agente antitumoral anti- gota
<i>Digitalis purpurea</i>	Digitalina, digitoxina o digoxina	Cardiotónico
<i>Mucuna sp</i>	L-Dopa	Agente anti-Parkinson
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol	Antitumoral

Los proyectos a base de productos naturales son en su mayoría un estudio para su uso contra el cáncer o como anti-infecciosos, pero muchas otras áreas terapéuticas también están incluidas como se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Categorías terapéuticas de los fármacos derivados de productos naturales en diferentes etapas de desarrollo (Butler, 2008)

Área terapéutica	Preclínica	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Pre-registro	Total
Cáncer	34	15	26	9	2	86
Infecciones	25	4	7	2	2	40
Neurofarmacológicos	6	3	9	4	0	22
Cardiovasculares/Gastrointestinales	9	0	5	6	0	20
Inflamación	6	2	9	1	0	18
Metabólicos	7	3	6	1	0	17
Piel	7	1	2	0	0	10
Hormonal	3	0	2	1	0	6
Inmunosupresores	2	2	0	2	0	6
Total	99	30	66	26	4	225

IIQB

La búsqueda de agentes específicos anticancerosos a partir de las plantas ha sido una motivación económica de varias iniciativas públicas y privadas. En los últimos años ha aumentado el interés de las industrias farmacéuticas en buscar fármacos más potentes y menos tóxicos. En el cuadro 4 se muestra una relación de las instituciones de diferentes países que realizan investigaciones a partir de las plantas medicinales para obtener posibles productos potenciales para el tratamiento del cáncer y la cantidad de moléculas que han encontrado (**Laza *et al.*, 2003**).

Es importante mencionar que existe una gran diversidad de estructuras con actividad anti-cancerígena aisladas de especies vegetales, algunas de ellas son tan complejas que difícilmente se podrían sintetizar químicamente.

Cuadro 4. Principales Instituciones que realizan investigación de productos vegetales (**Laza *et al.*, 2003**)

Institución	País	Número de candidatos terapéuticos
Instituto de Investigación Farmacológica Mario Negri	Italia	25
Hospital Bichat-Claude Bernard	Francia	13
Instituto Nacional de Cáncer	Estados Unidos de América	125
Universidad del Estado Wayne	Estados Unidos de América	56
Centro de Investigación de Cáncer	Alemania	10
Centro de Cáncer Aichi	Japón	34
Escuela de Medicina de la Universidad de Auckland	Nueva Zelanda	14

1.2. Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial registrando 7.9 millones de defunciones en el 2007 (Fig. 1), equivalentes a aproximadamente el 13 % de todas las muertes a nivel mundial (OMS 2009). Las muertes por cáncer en todo el mundo continuarán aumentando, con un estimado de 12 millones en 2030 y para el 2050, la carga mundial de muertes a causa del cáncer se espera que crezca a 27 millones de nuevos casos y 17,5 millones de muertes (OMS 2009).

El cáncer es un término genérico para un grupo grande de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo (OMS, Nota preventiva 297, 2009). Una característica que lo define es la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y que luego pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos a lo cual se le conoce como metástasis (Florez et al., 2000). Hoy en día, millones de personas viven con cáncer o han padecido de cáncer (Global Cáncer Facts and Figures 2007).

Fig. 1. Principales causas de mortalidad por cáncer a nivel mundial (OMS Nota preventiva, 2009)

En cuanto a México los tumores malignos ocupan el tercer lugar en la lista de causas de defunción con 67,048 defunciones en el 2008, que representaron el 12.4 % del total de defunciones, ver cuadro 5.

Cuadro 5. Principales causas de mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos en el 2008. INEGI/Secretaría de Salud. DGIS, 2008			
Orden	Causas	Defunciones	%
1	Enfermedades del corazón	92,267	17.2
2	Diabetes mellitus	75,637	14
3	Tumores malignos	67,048	12.4

Además de las pérdidas humanas a causa del cáncer, el costo financiero familiar y del sector gubernamental de salud es importante. Los costos directos incluyen los pagos y los recursos utilizados para el tratamiento, así como los costos de la atención y

IIQB

rehabilitación relacionadas con la enfermedad. Los costos indirectos incluyen la pérdida de la producción económica debido a costos de morbilidad y mortalidad (**Hechos y cifras del cáncer Mundial 2007**).

Las modalidades principales para el tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; estos se pueden usar solos o en combinación. La quimioterapia ha sido una modalidad de tratamiento importante para el cáncer. Esto ha llevado a un creciente interés en el desarrollo de medicamentos contra el cáncer que provienen de fuentes relativamente no tóxicas como las plantas medicinales. Los buenos resultados clínicos conseguidos con fármacos de origen vegetal se ejemplifican en el caso del Taxol[®], diterpenoide aislado de la corteza de *Taxus brevifolia* y de varias especies de *Taxus*. Otros compuestos de interés son la Combretastina, un estilbeno con actividad antineoplásica; el Resveratrol presente en uvas y vinos tintos, un estilbeno con propiedades antitumorales; y los alcaloides Vinblastina y Vincristina aislados de una planta de Madagascar, *Catharanthus roseus* (**Cordell et al., 2006**).

El fármaco anticancerígeno ideal es el que pudiera destruir sólo las células cancerosas sin dañar las células normales, pero este fármaco no existe. En el cuadro 6 se describen los principales mecanismos de acción de algunos fármacos anticancerígenos obtenidos a partir de recursos naturales vegetales.

Cuadro 6. Principales mecanismos de acción de algunos fármacos anticancerígenos obtenidos a partir de recursos naturales vegetales

Compuestos	Mecanismo de acción	Fuente	Referencia
Vincristina	Inhibición de la polimerización de tubulina	<i>Catharanthus roseus</i>	Jordan et al., 1991
Docetaxel	Promoción de la estabilización de tubulina	<i>Taxus brevifolia</i>	Lifeng, 2001
Etopósido	Inhibición de la topoisomerasa II	<i>Podophyllum peltatum</i> y <i>emodi</i>	Baldwin et al., 2005

1.3. Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad celular constituye uno de los mecanismos de muerte de determinados compuestos naturales, que consiste en la capacidad para interactuar con células y destruirlas. Cualquier tipo celular, normal o patológico, puede ser potencialmente susceptible a la citotoxicidad (**Lozano *et al.*, 2001**), es por esto, que se han puesto en práctica varios métodos experimentales para la determinación de la citotoxicidad y toxicidad.

El Multicentro de Evaluación de la Citotoxicidad *in vitro* MEIC por sus siglas en inglés, se inició en 1983 e investiga la capacidad de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* para predecir la letalidad aguda por vía oral en seres humanos y se basa en el supuesto de que los sistemas de cultivo *in vitro* pueden transferirse a modelos *in vivo*, ya que los sistemas *in vitro* son responsables de una gran cantidad de efecto tóxicos *in vivo*, un ejemplo de ello es la toxicidad resultante de la interferencia de estructuras celulares y las funciones como membranas celulares, metabolismo, regulación de iones y la división celular que son comunes en todas las células humanas y animales. Los criterios de valoración de citotoxicidad utilizados y aceptados fueron la proliferación celular, viabilidad celular, indicadores metabólicos, indicadores de membranas e indicadores de diferenciación (**NICEATM y ICCVAM, 2006**).

Sin embargo, se ha observado que la citotoxicidad *in vitro* no es concluyente para sustituir a los métodos *in vivo* en la determinación de la toxicidad oral aguda debido a que ninguno de los modelos *in vitro* han sido examinados adecuadamente, a corto plazo son útiles para la estimación de la dosis inicial de toxicidad aguda, además de que se puede especular la especificidad de órgano diana y factores *in vivo*, como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) que modulan la actividad de un xenobiótico (**NICEATM y ICCVAM 2006**).

1.4. *Artemia salina*

Uno de los mejores métodos para la determinación de la toxicidad y citotoxicidad por sus características es el que Meyer (1982) y su grupo desarrollaron, el cual es un bioensayo que utiliza el crustáceo de mar *A. salina*.

El camarón de mar *A. salina* crece en lagos salados, estanques salinos y se encuentran distribuidos por todo el mundo. En ciertos momentos del año grandes cantidades de minúsculas partículas marrones (de 200 a 300 micrómetros de diámetro) aparecen flotando en la superficie de los lagos y son arrojadas hacia las orillas por la acción de las olas y el viento. Este polvo aparentemente inerte está formado por quistes secos, inactivos, en estado de criptobiosis (“durmientes”) manteniéndose así tanto tiempo como permanezcan secos. Una vez puestos en agua de mar, los quistes bicóncavos se hidratan tomando forma esférica y el embrión recobra su metabolismo interrumpido. Tras unas 24 h, la membrana externa de los quistes se rompe y aparece el embrión rodeado de la membrana de eclosión. Durante las horas siguientes el embrión abandona completamente la cáscara del quiste colgando entretanto de la cáscara vacía a la cual permanece todavía unido (estado de “umbrella”). Dentro de la membrana de eclosión se completa el desarrollo del nauplio, sus apéndices comienzan a moverse y en un breve periodo de tiempo, la membrana de eclosión se rasga (“hatching”) emergiendo el nauplio que nada libremente.

La eclosión de los huevos se produce tras un periodo variable de 24 h, dando paso a un segundo estadio embrionario en el que el organismo sigue provisto de la mayor parte de reservas vitelinas que posee, además tienen cierta capacidad natatoria. Las reservas vitelinas existentes durante la fase embrionaria están constituidas principalmente por lipoproteínas. Durante la fase embrionaria, la porción vitelina es consumida básicamente en procesos de formación de tejidos, mientras que el glóbulo lipídico es reabsorbido más lentamente para acometer el gasto energético derivado principalmente de la natación (Monroig, 2007).

El bioensayo desarrollado por Meyer *et al.*, (1982) para la determinación de toxicidad y citotoxicidad con la utilización del camarón de mar, *A. salina* se caracterizó por su confiabilidad, reproducibilidad, rapidez y bajo presupuesto para su ejecución. Meyer encontró que aquellos extractos o compuestos que presentaron una $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ son

IIQB

considerados tóxicos y prospectos que tienen una alta relación con actividad citotóxica. (Carballo *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2006; Ibáñez, 2007; Amara *et al.*, 2008). Bustos-Obregon *et al.*, 2010 mencionan que *A. salina* es un bio-indicador apropiado y que puede ser usado para el control de sustancias tóxicas. Según Hill (1998) un bioensayo en un programa de detección de compuestos debe ser rápido, simple, relevante, capaz de ser automatizado, rentable y con potencial para un alto rendimiento. En el cuadro 7 se muestran algunos estudios donde se ha empleado este modelo como prueba de toxicidad y citotoxicidad.

Los compuestos puros o mezcla de compuestos seleccionados en el escrutinio preliminar se evalúan empleando un panel de líneas celulares derivadas de tumores primarios humanos, estas células inmortales o transformadas presentan la propiedad de crecer en forma ilimitada en cultivo.

Cuadro 7. Estudios relacionados con el bioensayo de *A. salina*

Estudio	Referencia
Comparación entre <i>A. salina</i> y pruebas in vitro	<i>BCM Biotechnology</i> (Carballo <i>et al.</i> , 2002)
Estudio de dos derivados sintéticos de núcleo furano	<i>Journal of Aplicable Toxicology</i> (Avenidaño <i>et al.</i> , 2009)
Bio-ensayo de toxicidad crónica con el crustáceo <i>A. salina</i> expuestos a el diazinón organofosforado	<i>Biological Research</i> (Bustos-Obregon <i>et al.</i> , 2010)
Constituyentes químicos y evaluación de la toxicidad y actividad anti-oxidante de hojas <i>Averrhoa carambola</i>	<i>Brazilian Journal of Pharmacognosy</i> (Henrique <i>et al.</i> , 2012)

1.5. Cultivo celular

Las células transformadas están integradas por células que derivan de tumores o que se han manipulado genéticamente. El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vaso de vidrio. Tras la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios más sofisticados, se hizo posible el cultivo de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos tanto del hombre como de otros animales. En un principio el objetivo principal era el estudio de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos, ahora el cultivo de células tiene el objetivo de mantener vivas fuera de su organismo de origen células animales para estudiar su comportamiento sin el control hormonal bajo un ambiente experimental controlable (**Castro, 2006**). Las líneas celulares establecidas se pueden dividir en dos tipos principales: adherentes (células en monocapa) que se fijan al material plástico de un frasco o placa y por lo tanto, tienen que desprenderse de esa superficie antes de utilizarlas y no adherentes (células en suspensión) que normalmente no se fijan a la superficie del recipiente de cultivo. Las células que crecen en cultivo ya sean adherentes o en suspensión suelen clasificarse en primarias, inmortales o transformadas.

Las células primarias son aquellas recientemente aisladas a partir de tejidos u órganos y suelen tener una duración limitada de cultivo. Las células inmortales o transformadas presentan la propiedad de crecer en forma ilimitada en cultivo. Las células transformadas están integradas por células que derivan de tumores o que se han manipulado genéticamente. La demostración de que las células y los tumores sólidos humanos pueden dar origen a líneas celulares continuas, fomentó su empleo en investigación sobre cáncer e impulsó su implementación como método complementario de “escrutinio” o tamizaje de extractos y compuestos con actividad citotóxica previo a los ensayos *in vivo* en el Grupo de Desarrollo de Fármacos del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (**Castro, 2006**).

El Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos de América reconoce avances en biología que ofrecen una oportunidad para el uso de ensayos celulares *in vitro* para el análisis citotóxico (**Scholz et al., 1999**), en el cuadro 8 se observan algunos estudios realizados en líneas celulares tumorales.

Cuadro 8. Estudios realizados en líneas celulares tumorales	
Leblanc <i>et al.</i>, 2002	Estudio <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de gopipol, un extracto de semilla de algodón, en líneas celulares de carcinoma de seres humano
Hing <i>et al.</i>, 2008	Preparación y determinación de la actividad <i>in vitro</i> antiproliferativa de ftalimidias con bases cetonas sobre las células humanas de carcinoma MDAMB-231 y SKHep-1
Gunassekaran <i>et al.</i>, 2011	Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de los efectos antitumorales de gopipol en el adenocarcinoma de estómago humano (AGS) y la línea celular experimental de cáncer gástrico inducido MNNG

Si los resultados obtenidos en estas etapas son alentadores se planea el inicio en animales superiores y finalmente las denominadas fases clínicas I, II y III (**García *et al.*, 2008**).

Los productos naturales continuaran existiendo y aumentando como una fuente del desarrollo de nuevas drogas. La particularidad de muchas de las estructuras básicas de productos naturales hace que estos compuestos sean de interés como punto de partida para la semi-síntesis y síntesis total de moléculas de interés clínico (**Butler, 2005; Saklani *et al.*, 2008**). Dentro de estos productos naturales encontramos a las cumarinas y a los tiofenos.

1.6. Cumarinas

Las cumarinas (Fig. 2) son un grupo de compuestos naturales polifenólicos que se encuentran en una gran variedad de organismos entre ellos los vegetales (Loa *et al.*, 2009). Estos compuestos son productos naturales relativamente no tóxicos que se encuentran en las dietas normales y hierbas medicinales (Yugarani *et al.*, 1992). El núcleo benzo-2-pirona de las cumarinas simples deriva del esqueleto fenilacrílico del ácido cinámico. El sitio primario de biosíntesis de cumarinas en plantas es en las hojas jóvenes y en crecimiento con un menor grado en tallo y raíz (Murray *et al.*, 1982).

Fig. 2 Estructura del esqueleto de las cumarinas

Para las cumarinas se ha demostrado que presentan diversas actividades biológicas y efectos farmacológicos incluyendo actividad contra el cáncer (Middleton *et al.*, 2000). La función de las cumarinas como polifenoles de la dieta en la prevención del cáncer está emergiendo, ya que los compuestos fenólicos, abundantes en frutas y verduras podrían modular las vías de señalización, inhibir la actividad de cinasas e inducir apoptosis en células precancerosas o malignas, lo que resulta en la inhibición del desarrollo del cáncer o la progresión. Estos efectos contra el cáncer también se han estudiado en modelos de cáncer en animales (Lambert *et al.*, 2005) y en pacientes con cáncer (Thomasset *et al.*, 2007). La larga asociación de cumarinas de plantas con diferentes especies de animales y otros organismos a lo largo de la evolución del hombre puede dar cuenta de la enorme variedad de actividades bioquímicas y farmacológicas de estas sustancias químicas en los mamíferos y otros sistemas biológicos. Las cumarinas estudiadas tienen diversas propiedades biológicas y varios efectos en diferentes sistemas celulares así como efectos importantes en la bioquímica y la fisiología de plantas, actuando como antioxidantes, inhibidores de enzimas y precursores de sustancias tóxicas. Además, estos compuestos están involucrados

IIQB

en las acciones de las hormonas de crecimiento de las plantas reguladores de crecimiento, el control de la respiración, la fotosíntesis y defensa contra infecciones.

Las cumarinas han sido durante mucho tiempo reconocidas por poseer propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales y anticancerígenas (**Kostova et al., 2005**). También podrían ser utilizadas como sensibilizadores a la radiación UV, lo que resulta en dosis más bajas y menos efectos adversos con una eficacia similar (**Singh et al., 2006**). Un análisis de la literatura científica reveló numerosos informes sobre las actividades antiproliferativa y antitumoral de una variedad de compuestos derivados de la cumarina, por ejemplo, la propia cumarina y la 7 – hidroxycumarina para las cuales se ha informado que inhiben *in vitro* la proliferación de una serie de líneas de células malignas. En el cuadro 9 se muestran algunos de los trabajos realizados con cumarinas en los que se reporta actividad citotóxica, antitumoral o anticancerígena.

Cuadro 9. Trabajos en los que se reporta una actividad citotóxica, antitumoral o anticancerígena de cumarinas

Autor	Trabajo
Thornes et al., 1994	Probaron la actividad de cumarinas contra cáncer de próstata, melanoma maligno y carcinoma de células renales metastásico
Kofinas et al., 1998	Aislaron siete cumarinas de <i>Apulum tordylium</i> . Los efectos antiproliferativos de tres de estas cumarinas fueron estudiados en el ciclo celular en células asincrónicas de la línea de CPNM-N6
Uchiyama et al., 2002	Aislaron seis cumarinas de las raíces <i>Brasiliensis dorstenia</i> , que mostraron moderada citotoxicidad en células de la leucemia (L-1210 y HL-60)

Drogas anticoagulantes derivadas de cumarinas son ampliamente usadas en el tratamiento y profilaxis de desórdenes tromboticos. Las drogas derivadas de cumarinas inhiben la biosíntesis de factores de coagulación dependientes de la vitamina K. Los anticoagulantes cumarínicos, dicumarol y sus sales de sodio sintéticas derivadas de la warfarina (Fig. 3) han demostrado reducir la metástasis en animales de experimentación.

Fig. 3. Estructura de la Warfarina

La invasión de las células tumorales es dependiente de la angiogénesis y requiere tanto de la migración celular como de la digestión de la membrana basal por proteasas. Se cree que los anticoagulantes reducen la incidencia de metástasis de cáncer al inhibir la formación de una matriz de fibrina que se requiere para la fijación de células cancerosas circulantes (**Shah et al., 1998**)

El aurapteno (7-geraniloxi cumarina) es una de las cumarinas más abundantes encontrada en plantas del género *citrus* para la cual se ha observado actividades farmacológicas como anti-inflamatorias, antioxidante, antibacteriana y efectos inmunomodulatorios al ser administrada en la dieta de los animales (**Tanaka et al., 1999**). Se ha demostrado que protege a los roedores contra la carcinogénesis inducida químicamente (**Singh et al., 1998**) y que presenta actividades antiproliferativas pro-apoptóticas *in vitro* en líneas celulares cancerosas de humano como en las células de carcinoma hepatocelular, colorectal y células cancerosas de ceno (**Zheng et al, 2002; Ohnishi et al, 2004;. Krishnan et al, 2009**). Como consecuencia el aurapteno es un potencial agente quimiopreventivo de cáncer. **Murakami et al. (2000)** informaron que el aurapteno también suprime el anión superóxido. De igual manera, se ha observado que las fitoalexinas que presentan una estructura hidroxilada derivada de las cumarinas son

IIQB

producidas en zanahorias en respuesta a infecciones por hongos por lo que se sugiere una actividad antifúngica (**Hoult et al., 1995**).

Recientemente se demostró que la 7-hidroxi, 6-metoxi cumarina no muestra actividad citotóxica en células endoteliales, pero suprime la migración de estas e interrumpe la formación de tubos de colágeno en células de la cola de ratón a concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500 μM . También se observó que ha una concentración de 500 μM inhibe selectivamente la fosforilación de ERK1/2. La señalización de ERK1/2 está implicada en el punto clave de la proliferación celular y por esta razón los inhibidores de la vía ERK están entrando en fase de ensayos clínicos como potenciales anticancerígenos. Este descubrimiento demuestra que la 7-hidroxi, 6-metoxi cumarina presenta propiedades antiangiogénicas y podría ser útil para el tratamiento de enfermedades mediadas por angiogénesis, por lo que podría servir como una estructura base para el análisis de más potentes análogos semisintéticos o sintéticos (**Pan et al., 2009**).

Tres 6-oxigenadas 8,9-dihidrofurocumarinas (Fig. 4) fueron aisladas del extracto metanólico de *Hedyotis biflora*. Estas tres cumarinas mostraron citotoxicidad en la línea celular tumoral Hep-G2 (células cancerosas de hígado humano) con concentraciones letales cincuenta de 14.4, 17.4 y 4.9 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Yung-Husan et al., 2006**)

A)

B)

C)

Fig. 4. Cumarinas aisladas del extracto metanólico de *H. biflora*. Hediosticonona "A" (A), Hediosticonona "B" (B) y Hediosticonona "C" (C).

Las cumarinas son extremadamente variables en su estructura debido a los distintos tipos de sustituciones en su estructura básica que pueden influir en su actividad biológica. Se ha observado que ciertos sustituyentes son necesarios o aumentan las actividades biológicas de las cumarinas y que los derivados tóxicos de cumarinas son excretados en la

IIQB

orina de mamíferos (**Grote *et al.*, 1973**). Es por esto que el potencial terapéutico de selección de las cumarinas es amplio, además se ha sugerido que las alteraciones en su estructura química podrían cambiar sus propiedades citotóxicas. Por lo tanto, las cumarinas representan una fuente de explotación de nuevos agentes contra el cáncer, que también podrían ayudar a abordar toxicidad secundaria y los fenómenos de resistencia (**Kostova *et al.*, 2005**).

1.7. Tiofenos

Los tiofenos son compuestos heterocíclicos con comportamiento químico similar al del benceno (**Howard *et al.*, 1949**). Existen métodos para modificar la molécula núcleo de los tiofenos pero más importante es que son ideales bloques de construcción en reacciones de acoplamiento cruzado que hoy en día constituyen la base para la síntesis de la mayoría de sistemas conjugados π (**Diedrich *et al.*, 2006**). Los tiofenos presentan un enorme y atractivo potencial de variación estructural que permite un ajuste de las propiedades electrónicas, ópticas y redox, así como únicas capacidades de autoensamblado y transporte de carga, que son uno de los activos más importantes para aplicaciones en electrónica orgánica y molecular.

La polarizabilidad de los átomos de azufre en los anillos del tiofeno conduce a una estabilización de cadenas conjugadas, sin embargo, los tiofenos no son estables en algunas condiciones tales como radiación ultravioleta y en presencia de agentes oxidantes debido a su fuerte sistema conjugado (**Koopmans *et al.*, 1995**).

El núcleo del tiofeno (**a**) (Fig. 5) se ha establecido como un compuesto potencial en la química en gran medida debido a que posee características farmacológicas prometedoras ya que los tiofenos similares presentan diferentes actividades biológicas. El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas, químicas y biológicas de estos compuestos atrae la atención de los investigadores con el objetivo de producir una base de datos combinatoria y llevar a cabo una búsqueda de moléculas biológicamente activas.

Los tiofenos tienen usos farmacéuticos e industriales y son un tipo de producto natural que han demostrado poseer potencial significativo en fotoquimioterapia de infecciones virales, cáncer (**Marles *et al.*, 1992**) y contra larvas de los mosquitos *Aedes aegypti*, *Anopheles* y *Culex* (**Nivsarkar *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1994**). Según **Mishra *et al.*, 2011** la estructura del tiofeno se ha incorporado en varios compuestos farmacológicamente activos con actividades biológicas y se puede encontrar en productos naturales como especies del género *Echinops*.

IIQB

Fokialakis et al. (2006) aislaron ocho tiofenos de cuatro especies de *Echinops* (*E. ritro*, *E. spinosissimus*, *E. albicaulis* y *E. transiliensis*) (**b-i**) (Fig. 5) y evaluaron su actividad contra la termita subterránea de *Formosa*, *Coptotermes formosanus*. El análisis de porcentaje de mortalidad sugirió que de los ocho tiofenos aislados el compuesto 2,2':5',2''-tertiofeno (**b**) y 5'-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**e**) fueron los más activos causando la mortalidad del 78 y 100% respectivamente de las termitas *C. formosanus*, mientras que los compuestos 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]but-3-inil (**c**) y 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]-2-clorobut-3-inil acetato (**d**) así como (2,2'-ditien-5'-il)but-3-inil isovalerato (**h**) e isocardopatina (**i**) presentaron actividad como elementos de disuasión de la alimentación.

En cuanto al mecanismo de acción de los tiofenos no hay reportes, sin embargo, **Nivsarkar et al. (1991)** sugirieron que una de las enzimas inhibidas por el tiofeno se trata de la superóxido dismutasa por lo que se realizó un estudio "Docking" de la estructura base del tiofeno y esta enzima (Fig. 6) usando la base de datos NCBI, PDB, PubChem y el software "hex y spdbv" con lo que se confirmó la actividad del tiofeno sobre la enzima superóxido dismutasa (**Brigit et al., 2011**). En las larvas de mosquitos en presencia de luz ultra violeta muchas enzimas son alteradas por el α -tertienilo (**J**) (Fig. 5), tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa (**Bakker et al., 1979**), acetil colinesterasa (**Kagan et al., 1984**) y superóxido dismutasa (**Nivsarkar et al., 1991**). Sumado a ser un agente de control de mosquitos, se ha demostrado que el α -tertienilo posee actividades como antibiótico (**Ciofalo et al., 1996**), anti-HIV (**Hudson et al., 1993**) y como un novedoso inhibidor de la proteína cinasa C (**Kim et al., 1998**). En cuanto a la actividad farmacológica de derivados de tiofenos, fueron evaluados al exponerlos a la luz ultra violeta contra citomegalovirus murino, virus sindbis y células murinas mastocitoma, quince derivados sintéticos de tiofenos observando que los derivados de tiofenos más activos fueron aquellos que contenían ácidos carboxílicos, hidróxilos o sustituyentes ciano (**Marles et al., 1992**). Al ser activados los tiofenos, como el α -tertienilo producen radicales de oxígeno (**Topp et al., 1998**). El α -tertienilo, otro derivado de los tiofenos es un metabolito secundario que se encuentra de forma abundante en las raíces de *Tagetes* sp., este compuesto es activado por luz ultravioleta y es tóxico para numerosas especies de insectos generando radicales de oxígeno e inhibiendo enzimas tanto *in vitro* como *in vivo*.

IIQB

b) R2: C ₈ H ₅ S ₂ R5: H	e) R2: C ₈ H ₅ S R5: H	i) R2: C ₂₀ H ₁₃ S ₃ R5: H
c) R2: C ₄ H ₄ OH R5: C ₃ H ₃	f) R2: C ₈ H ₃ (OAc) ₂ S R5: H	
d) R2: C ₄ H ₂ ClOAc R5: C ₃ H ₃	g) R2: C ₈ H ₆ OHS R5: H	
	h) R2: C ₁₃ H ₁₄ O ₂ S R5: H	

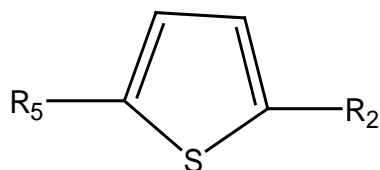


Fig. 5. Ejemplos de tiofenos con actividades farmacológicas. Estructura núcleo del tiofeno (**a**). Estructura de tiofenos aislados de *Echinops* sp 2,2': 5',2''-tertiofeno (**b**), 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]but-3-inil (**c**), 4-[5-(penta-1,3-diinil)tien-2-il]-2-clorobut-3-inil acetato (**d**), 5'- (3-buten-1-inil)- 2,2'-bitiofeno (**e**), 4-(2,2'-ditien-5'-il)-2-acetoxi but- 3-inil acetato (**f**), 4-(2,2'-ditien-5'-il)but-3-inil alcohol (**g**), (2,2'-ditien-5'-il)but-3-inil isovalerato (**h**) e isocardopatina (**i**) modificado de **Fokialakis et al., 2006**. α- tertienilo (**j**).

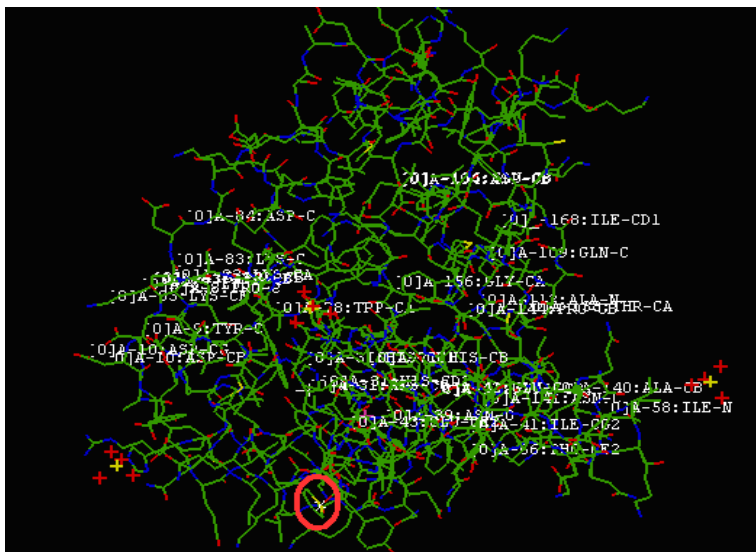


Fig. 6. Interacción molecular obtenida del experimento “Docking” del tiofeno y la enzima superóxido dismutasa. Marcada dentro de un círculo rojo la estructura del tiofeno (Brigit *et al.*, 2011)

El α -tertienilo posee todas las propiedades deseables de un plaguicida al actuar rápidamente, ser económico, no tóxico y con características de degradación que hacen su uso más amigable y seguro para el medio ambiente (Nivsarkar, 2001). Este compuesto es uno de los nematicidas de acción más potente ya que es tóxico al exponerlo a la luz ultra violeta en una gran cantidad de organismos que se mencionan en el cuadro 10.

Los derivados de tiofenos también representan una clase molecular de importantes y estudiados heterociclos (Eicher *et al.*, 2003) para los cuales el interés químico ha crecido desde los primeros tintes de la química hasta el diseño de drogas modernas, biosensores, materiales de transporte y polímeros (Doré *et al.*, 2004; Rost *et al.*, 2004; Vriezema *et al.*, 2003). Los derivados de los tiofenos están ampliamente distribuidos en la familia Asteraceae (Siitfeld, 1982). Sin embargo, no existe información sobre sus funciones fisiológicas en plantas y poco se conoce sobre su metabolismo. Los tiofenos y sus derivados poseen una gran variedad de actividades farmacológicas como las que se mencionan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Actividades farmacológicas del α-tertienilo, tiofeno y derivados del tiofeno				
Fuente	Compuesto	Organismo blanco	Efecto	Referencia
Planta	α -tertienilo	<i>Pratylenchus penetrans</i>	Nematicida	Gommers et al., 1973
Planta	α -tertienilo	Eritrocitos en humanos	Lisis	Yamamoto et al., 1979
Sintético	α -tertienilo	Larvas del mosquito <i>A. intrudens</i>	Insecticida	Philogène et al., 1986
Planta	α -tertienilo	<i>Euxoa messoria</i> , <i>Tribolium castaneum</i> y <i>Rhizopertha dominica</i>	Tóxico	Champagne et al., 1984; Morallo-Rejesus et al., 1982
Sintético	Tiofeno	Modelo de ratas artríticas	Anti-inflamatorio, anticonvulsivo, analgésico y antiparkinson	Baba et al., 1999; Amr et al., 2003
Sintético	Tiofeno	<i>Trypanosoma cruzi</i> y cepas de <i>Leishmania</i>	Anti parasitario	Valderrama et al., 1999
Sintético	Tiofeno	Receptores GnRH	Tratamiento de enfermedades reproductivas	Guo et al., 2003
Planta	Derivados de tiofenos	No determinado	Anti-edema, inmuno modulatoria y anti cáncerígeno	Ching et al., 1995
Planta	(E)-2-[5-(hept-5-en-1,3-diinil)-tien-2-il]-etan-1,2-diol	<i>Candida glabrata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Antifúngico	Chobot et al., 2003
Planta	(E)-1-[5-(hept-5-on-1,3-diinil)-2-tienil]etan-1,2-diol	<i>Artemia salina</i> y <i>Tubifex rivolorum</i>	Tóxico	Chobot et al., 2006
Planta	5-{4-[4-(5-pent-1,3-diiniltiofeno-2-il)-but-3-iniloxi]-but-1-inil}-2,2'-bitiofeno y 5-(4-hidroxibut-1-one)-2,2'-bitiofeno	Células de cáncer A375-S2 y HeLa	Citotóxico	Wang et al., 2007
Planta	5'-metil-[5-(4-acetoxi-1-butinil)]-2,2' bitiofeno y 5-metil-2,2':5',2''-tertiofeno	Leismaniasis	Antileismaniasis	Teru et al., 2011

IIQB

Para la actividad anti tumoral de los derivados de tiofenos se ha reportado que 15 derivados sintéticos presentaron toxicidad al exponerlos a la luz contra tumores debido a su cadena insaturada conjugada y sugieren futuras evaluaciones en modelos animales (**Marles et al., 1992**). **Wenrong et al. (2008)** también determinaron la actividad antitumoral de ocho tiofenos aislados de *E. grijissi* en las líneas celulares tumorales humanas K562, HL60, HepG2 y MCF-7. En sus resultados observan que los bitiofenos 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**A**) y 5-(3-acetoxi-4-isovalero-iloixibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**B**) (Fig. 7) presentan el mayor potencial con actividad antitumoral.

A)

B)

R1:C2H7

Fig. 7. Bitiofenos de *E. grijissi* con el mayor potencial antitumoral. 5-(3,4-diacetoxibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**A**) y 5-(3-acetoxi-4-isovalero-iloixibut-1-inil)-2,2'-bitiofeno (**B**) (**Wenrong et al., 2008**).

Al observar una citotoxicidad de seis tiofenos en la línea celular de carcinoma hepatocelular (HepG2) **Agnès et al. (2004)** determinaron si esta actividad citotóxica era debido a una actividad genotóxica. Como resultados describen que no existe una correlación dependiente de la estructura en la actividad citotóxica y genotóxica de los seis tiofenos analizados y sugieren que la actividad metabólica de los tiofenos forma metabolitos reactivos con el ADN lo cual puede ocurrir a través del citocromo P450 resultando en la formación de epóxidos que conducen a la genotoxicidad.

IIQB

La información y antecedentes hasta el momento disponible acerca de los tiofenos y sus derivados nos muestran la potencial y aun no estudiada actividad quimio terapéutica específicamente citotóxica de los tiofenos sintéticos, semi-sintéticos y naturales.

1.8. Modificaciones químicas

En la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividad biológica es de resaltar que pequeñas diferencias en la estructura molecular pueden cambiar el efecto de determinados compuestos (**Calixto *et al.*, 2000**). Por ejemplo, la morfina es un analgésico potente con propiedades adictivas. Un análogo natural de la morfina - la codeína - se diferencia de la morfina por sólo un grupo metilo, pero es mucho menos eficaz como analgésico. En el otro lado de la acetilación los dos hidroxilos en la estructura de la morfina conducen a la heroína, que fácilmente puede cruzar la barrera sangre-cerebro y tener efectos dramáticos e indeseables en el sistema nervioso central (Fig. 8).

Fig 8. Derivados de la morfina

IIQB

Un estudio de los efectos de los flavonoides en los flujos de Ca^{2+} mostró que un cambio de un grupo funcional no sólo dio lugar a la pérdida de la actividad sino que cambió de ser un inhibidor a un activador (**Summanen et al., 2001**). Un ejemplo importante en la semi-síntesis de compuestos es la obtención del 10-desacetil bacatin III extraído de hojas de *Taxus baccata* el cual se utiliza para la semi-síntesis eficiente del taxol[®], obteniendo un excelente rendimiento a diferencia del rendimiento obtenido de *T. brevifolia* (**Denis et al., 1988**).

Adfa et al. (2010) estudiaron la relación estructura-actividad del grupo metoxi e hidroxilo en los C-6 y C-7 para la actividad germicida y anti-alimentaria de derivados de cumarinas de *Protium javanicum* y observan que de los diez compuestos ensayados la escopoletina exhibió la mayor actividad termicida seguida de 6-metoxi cumarina, 6-hidroxi cumarina y umbelliferona. Todos los compuestos excepto la cumarina exhibieron actividad anti-alimentaria.

Los derivados de tien-tiofenos han sido desarrollados para diferentes propuestas en el campo farmacéutico y han sido evaluados como potenciales antitumorales, antivirales, antibióticos y drogas antiglaucoma o como inhibidores de la agregación plaquetaria (**Jarak et al., 2006**).

Wenrong et al. (2008) mencionan que son necesarias modificaciones químicas a las estructuras de los tiofenos aislados de fuentes naturales ya que sugieren que la citotoxicidad de los tiofenos es relativa al grado de polimerización y sustituyentes de la cadena lateral.

1.9. Luz UV-A

Con la finalidad de lograr la actividad y efecto deseados a partir de nuevos o conocidos compuestos buscando las condiciones donde se genere el menor grado de efectos adversos, se ha hecho uso de otras herramientas como la fotoquimioterapia.

La fotoquimioterapia combina la radiación ultravioleta o visible con fármacos sensibles a estas radiaciones, para producir efectos citotóxicos que los fármacos o la radiación no pueden lograr por separado. Se ha establecido como fotoquimioterapia el uso de Psoraleno más UV-A (320-400 nm) conocido como PUVA (Psoralen Ultra Violet A). PUVA es utilizado en el tratamiento del linfoma cutáneo de células T y la psoriasis (**Pinthus *et al.*, 2006; Babilas *et al.*, 2010; Fayter *et al.*, 2010**). Las bases de ADN canónicas están dañadas cuando absorben la radiación ultravioleta (RUV) en las regiones espectrales UV-C y UV-B (100-320 nm), pero no tienen una absorción significativa a longitudes de onda UV-A (320-400 nm), por lo tanto, el ADN es en gran medida insensible a los daños inducidos por rayos UV-A tanto a nivel molecular como clínico (**Walker *et al.*, 2007**).

Se ha demostrado que el uso de PUVA en pacientes con psoriasis presenta ventajas como una eliminación más rápida y número requerido de sesiones por tratamiento además de que existe una mayor eliminación del psoraleno en comparación de otras técnicas como NBUVB (Narrow-band Ultraviolet-B) que hace uso de costosa tecnología (**Surabhi *et al.*, 2010**). Sin embargo, se han observado desventajas en el uso de PUVA como la asociación de un mayor riesgo de cáncer de piel en el uso prolongado. Por lo tanto, nuevas investigaciones sobre dosis más bajas de compuestos y radiación a través de la selectividad y modificación de la estructura química se justifica.

IIQB

1.10. Género *Tagetes*

Tanto las cumarinas como los tiofenos se han reportado ampliamente en el género *tagetes*. **Brigit., (2011)** reporta que el tiofeno es aislado de cultivos de tejidos de *Tagetes patula* y **Marotti et al. (2010)** mencionan que las especies del género *Tagetes* producen tiofenos con una fuerte actividad biocida y que representan una fuente útil para la supresión de nemátodos y una fuente natural de plaguicidas siendo la raíz el órgano de la planta que presenta la mayor cantidad de tiofenos. Por lo que consideran a *T. minuta* y *T. lucida* como las especies más prometedoras con el mayor potencial para un uso biocida debido a la concentración de tiofenos que se presentan principalmente en la raíz.

En un estudio realizado por **Céspedes et al., 2006** en una especie del genero *Tagetes* (*T. lucida*) reportan la presencia de cumarinas.

EL género *Tagetes* se encuentra dentro de la familia Asteraceae y pertenece a la tribu Tageteae. Las especies del género *Tagetes* generalmente son hierbas anuales o perennes, algunas veces sufruticasas o subarbustos y para algunas especies se reporta cierto uso medicinal o uso como plantas de ornato (**Villareal, 2003**). En el tratamiento de padecimientos se emplea en general toda la planta en cocimiento por vía oral. Para algunas molestias gástricas y diarreas se mezcla con ruda, hinojo y clavo. Los frutos tradicionalmente son usados en forma de té actuando como sedante en el tratamiento de personas nerviosas (**Linares et al., 1999**). Los compuestos identificados en las plantas de este género son aproximadamente 100, siendo los tiofenos y ácidos grasos los más representativos a los cuales se les atribuyen propiedades antifúngicas (**Romagnoli et al., 2005**) y antioxidantes, respectivamente (**Aquino et al., 2002**). Algunos de los compuestos reportados para *Tagetes* spp se muestran en el cuadro 11. En el cuadro 12 se muestran algunas de las actividades de los compuestos aislados de *Tagetes* spp los cuales en términos generales tienen efecto letal para algunos microorganismos y nemátodos (**Neher et al., 1968**).

Cuadro 11. Compuestos identificados en el género *Tagetes* spp

(Tomado de Mauro *et al.*, 2006)

β -caroteno flavoxantin	isoberneol	4-hidroxi dehidrotremeton	hidroxitremeto na	<i>cis</i> -tagetona
(-)-4- hidroxitremeto na	5-(3-buten-1- vinil)- 2,2'- bitiofeno	chrisanthemaxan tin	5-(3-buten-1- vinil)- 2,2'- bitienilo	quercetagetin- 5-metil éter
(R)-(-)- piperitona	(R,S)-(\pm)-linanol	<i>cis</i> - y <i>trans</i> - ocimenonas	isoeuparin	querceteina
5-(4-acetoxi-1- butenil)-2,2'- bitienilo	5-(4-hidroxi-1- butenil)-2,2'- bitienilo	quercetagenin-7- O-(6-O- <i>p</i> - coumaroil- β -D- gluco piranosido	isorhamnetin- 3-galactosido	quercetagetin- 7-arabinosil- galactosido
(s)-(-)-limoneno	5-isobutil-3- metil-2 furancarbaldeido	dialmitoil-lutein	Isorhamnetin- 3-rhamnosil (1 \rightarrow 6) glucósido	quercetin-3- (2'',3'',4''- triacetil galactosido
(Z) y (E)- ocimenona	6- hidroxikaempfer ol-7-O- β -D- glucopiranosida	dihidrotagetona	isorhemnetin	quercetin-3- (3'',6'' diacetil galactosida)
(Z)-tagetona	6-O- β -D glucopiranosida	σ -tertienil	jafrina	quercetin-3- (6'' galoilgalactosi do
tagetenona	7-metoxi cumarina	E-cariofileno	kaempferol	quercetin 3- galactosida

Continuación de cuadro 11. Compuestos identificados en el género *Tagetes spp*
(Tomado de **Mauro et al., 2006**)

helenien	miricetin-3-glucosido	quercetagenin-7-O-(6-O-p-coumaroil-β-D-gluco piranosido	miricetin-3-glucósido
hidroxitremetona	miricetin	quercetagetin	miristoil palmitoil-lutein
isoberneol	miristoilpalmitoil-lutein	quercetagetin-5-metil etér	miroximo
isoeuparin	metil-3-(2-O-β-D-glucopiranosil-4-metoxifenil)	quercetagetin-7-arabinosil-galactosido	ocimeno
isorhamnetin-3-galactosido	luteolin glicosidos	quercetagenin-7-O-(6-O-caffeoyl-β-	quercetagenin-3-metil etér
isorhamnetin-3-rhamnosil (1→6) glucosido	3,7-dimetil-5-hidroxioc-1-en-6-ona	quercetin-3-(2'',3'',4''-triacetil galactosido	palmitoil tearoil-lutein
isorhemnetin	palmitoil tearoil-lutein	quercetin-3-(3'',6'' diacetil galactosida)	patuletin
jafrina	quercetin 3-galactosida	quercetin-3-(6'' galoil galactosido)	fenil acetaldehído
kaempferol	fenil acetaldehído	patuletin	quercetagenin
linalol	spatulenol	rhamnetin	tagetona
luteina	tagetona		

Cuadro 12. Actividades de los compuestos aislados de *Tagetes spp*

Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad	Referencia
Estragol		Antioxidante	Muñoz <i>et al.</i>, 2007
β -mirceno		Antioxidante	
α -tertienilo		Antimicrobiana y fitotóxica	Neher 1996; Ortiz 1989
7-metoxi cumarina		Antibacteriana, espasmolítica, diurético y antiinflamatoria.	

T. lucida es una hierba de tallos derechos, que mide 30-40 cm de altura, hojas opuestas, sésiles, oblongas, finamente aserradas, aromáticas, miden 2.5-3.5 cm de largo por 7-9 mm de ancho (Figura 9). Se encuentra ampliamente distribuida en veinte Estados de la República Mexicana y en los Estados Unidos en los Estados Arizona, Colorado, Nuevo México y Texas (**Linares *et al.*, 1999**). El uso medicinal más frecuente de esta planta es en trastornos digestivos, principalmente para dolores de estómago. También se le emplea en cólico estomacal, diarrea, disentería, empacho, tifoidea y vómito. Asimismo, se recomienda en desórdenes ginecológicos como cólicos menstruales, dismenorrea y cuando hay menstruación lechosa o blanca, para expeler el flujo y para concebir hijos (**Linares *et al.*, 1999**).



Fig. 9. Principales características morfológicas de *T. lucida* (Modificada de entheology.org).

En México, la hierba es utilizada como té para calmar el dolor de estómago, como relajante y para reducir los síntomas de la resaca. También es usada como condimento de ensaladas, insecticida, planta ceremonial y como forraje (Villareal *et al.*, 2003). Los Huicholes mezclan esta planta con tabaco a la cual le llaman “ye”, se han reportado efectos alucinógenos al fumarla, también al quemarla sirve para ahuyentar a los mosquitos (Linares *et al.*, 1999). Sobre *T. lucida* se han realizado investigaciones bajo diversos

IIQB

enfoques como son la determinación de efecto hipotensor y diurético, determinación de flavonoides, particularmente glicósidos de quercetina, quercetagrítín, tagetona, tagetina y camferol, taninos, pectina y gomas así como actividad antibiótica *in vitro* sobre *Candida albicans* y *Streptococcus pyogenes* (Caceres *et al.*, 1998). Determinación de la concentración de metales en las diversas partes de la planta (Laferriere *et al.*, 1991) y propiedades antifúngicas (Argüeta *et al.*, 1994; Damián Badillo *et al.*, 2008). En el cuadro 13 se muestran algunas de las actividades farmacológicas de *T. lucida*.

Cuadro 13. Actividades farmacológicas de *T. lucida* (Tomado de Argüeta *et al.*, 1994)

Extracto	Actividad farmacológica	Modelo biológico
Etanólico de hoja	Antibacteriana	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas auroginosa</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Sh. flexneri</i> .
Acuoso de hoja	Antifúngica Antibacteriana	<i>Candida albicans</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. dysenteriae</i>
Hidroalcohólico de hoja	Antifúngica	<i>C. albicans</i>
Hexánico y acetónico de hoja	Antibacteriana	<i>Sh. flexneri</i>
Acuoso de flor	Antibacteriana	<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. dysenteriae</i>
Metanólico de flor	Antibacteriana Antifúngico Fitotóxica	<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Etanólico de flor	Antibacteriana	<i>E. coli</i> , <i>P. auriginosa</i> , <i>S. typhi</i> , <i>Sh.dysenteriae</i> , <i>Sh. flexneri</i>

Debido a la importancia de los principios activos que posee *T. lucida* su estudio es imprescindible. Cabe destacar que la mayoría de los compuestos reportados para ésta planta no están condicionados a una ubicación geográfica particular (Abdala 1999; Aquino 2002; Céspedes 2006) lo que se puede observar en el cuadro 14.

En un estudio de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas el aceite esencial de *T. lucida* que en su mayoría fue estragol presentó la mayor actividad antioxidante (Olivero *et al.*, 2010) sus extractos acuosos a concentraciones de 10, 50, 100

IIQB

mg/kg por día en ratas presentan una actividad antidepresiva (**Guadarrama et al., 2008**). **Vega-Ávila et al. (2009)** reportan para la línea celular T 47D actividad citotóxica del extracto etanólico de *T. lucida* ($CL_{50} = 1.82 \mu\text{g/mL}$) aún mejor que la Colchicina ($CL_{50} = 2.89 \mu\text{g/mL}$) y **Mejía-Barajas et al. (2011)** reportaron actividad citotóxica en *A. salina* del extracto hexánico (cuadro 15).

Cuadro 14. Principales compuestos aislados de *T. lucida* colectada en distintos sitios

Colecta	Compuesto	Referencia
Argentina	Flavonoides	Abdala et al., 1999
Guatemala	Metoxi cumarina, Quercetina y Fenol	Aquino et al., 2002
México Michoacán	Metoxi cumarina, Quercetina, Fenol y Esculetin	Céspedes et al., 2006

Cuadro 15. Actividad citotóxica de los extractos de *T. lucida* en líneas celulares cancerosas y *A. salina*. ND: No determinada (**Vega-Ávila et al., 2009; Mejía-Barajas et al., 2011**)

Extracto	CL ₅₀ T 47D	CL ₅₀ HeLa	CL ₅₀ <i>A. salina</i>
Hexánico	ND	ND	16
Etanol	1.82	> 50	ND
Acuoso	18.94	13.2	ND

Dentro del grupo de trabajo del laboratorio de Fisiología celular del Instituto de Investigaciones de la U.M.S.N.H **Damián-Badillo et al. (2008)** reportó para los extractos acetato de etilo y metanol: cloroformo de *T. lucida* un efecto inhibitorio de crecimiento y antifúngico en los hongos *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Sporothrix schenckii*. **Céspedes et al. (2006)** ensayaron la actividad antifúngica de siete cumarinas de *T. lucida*, tres semi-sintetizadas y siete comerciales (Sigma-Aldrich) en *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Fusarium moniliforme*, *F. sporotrichum*, *Rhizoctonia solani* y *Trichophyton mentagrophytes*, contra bacterias en *B. subtilis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *Salmonella sp.*,

IIQB

Sh. boydii, *Shigella sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermis*, *St. aureus*, *Yersinia enterolitica* y *Vibrio cholerae*. Otras actividades relacionadas a actividad antitumoral, anticancerígena o citotóxica de las cumarinas ensayadas por **Céspedes et al. (2006)** se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Cumarinas aisladas de *T. lucida* y actividades relacionadas a actividad antitumoral, anticancerígena o citotóxica

Cumarinas aisladas de <i>T. lucida</i>	Actividad	Autor
7,8-dihidroxycumarina	Efecto inhibitorio en la línea celular tumoral de hígado (HepG2) Fragmentación de ADN y cambios morfológicos característicos en la muerte celular programada de las células U-937	Loa et al.,2009; Riveiro et al.,2007
7-hidroxi cumarina (umbelliferona)	Estimula apoptosis en células de Linfoma (HL-60) y actividad citostática en líneas de adenocarcinoma	Marshall et al., 1994; Sullivan et al., 2000
6,7-dimetoxi cumarina (scoparona)	Decrece la producción de mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2 (PGE2) Estimula melanogénesis	Seon et al.,2005; Jeong-yeh et al., 2006
6,7-dihidroxycumarina (esculetin)	Estimula melanogénesis Fragmentación de ADN y cambios morfológicos característicos en la muerte celular programada de células U-937 Inhibe el crecimiento celular	Jeong-yeh et al., 2006; Riveiro et al.,2007;

2. Justificación

T. lucida Cav se ha estudiado bajo diversos enfoques reportando así la presencia de cumarinas y tiofenos, los cuales han servido como valiosos precursores para el diseño y síntesis de análogos anticancerígenos. Sin embargo, la comprensión de las relaciones entre sus estructuras químicas y propiedades farmacológicas sigue siendo limitada, aunado al antecedente de que estos compuestos son una fuente de nuevas estructuras pero no necesariamente la entidad final de la droga, se busca su potencialización.

3. Hipótesis

La actividad citotóxica de *T. lucida* Cav es debida a sus cumarinas y bitiofenos la cual se altera al modificarlos químicamente

4. Objetivos

4.1. Objetivo general:

- Estudiar la actividad citotóxica de las cumarinas y bitiofenos naturales y modificados de *T. lucida* Cav

4.2. Objetivos particulares:

- Purificar las cumarinas y bitiofenos de los extractos hexánicos de hoja y raíz de *T. lucida* Cav
- Realizar modificaciones químicas a las cumarinas y bitiofenos aislados de *T. lucida* Cav
- Determinar la actividad citotóxica y tóxica de las cumarinas y bitiofenos naturales y modificados químicamente en presencia y ausencia de luz UV

IIQB

5.1. Estrategia experimental

En la figura 10 se describe el esquema de los procedimientos a seguir en este trabajo de investigación.

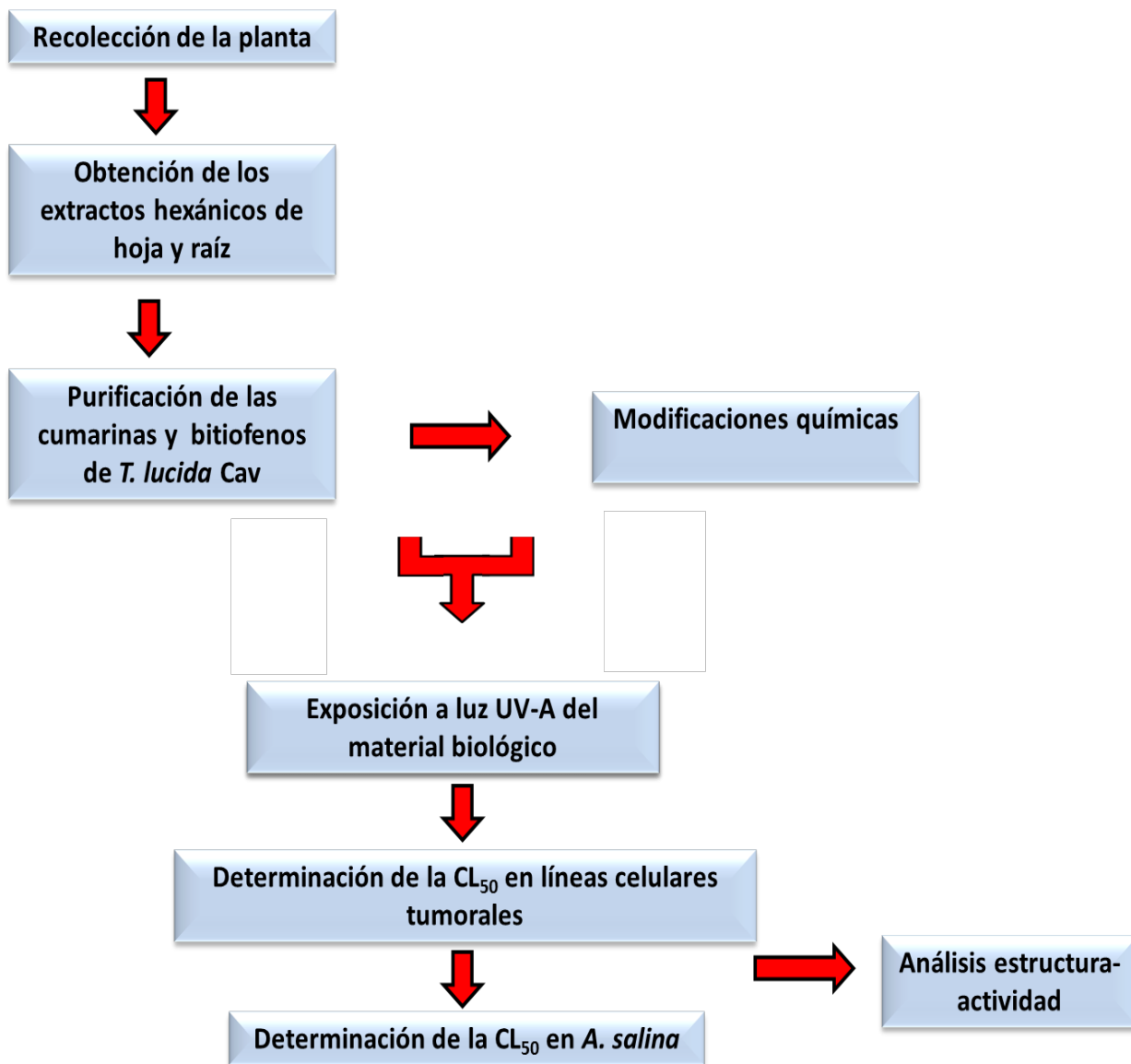


Fig.10. Estrategia experimental

5.2. Material biológico

5.2.1. Material vegetal

La planta *T. lucida* fue colectada en el kilómetro 3.5 de la carretera Tiripetío–Acuitzio del Canje, Michoacán a una altitud de 2045 msnm del sitio con coordenadas: N 19 ° 30.916´y W 101 ° 20.634´ el 05 de octubre del 2008. *T. lucida* (del Río 86, IEB) fue identificada taxonómicamente por el D.C. Jersey Rzedowski, conservando un ejemplar de la especie vegetal en el Herbario del Instituto de Ecología de Pátzcuaro A.C. y uno más en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.2.2. *A. salina*

Huevos de *A. salina* [*Salt Creek Co*TM] y el agua de mar sintética [*Red Sea Salt*TM] ambas de *Red Sea Fish Pharm* fueron obtenidas del mercado local.

5.2.3. Líneas celulares

Línea celular DU 145 (HTB-81): Son células que se multiplican en la próstata, aisladas por efusión pleural. Son adherentes con morfología epitelial y su crecimiento es independiente de andrógenos. La línea no es sensible a las hormonas, débilmente positiva para la fosfatasa ácida y aisladas forman colonias en agar blando. Esta línea celular no expresa el antígeno prostático, es tumorigénica y forma adenocarcinoma. Los análisis ultraestructurales revelaron micro vellosidades, tonofilamentos, desmosomas, aparato de Golgi bien desarrollado, lisosomas heterogéneos y ausencia de mitocondrias.

Línea celular Hep-G2 (HB-8065): Células de carcinoma hepatocelular de hígado aisladas de una mujer caucásica, morfología epitelial, adherentes, no tumorigénica, secreta proteínas plasmáticas como albúmina, fibrinógeno y transferrina.

IIQB

Línea celular MCF7 (HTB-22): Son células derivadas de un adenocarcinoma de glándula mamaria de una mujer caucásica, aisladas por efusión pleural. Son adherentes, de morfología epitelial y su crecimiento es dependiente de estrógenos he inhibido por el factor de necrosis alfa (TNF- α).

Línea celular 3T3. Fibroblastos de ratón. Son células adherentes, negativas para transcriptasa reversa y presentan una amplia variedad de receptores y sistemas de segundo mensajero.

Las células fueron adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC).

5.3. Obtención de extractos

Se separó la hoja y raíz de la planta, después fueron secadas a la sombra (Fig. 11). Para la obtención de los extractos hexánicos de raíz y hoja de *T. lucida* por maceración se pesaron 600 g de raíz y 1050 g de hoja.

La raíz fue molida para aumentar la superficie de contacto, tanto la raíz como la hoja se colocaron en un recipiente de vidrio por separado y se sometieron al siguiente procedimiento de extracción: Se les adicionó hexano, se dejaron macerar por tres días a temperatura ambiente protegidos de la luz, después se filtraron y los filtrados se concentraron en un rotavapor a 55 °C. El proceso anterior se realizó tres veces con la finalidad de extraer la mayor cantidad posible de compuestos.



Fig. 11. Ilustración de la raíz y hoja seca de *T. lucida* utilizadas en la obtención de extractos crudos: **A.-** Raíz, **B.-** Hoja.

5.4. Análisis químico

Se realizaron cromatografías en columna para separar los componentes de los extractos totales, se utilizó una fase estacionaria gel de sílice [Aldrich] de una malla de 70-230 con un volumen de poro de 0.75 cm³/g. La fase móvil fue una mezcla de hexano, cloruro de metileno y acetato de etilo, iniciando con hexano y aumentando la polaridad con cloruro de metileno y por último acetato de etilo. De cada cromatografía se recolectaron fracciones de 10 mL en viales de vidrio.

Para las columnas se utilizaron 1 g del extracto hexánico de hoja y 1 g del extracto hexánico de raíz en 10.0 g de gel sílice con un diámetro interno de columna de 2.0 cm con una altura de 10.0 cm. Una vez realizados los corrimientos cromatográficos y evaporado el solvente de cada una de las fracciones, se enviaron a resonancia magnética nuclear aquellas en las cuales se observaron señales en cromatografía de capa fina, obtenidos los espectros, se consideraron aquellas fracciones en el que en su espectro se observaron señales de cumarinas o bitiofenos.

5.4.1. Rendimiento de los compuestos puros

Se acumularon las fracciones en donde se identificaron los compuestos y cuyos espectros tenían las señales características de cumarinas y bitiofenos, una vez evaporado el disolvente se obtuvo el peso de la muestra por diferencia de peso, para posteriormente obtener el rendimiento con la siguiente fórmula (1):

$$\% \text{ R. del C.P.} = \frac{\text{Peso en g del C.P.}}{\text{Peso en g del E. C.}} \times 100 \quad (1)$$

En donde % R. del C.P. es el porcentaje de rendimiento del compuesto puro, peso en g del C.P. es el peso en gramos del compuesto puro y peso en g del E.C. es el peso en gramos del extracto crudo sometido a cromatografía.

5.4.2. Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury Plus 400, los espectros de Hidrógeno (^1H) se obtuvieron a 400 MHz en ocho repeticiones, la ventana espectral fue de 6000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y el disolvente de referencia interna fue tetrametilsilano (TMS), los espectros de Carbono (^{13}C) se obtuvieron a 100 MHz en 2,000 repeticiones, la ventana espectral fue de 25,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado.

5.4.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los espectros de masas de los compuestos identificados fueron obtenidos en un espectro de masas (Hewlett Packard modelo 5989B), utilizando un detector de iones (multiplicador de electrones) a 100°C , energía de ionización de 70 eV.

El equipo utilizado para obtener los cromatogramas de gases fue un cromatógrafo de gases de la marca Hewlett Packard modelo 5890 Serie II plus. El método utilizado fue MSA, con una temperatura inicial de horno cromatográfico de 50°C durante cinco minutos, después cada minuto subió 20°C hasta llegar a 200°C , en esta temperatura permaneció cinco minutos, posteriormente se incrementó hasta llegar a 250°C y ahí permaneció durante 10 min, el tiempo total de corrida fue de 30 min. La temperatura del inyector y de la interface fue de 240°C y 260°C , respectivamente.

Se utilizó Helio como fase móvil (gas de arrastre) y una columna no polar Hp-5 MS (5-fenil) metil polisilano, con 30 m de longitud diámetro interno de 0.25 mm y la capa de la fase estacionaria de 0.25 μm . La base de datos para la comparación de las señales espectrales fue NIST 2000.

5.5. Modificación química

La modificación química de las cumarinas se realizó mediante una cloro-metilación en los carbonos 6 y 8 de la 7-metoxi cumarina y en el carbono 3 de la 6,7-dimetoxi cumarina utilizando la receta de Lele *et al.*, 1960 la cual fue modificada debido a los sustituyentes de la estructura base de la cumarina.

La reducción del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno se realizó mediante la modificación de la receta de Mori *et al.*, 2006.

5.6. Análisis biológico de toxicidad en *A. salina*

5.6.1. Agua de mar

El agua de mar se preparó con 33.33 g de sal sintética de Mar (Red Sea Salt®) y se disolvió en un litro de agua ajustando a un pH entre 8.2- 8.4 con una disolución NaOH 1 M, si el pH es menor a 8.2 y con una disolución de HCl 1 M si el pH es mayor a 8.4.

5.6.2. Bioensayo en *A. salina*

Para obtener nauplios de *A. salina* se adicionaron 100 mg de quistes (huevos) de *A. salina* en 150 mL de agua de mar sintética en un vaso de precipitado. Los huevos se incubaron de 24 - 26 h bajo un foco con 60 W y oxigenación saturada, durante este periodo los quistes eclosionaron y maduraron a larvas o nauplios (Instar I). Los nauplios (larvas) fueron separados de los huevos no eclosionados, con ayuda de sus propiedades fototróficas y una pipeta Pasteur, se depositaron en una caja de Petri, después se adicionaron 5 mL de agua de mar sintética fresca y a partir de aquí se transfirieron 10 nauplios con 97 μ L de agua de mar sintética a cada pocillo de la placa con ayuda de una pipeta Pasteur. Se pesaron 33.33 mg de los compuestos y se disolvieron en 1000 μ L de DMSO (Dimetil sulfóxido) de donde se hicieron diluciones a concentraciones logarítmicas y se adicionó un volumen de 3 μ L a cada pocillo que contenía 10 nauplios y 97 μ L de agua de mar sintética, para obtener una concentración final de 1000, 100, 10 y 1 μ g/mL. El control negativo contuvo 10

IIQB

nauplios en 97 μ L de agua de mar sintética y 3 μ L de DMSO. La placa se incubó por 24 h, durante este periodo los nauplios maduraron a los siguientes estadios (I y II Instar). Después de este periodo, los nauplios muertos se contabilizaron con el objetivo de 4 X de un microscopio invertido. El criterio de mortalidad fue que al observarlos en el primer minuto estos no tuvieran la capacidad de desplazarse de un lugar a otro. Finalmente se adicionaron 50 μ L de etanol al 70% y se dejó incubar por 15 minutos para matar todos los nauplios depositados en cada pocillo y se contabilizó el número total de nauplios. El porcentaje de mortalidad de *A. salina* se determinó con la siguiente fórmula (2):

$$\% \text{ de Mortalidad} = \frac{\text{Número de nauplios muertos}}{\text{Número total de nauplios}} \times 100 \quad (2)$$

Se obtuvo el promedio de los resultados (n = 4) y posterior se hicieron diluciones en el intervalo donde se observó mortalidad para obtener así el porcentaje de mortalidad 50 % (CL₅₀). Los resultados se graficaron para obtener curvas concentración-respuesta. Las curvas se construyeron graficando en el eje de las ordenadas los efectos (porcentaje de mortalidad) causados en el organismo expuesto a la sustancia química y en las abscisas la concentración a la que fue expuesto. Se graficaron los datos y se calculó la CL₅₀ con el programa SigmaPlot 11.0.

5.7. Análisis biológico de tototoxicidad en líneas celulares

5.7.1 Medios de cultivo

Para 500 mL de medio de cultivo se utilizaron 5 g de DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium Low Glucose) o cultivo MEM (Minimum Essential Medium) [Sigma-Aldrich], ambos medios fueron suplementados con 5 mL de una disolución de penicilina 10,000 U/mL y estreptomina 10 mg/L [Invitrogen], 40 mL de suero bovino de ternera al 10 % [GIBCO] inactivado con calor (50 °C por 30 min), 1.8 g de bicarbonato de sodio y 450 mL de agua destilada. Para el medio de cultivo de las células 3T3 se adicionó

IIQB

5 mL de una disolución D-(+)- glucosa 45 % [Sigma-Aldrich]. La disolución de los medios de cultivo fue esterilizada por filtración con un malla de 0.40 y 0.22 μm (Milipore).

Para 1 L de PBS (Buffer de fosfatos) se pesaron 8 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), fosfato de sodio (Na_2HPO_4) 1.7 g y 0.163 g de fosfato de potasio (KH_2PO_4), se aforó a un litro con agua destilada y ajustó el pH entre 7.3 y 7.4 con NaOH o HCl. La disolución de PBS se esterilizó a 1.5 lb de presión, 121 °C durante 30 min.

5.7.2. Antibióticos

Se utilizaron como antibióticos Gentamicina, Puromicina y Fungizona al 1 % para mantener los cultivos estériles.

5.7.3. Cultivo celular

Las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en crecimiento logarítmico en medio de cultivo MEM para la línea celular Hep-G2 y DMEM para las líneas celulares DU-145, MCF-7 y 3T3 a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO_2 . El medio de cultivo de las células fue cambiado cada tercer día o cuando fue necesario para mantener viable el cultivo celular hasta obtener una confluencia (número de células en diámetro determinado) del 80 al 100 %. Una vez obtenida la confluencia deseada se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavó la monocapa celular con 3 mL de PBS con la finalidad de eliminar residuos de medio de cultivo. Se adicionó 0.5 mL de suspensión de tripsina al 0.25 %, se dejó incubar por 5 min a 37 °C, durante este periodo se aseguró que la tripsina hubiera eliminado las uniones intercelulares entre las células y la placa de cultivo, observándose una suspensión celular en el microscopio invertido. Una vez obtenida una suspensión celular esta se homogenizó con 2 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina, se recuperaron y transfirieron las células a un tubo cónico de 13 mL y nuevamente se homogenizaron en 10 mL de medio. Las células fueron contadas con una cámara de Neubauer y se hicieron diluciones para obtener una densidad de 3×10^4 cel/mL.

IIQB

Para obtener el número de células en la disolución madre se utiliza la siguiente fórmula (3):

$$\text{No. de células en la disolución madre} = \frac{\# \text{ células} \times \text{Factor de volumen}}{5} \quad (3)$$

Disolución madre: Número de mililitros totales en los que se diluyeron las células recuperadas de la caja de cultivo

cél: Número de células contadas en los cinco cuadrantes

Factor de volumen (Superficie X profundidad): 10000

5: Número de cuadrantes contados

Para obtener el volumen de la disolución madre necesaria para sembrar en las placas de 96 pozos 3×10^3 cél/mL en 100 μ L de medio de cultivo en donde se aplicaron los tratamientos se utilizó la siguiente fórmula (4):

$$\text{mL de disolución madre} = 1 \text{ mL} \frac{\# \text{ células}}{\text{X mL} \# \text{ células necesarias}} \quad (4)$$

mL de disolución madre: Volumen necesario para sembrar 3×10^3 cél/mL en 100 μ L en placas de 96 pozos

1 mL: Volumen en el que se encuentran cierto número de células contadas como anteriormente se mencionó

Células: Número de células contadas en 1 mL de la disolución madre

X mL: mL de medio de la disolución madre necesarios para sembrar 3×10^3 cél/mL en 100 μ L en placas de 96 pozos

IIQB

Células necesarias: Número total de células necesarias para sembrar 3×10^3 cél/mL en 100 μ L

Se inocularon 3×10^3 cél/mL en 100 μ L de medio de cultivo, en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 24 h se retiró el medio, se adicionaron 97 μ L de medio fresco y se asignaron 3 pocillos para cada tratamiento, en cada pocillo se adicionaron 3 μ L de alguno de los compuestos ó 5-FU (5-fluorouracilo) disueltos en DMSO al 3.0 % para obtener una concentración final en cada pocillo de 1, 10 y 100 μ g/mL (Monks *et al.*, 2002). Se usó el medio de cultivo y el DMSO al 3.0 % como controles negativos. Se dejó incubar los compuestos y el medio de cultivo celular por 48 h después del cual se realizó la determinación del crecimiento celular por el método de MTT (Esteves-Souza *et al.*, 2002). En los tratamientos que se observó una concentración letal cincuenta (CL₅₀) menor a 100 μ g/mL se realizaron diluciones a concentraciones de 1, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g/mL y se incubaron en el medio de cultivo celular por 48 h después del cual nuevamente se realizó la determinación del crecimiento celular por el método de MTT. Para los tratamientos en los que se aplicó luz UV-A de igual manera se inocularon 3×10^3 cél/mL en 100 μ L de medio de cultivo, en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 24 h se retiró el medio, se adicionaron 97 μ L de medio fresco y se asignaron 3 pocillos para cada tratamiento, en cada pocillo se adicionaron 3 μ L de alguno de los compuestos ó 5-FU (5-fluorouracilo) disueltos en DMSO al 3.0 % para obtener una concentración final en cada pocillo de 1, 10 y 100 μ g/mL (Monks *et al.*, 2002). Se usó el medio de cultivo y el DMSO al 3.0 % como controles negativos.

5.7.4. Aplicación de UV-A

Para los tratamientos con UV-A se dejó incubar los compuestos y el medio de cultivo celular en oscuridad durante 30 min después se expusieron las placas a luz UV-A de longitud de onda Uv larga (315-400 nm) con una lámpara Handheld Uv Lamp modelo UVGL-58, P/N 95-0007-05 ha, 365 nm Uv/ 6-watt/ 115 V~ 60 Hz, marca UVP-ultra-violet products en un cuarto oscuro (Wang *et al.*, 2007). Se realizó la determinación del crecimiento celular por el método de MTT (Esteves-Souza *et al.*, 2002).

5.7.5. Método de MTT

Después de 48 h para los tratamientos sin UV-A e inmediatamente para los tratamientos expuestos durante treinta minutos a luz UV-A se determinó la proliferación celular por el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para lo cual se añadieron 20 μL de MTT (5 mg/mL en PBS) por pozo, se incubó durante 4 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, se retiró el medio de cultivo con el MTT y finalmente se adicionaron 50 μL de DMSO para solubilizar los cristales de formazan (Fig. 14). El producto colorido (violeta) de la reacción se midió a 595 nm en un lector de ELISA (Martínez *et al.*, 2001).

El ensayo del MTT está basado en la inhibición de la reducción de la sal de tetrazolio (amarilla) a azul de formazán (violeta), insoluble (Fig. 12). Esta reducción se produce como consecuencia de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas (Alzamora *et al.*, 2007).

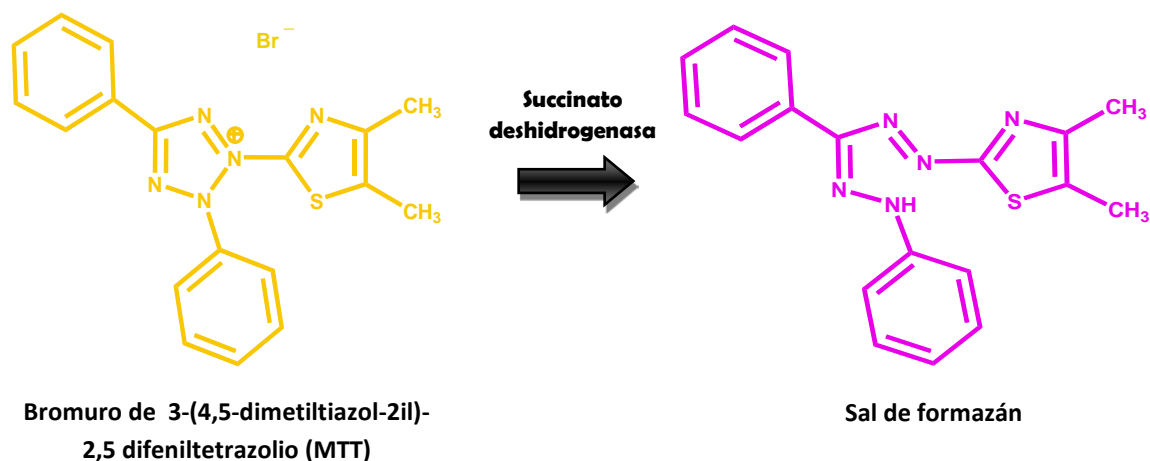


Fig. 12. Reacción de la reducción del MTT a sal de Formazán.

Una vez obtenidas las lecturas del espectrofotómetro se obtuvo el porcentaje de viabilidad de la muestra con la siguiente fórmula (5):

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{D.O.M.} \times 100}{\text{D.O.C.}} \quad (5)$$

En donde **D.O.M.** es la densidad óptica de las células tratadas con los compuestos puros con o sin luz UV-A y la **D.O.C.** es la densidad óptica de las células control en las que fue adicionado el DMSO (**Villavicencio et al., 2008**).

Con los valores porcentuales de viabilidad celular se calculó en porcentaje de mortalidad con la siguiente formula:

$$\% \text{ de mortalidad} = 100 - \% \text{ de viabilidad}$$

En donde el % de viabilidad es el valor obtenido de las densidades ópticas de las células tratadas y no tratadas con la formula anterior. Con los valores porcentuales de mortalidad celular y las concentraciones evaluadas se elaboraron gráficas concentración-efecto graficando en las abscisas la concentración de los compuestos ó 5-FU con o sin UV-A y en el eje las ordenadas el porcentaje de mortalidad celular. Sobre las curvas obtenidas a diferentes concentraciones como máxima de 100 µg/mL se estimó la concentración letal cincuenta (CL₅₀), que se definió como la concentración de los compuestos igual o menor a 100 µg/mL que redujo la viabilidad de las células tratadas al 50 % (**Villavicencio et al., 2008**).

El 5-fluorouracilo (Fluorouracil®, Efudex®, Fluoroplex®) es un fármaco de quimioterapia anticanceroso ("antineoplásico" o "citotóxico") y se le clasifica como "anti metabolito". El 5-FU se ha utilizado eficazmente en el tratamiento de cáncer de colon rectal, páncreas, mama, cabeza, cuello, gástricos y de ovario (**Pinedo et al., 1988**). El 5-FU bloquea la síntesis de ADN por la inhibición de la enzima timidilato sintasa (TS) y es comúnmente usado como un antagonista de pirimidinas bloqueando la formación de los nucleótidos de pirimidina normales y al interferir con la síntesis de ADN después de su incorporación en una cadena creciente de ADN.

Sin embargo, la quimioresistencia sigue siendo uno de los principales obstáculos para el éxito de la quimioterapia con 5-FU (**Guo et al., 2008**). Las estructuras de las bases normales de pirimidinas y la del 5-FU se muestran en la figura 13.

IIQB

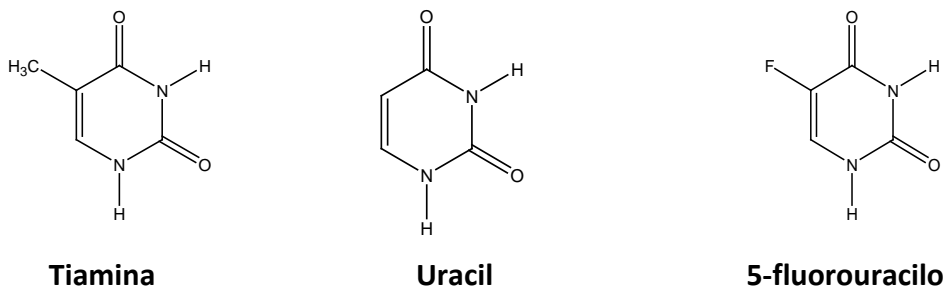


Fig. 13. Estructuras de las bases normales de pirimidinas y del 5-fluorouracilo

5.8. Análisis estadístico

Para la determinación de la dosis letal cincuenta y su comparación mediante la prueba t-student se utilizó el programa SigmaPlot 11.0.

6. Resultados

6.1. Obtención de los extractos hexánicos de *T. lucida*

En el cuadro 17 se presenta el peso en gramos de la hoja y raíz de *T. lucida* macerados así como el peso de los extractos obtenidos y el rendimiento. Se observó un rendimiento similar para el caso de la hoja y la raíz con 0.95 y 1.0 %, respectivamente. A partir de los 10 g del extracto hexánico de hoja y 6 g del extracto hexánico de raíz se realizó la purificación de las cumarinas y bitiofenos mayoritarios.

Cuadro 17. Rendimiento de la maceración en hexano de la hoja y raíz de *T. lucida*

Rendimiento de la maceración de hoja (A) y raíz (B) de <i>T. lucida</i>			
	Peso	Extracto obtenido	Rendimiento
	g	g	%
A)	1050	10	0.95
B)	600	6	1.0

6.2. Obtención de los compuestos mayoritarios de los extractos hexánicos de hoja y raíz de *T. lucida*

Se aisló un compuesto mayoritario de las fracciones 45 a la 48 con polaridad 80:20 de hexano con respecto acetato de etilo. En el cuadro 18 se muestran el número de fracciones y la polaridad en la que se purificó el primer compuesto mayoritario del extracto hexánico de hoja. Marcado en color rojo el número de fracciones en las que se obtuvo, haciendo énfasis en que comenzó su purificación en la fracción 45 y continuó hasta la fracción 48. Se aisló un segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico de hoja de las fracciones 19 a la 22 con polaridad 40:60 de hexano con respecto acetato de etilo. En el cuadro 19 se muestra el número de fracciones así como la polaridad en la que se purificó el segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico de hoja. Marcado en color rojo el número de fracciones en las que se obtuvo, comenzando su purificación en la fracción 19 y continuando hasta la fracción 22.

Cuadro 18. Columna del extracto hexánico de hoja para el aislamiento del primer compuesto mayoritario

Polaridad de la fase móvil (%)		Fase móvil por polaridad (mL)	Número de fracción
Hexano	Acetato de etilo		
100	0	150	1 – 20
94	6	100	21 – 38
90	10	50	39 – 45
80	20	50	46 – 53
76	24	50	54 – 61
70	30	50	62 – 69
66	34	50	70 – 76
60	40	50	77 – 84
56	44	50	85 – 91
50	50	50	92 – 98
40	60	50	99 – 106
30	70	50	107 – 113

Cuadro 19. Columna del extracto hexánico de hoja para el aislamiento del segundo compuesto mayoritario

Polaridad de la fase móvil (%)		Fase móvil por polaridad (mL)	Número de fracción
Hexano	Acetato de etilo		
100	0	80	1 – 9
70	30	50	10 – 14
50	50	50	15 – 18
40	60	50	19 – 22
30	70	50	23 – 27
15	75	30	28 – 30
0	100	20	31 – 33

Del extracto hexánico de raíz se aisló mediante cromatografía en columna de las fracciones 5 a la 8 con una polaridad 100:00 de hexano con respecto acetato de etilo un compuesto mayoritario. Marcado en color rojo las fracciones en las que se aisló el primer compuesto mayoritario del extracto hexánico de raíz (cuadro 20).

Cuadro 20. Columna del extracto hexánico de raíz para el aislamiento del primer compuesto mayoritario

Polaridad de la fase móvil (%)		Fase móvil por polaridad (mL)	Número de fracción
Hexano	Acetato de etilo		
100	0	100	1- 8
94	6	100	14 – 27
90	10	50	28 – 34
80	20	50	35 – 41
76	24	50	42 – 47
70	30	50	48 – 54
70	30	50	55 – 61
50	50	50	62 – 69
40	60	50	70 – 75
20	80	50	76 – 81
0	100	50	82 – 87

Se aisló un segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico de raíz de las fracciones 17 a la 19 con una polaridad 91:9, 80:20 y 50:50 de hexano, cloruro de metileno y acetato de etilo, en el cuadro 21 se muestra el número de fracciones así como la polaridad en la que se purificó el segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico de raíz. Marcado en color rojo el número de fracciones en las que se obtuvo.

Cuadro 21. Columna del extracto hexánico de raíz para el aislamiento del segundo compuesto mayoritario

Polaridad de la fase móvil (%)			Fase móvil por polaridad (mL)	Número de fracción
Hexano	Cloruro de metileno	Acetato de etilo		
100	0	0	10	1
100	0	0	20	2
80	20	0	10	3
70	30	0	10	4
60	40	0	20	5-6
40	60	0	10	7

IIQB

30	70	0	10	8
20	80	0	40	9-13
0	100	0	10	14
0	90	10	10	15
0	90	10	10	16
91	0	9	11	17
80	0	20	10	18
50	0	50	10	19

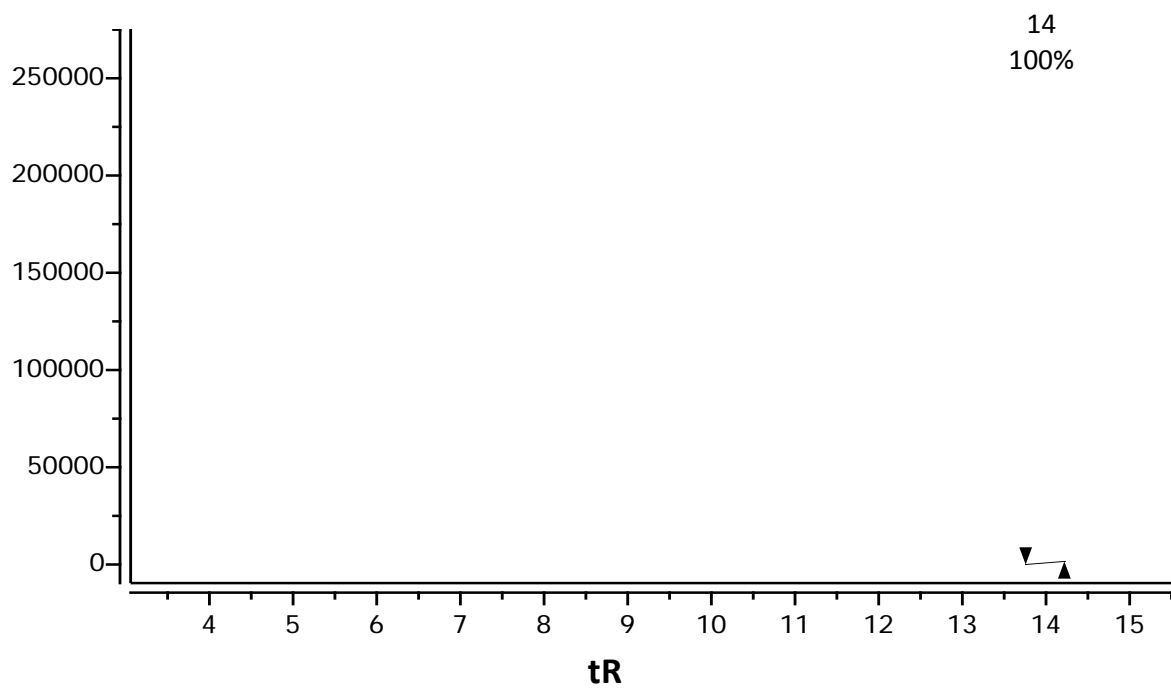
6.3. Análisis espectroscópico de los compuestos mayoritarios aislados del extracto hexánico de hoja

6.3.1. Análisis espectroscópico del primer compuesto aislado del extracto hexánico de hoja

En la figura 14A, se muestra el cromatograma de gases del primer compuesto mayoritario aislado del extracto hexánico de hoja. En el cromatograma de gases se observa un señal con un tiempo de retención de 13.95 min y con un enriquecimiento del 100%. El espectro de masas del primer compuesto mayoritario muestra un ión molecular de 176 uma (Fig. 14.B). El primer compuesto mayoritario se identificó con ayuda de ensayos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear como 7-metoxi cumarina.

IIQB

A)



B)

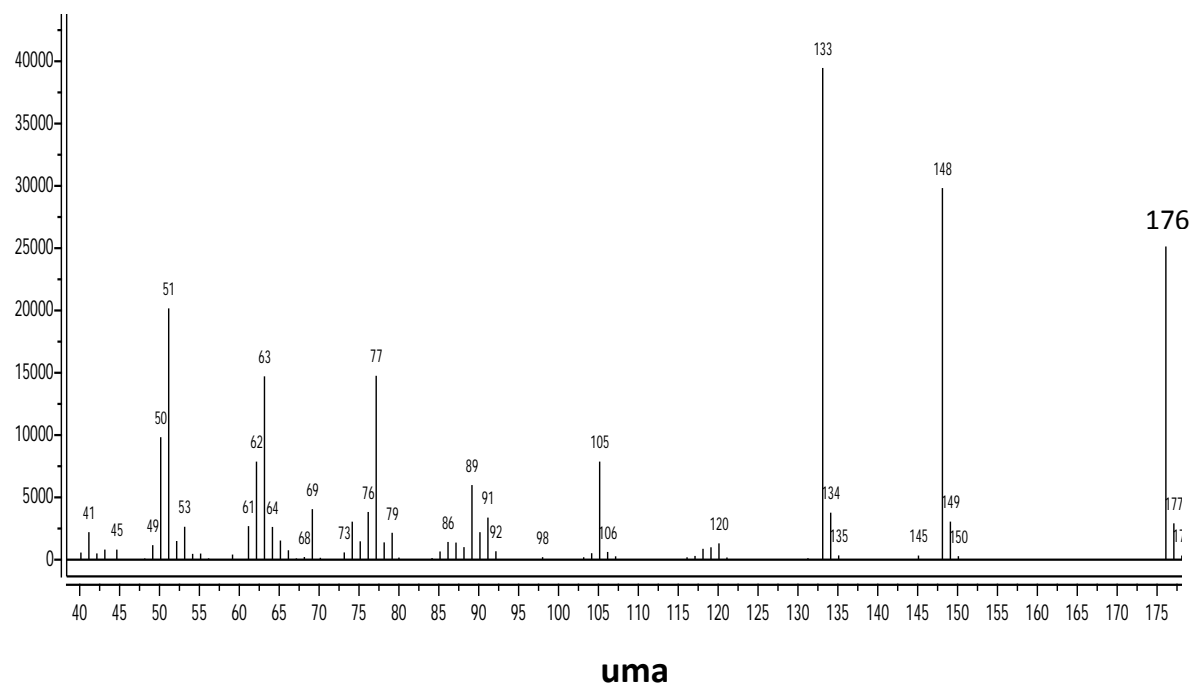


Fig. 14. Cromatograma de gases del primer compuesto aislado del extracto hexánico de hoja **A)**. Espectro de masas **B)**.

IIQB

En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 15) se observa una señal doble en 7.63 ppm que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{cis} = 9.4$ Hz correspondiente al H-4. En 7.39 ppm se observa una señal doble que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{orto} = 8.5$ Hz correspondiente al H-5 mientras que a 6.88 ppm se observa una señal doble de dobles que integra para un protón correspondiente al H-6 con una constante de acoplamiento $J_{meta} = 2.5$ Hz con el H-8 y con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 8.5$ Hz con H-5. En 6.87 ppm se observa una señal doble que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{meta} = 2.5$ Hz que corresponde al H-8 y en 6.24 ppm una señal doble que integra para un hidrógeno que corresponde al H-3 con una constante de acoplamiento de $J_{cis} = 9.4$ Hz. Desplazado hacia campo más alto en 3.90 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones característica de un grupo metoxilo.

En el espectro de ^{13}C (Fig. 16) se observan señales características de carbonos aromáticos que van desde 100.24 ppm a 162.05 ppm con una señal en 55.20 ppm para el carbono de un grupo metoxilo. El desplazamiento de las señales con sus carbonos respectivos se muestra en el cuadro 22.

Las asignaciones para los hidrógenos fueron realizadas en base al experimento COSY (Fig. 17) tomando la señal asignada para el H-3 como referencia, localizada en 6.25 ppm observamos que tiene correlación con la señal ubicada en 7.63 ppm la cual corresponde al hidrógeno H-4 vecino de H-3. Continuando con la asignación de señales observamos una señal en 6.86 ppm que corresponde al H-6 que tiene una correlación con una señal en 7.39 ppm por lo que la asignamos al H-5. De igual manera se realizaron las asignaciones de los hidrógenos restantes.

A)

IIQB

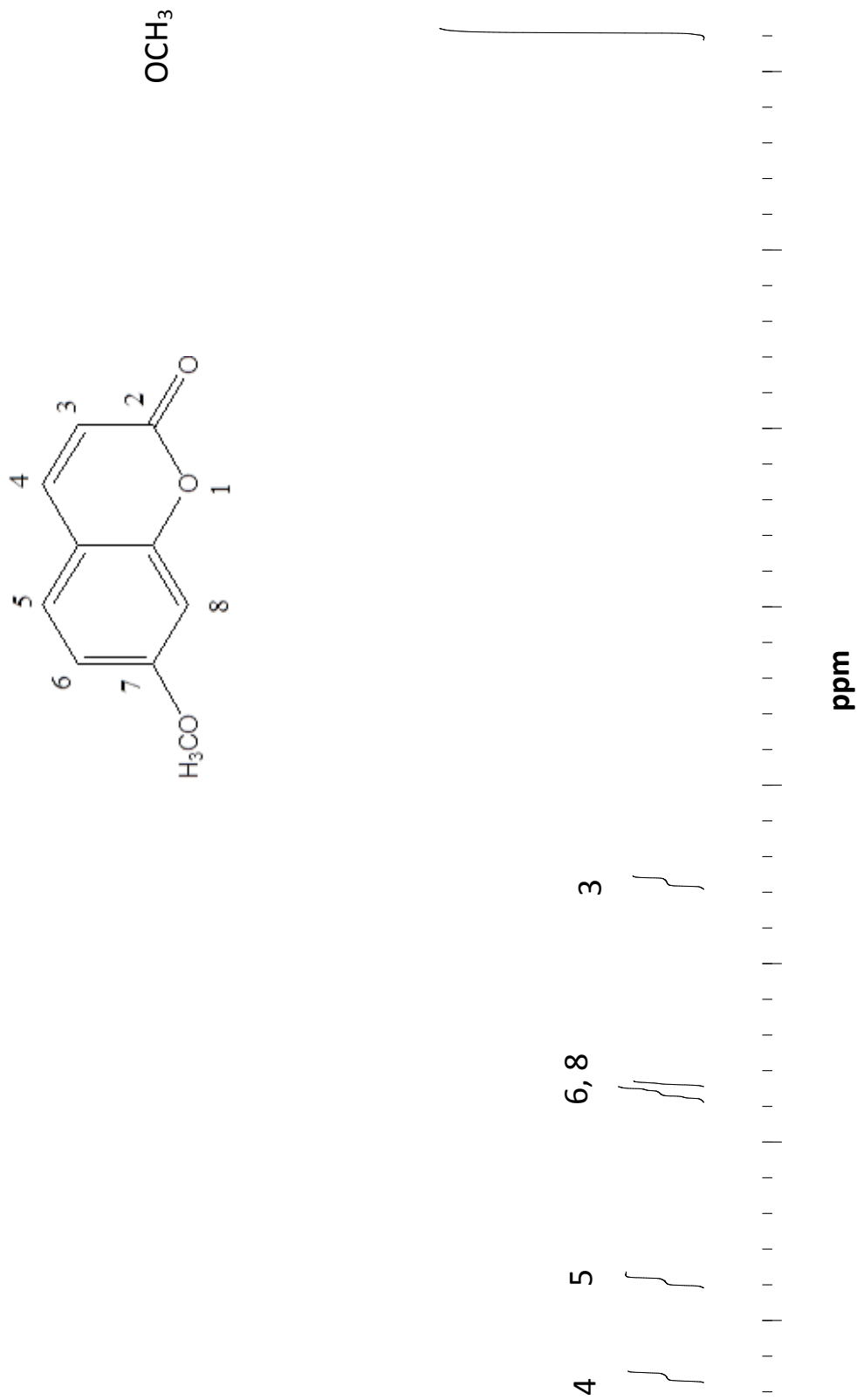


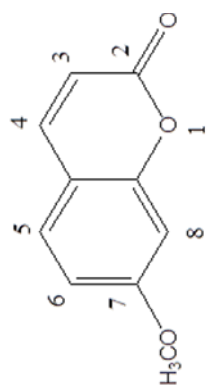
Fig. 15. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 7-metoxi cumarina

IIQB

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento HETCOR (Fig. 18). Así por ejemplo, la señal en 7.63 ppm en la escala de hidrógeno asignada para H-4 correlaciona con la señal en 142.84 ppm en escala de carbono, por lo tanto esta señal corresponde a C-4. De igual manera la señal en 7.39 ppm correspondiente al H-5 correlaciona con la señal en 128.16 ppm por lo que es asignado al C-5. En 6.86 ppm se encuentra en la escala de hidrógeno una señal para H-6 que al extrapolar nos permite identificar al C-6 en 112.25 ppm en la escala de carbono. Muy cercana a esta señal en 6.82 ppm se encuentra una señal que corresponde al H-8 la cual correlaciona en 100.24 ppm con una señal que asignamos al C-8. En 6.25 ppm de la escala de hidrógeno se encuentra la señal para H-3 que correlaciona en 112.30 ppm con una señal la cual es asignada al C-3. Desplazado a campo más alto dentro de las escalas encontramos un hidrógeno de un metoxilo en 3.90 ppm que correlaciona con una señal en 57 ppm la cual corresponde al carbono metilo del metoxilo. De acuerdo a las pruebas espectroscópicas el primer compuesto mayoritario del extracto hexánico de hoja es la 7-metoxi cumarina.

Cuadro 22. Desplazamiento de ^{13}C -RMN a 400MHz de la 7-metoxi cumarina

Carbono	Desplazamiento (δ ppm)
C-7	162.05
C-2	161.04
C-4a	155.32
C-4	142.84
C-5	128.16
C-8a	112.51
C-3	112.30
C-6	112.25
C-8	100.24



5 8a, 3, 6 8

4

7

2



Fig. 16. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C, de la 7-metoxi cumarina

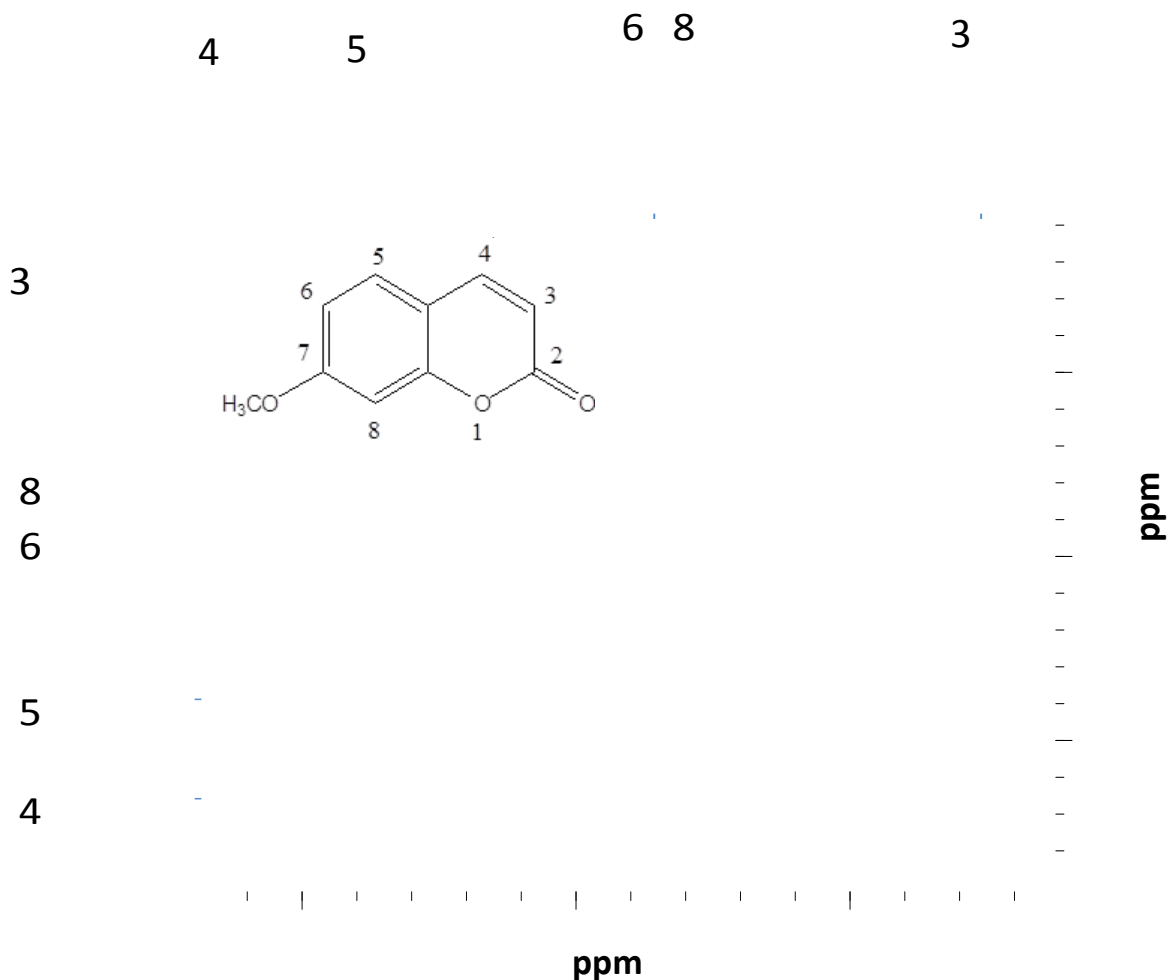


Fig. 17. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi cumarina

6.3.2. Análisis espectroscópico del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de hoja

En la figura 19 A, se muestra el cromatograma de gases del segundo compuesto mayoritario aislado del extracto hexánico de hoja. En el cromatograma de gases se observa una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 16.79 min y con un enriquecimiento de más del 95%. El espectro de masas de la segunda cumarina aislada nos muestra un ión molecular de 206 uma (Fig. 19.B). Con los datos de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno y Carbono del segundo compuesto mayoritario del extracto hexánico de hoja observamos que presenta una fórmula química condensada $C_{11}H_{10}O_4$

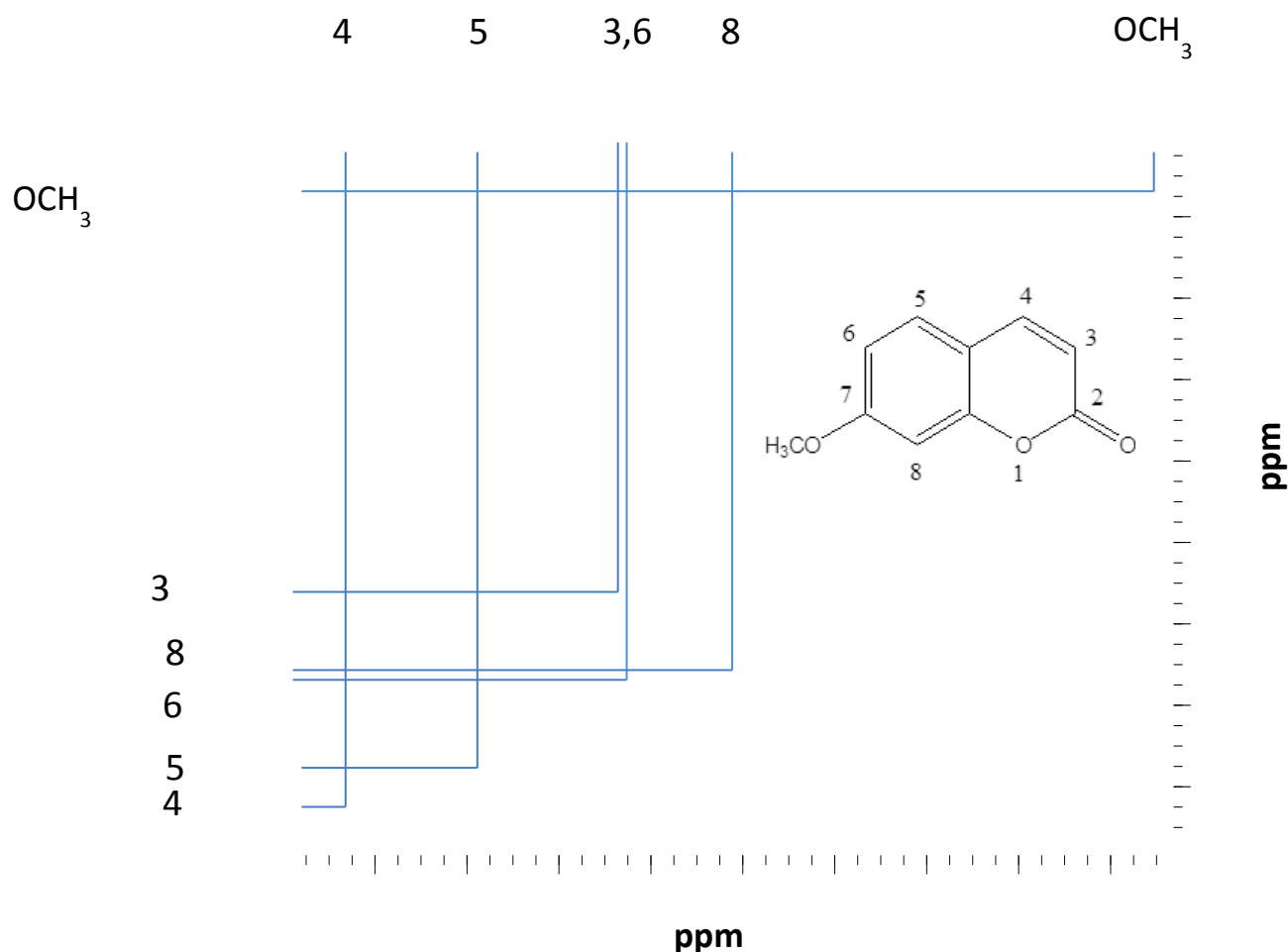


Fig. 18. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi cumarina

En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 20) se observa una señal doble en 7.63 ppm que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{cis} = 10.0$ Hz con el H-3 que corresponde al H-4. En 6.86 ppm se observa una señal simple que integra para un protón correspondiente al H-5. En 6.84 ppm se observa una señal simple que integra para un protón que corresponde al H-8 y en 6.30 ppm una señal doble que integra para un hidrógeno con una constante de acoplamiento de $J_{cis} = 10.0$ Hz que corresponde al H-3. Desplazado hacia campo más alto en 3.95 y 3.90 ppm se observan dos singuletes que corresponden a protones unidos a heteroátomos que integran para tres protones cada uno de estos y que corresponden a dos grupos metoxilo.

IIQB

En el espectro de ^{13}C (Fig. 21) se observan señales características de carbonos aromáticos que van desde 99.95 ppm a 161.35 ppm con una señal en 56.31 ppm para los carbonos de los grupos metoxilos. El desplazamiento de las señales con sus carbonos respectivos se muestra en el cuadro 23.

Para la asignación de los hidrógenos del segundo compuesto mayoritario se utilizó el experimento COSY (Fig. 22) tomando la señal asignada para el H-3 como referencia. La señal del H-3 se encuentra localizada en 6.30 ppm y tiene correlación con la señal ubicada en 7.63 ppm la cual corresponde al hidrógeno vecino, H-4.

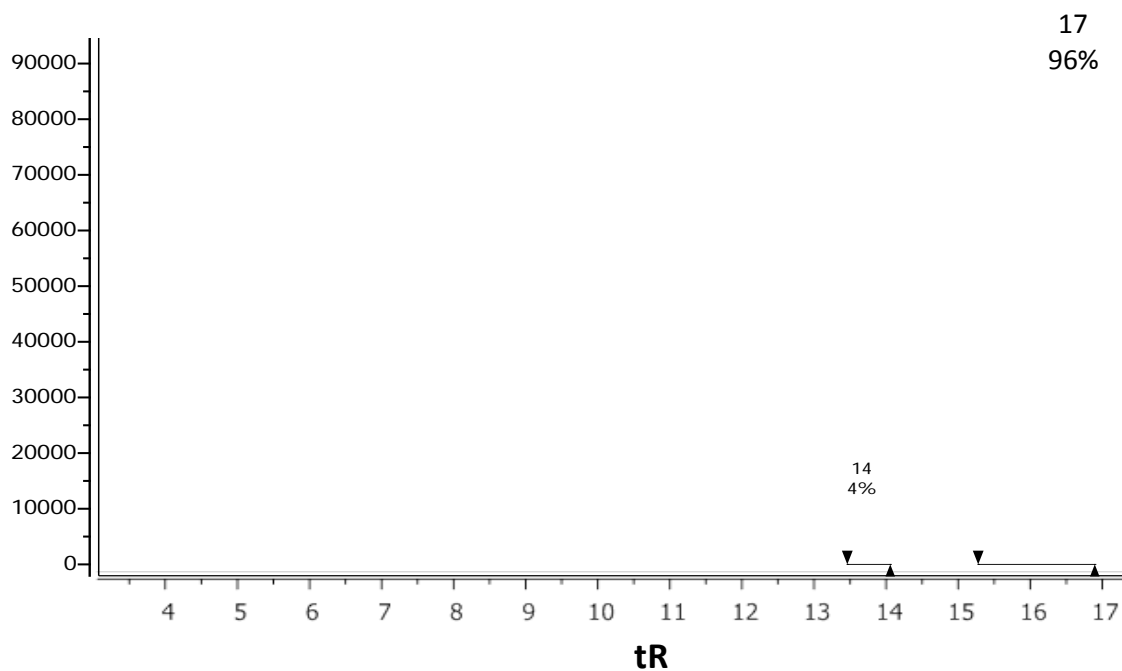
Cuadro 23. Desplazamiento de ^{13}C -RMN a 400MHz de la 6,7-dimetoxi cumarina

Carbono	Desplazamiento (δ ppm)
C-2	161.35
C-7	152.80
C-6	149.96
C-8a	146.29
C-4	143.31
C-3	113.02
C-4-a	111.38
C-5	107.94
C-8	99.95

El espectro de RMN de ^{13}C de la segunda cumarina aislada del extracto hexánico de hoja fue asignado en base al experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) (Fig. 23). Así la señal asignada para H-4 en 7.63 ppm correlaciona con una señal en 143.31 ppm en la escala de carbono por lo que la señal corresponde al C-4. En la escala de hidrógeno en 6.86 ppm se observa una señal asignada al H-5 la cual correlaciona en 107.94 ppm en la escala de carbono con una señal que es asignada al C-5. De igual manera se siguieron las asignaciones en 99.95 ppm para el C-8 apartir de la señal de hidrógeno en 6.84 ppm, en 113.02 ppm para el C-3 apartir de la señal de H-3 en 6.30 ppm. Dentro de la escala de carbono aparece otra señal en 111.38 ppm que corresponde al C-4a la cual no presenta señal de correlación en este plano debido a que no presenta hidrógenos.

IIQB

A)



B)

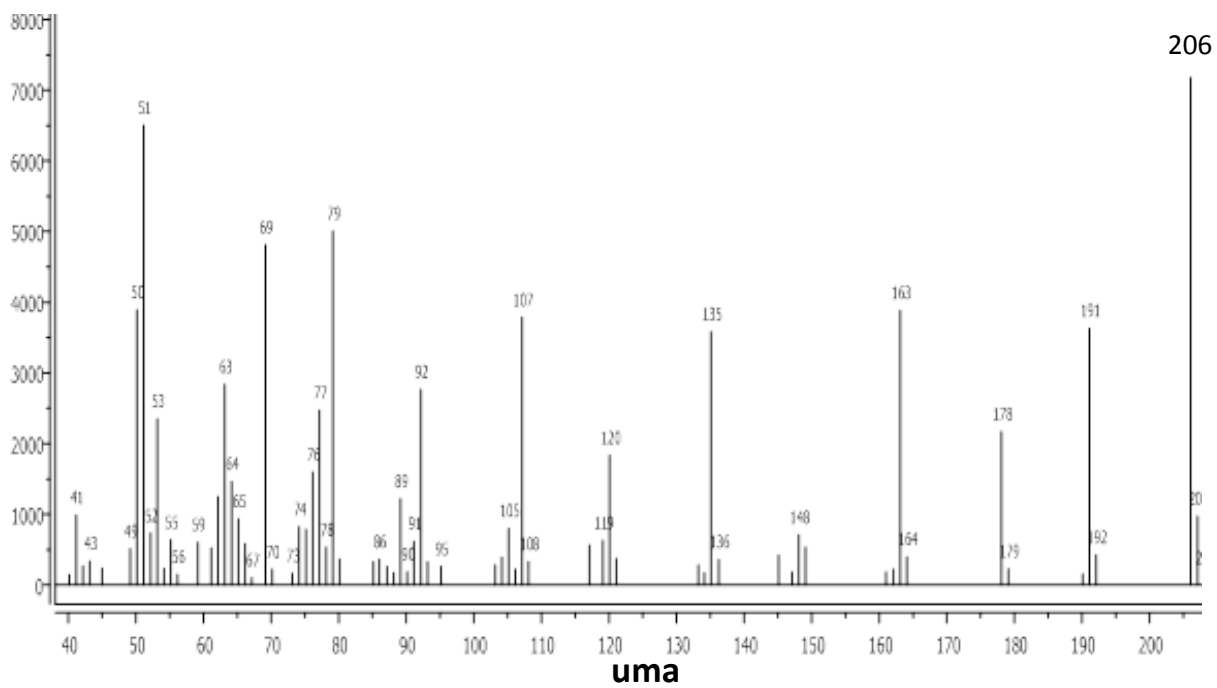


Fig. 19. Cromatograma de gases del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de hoja A). Espectro de masas B).

2(OCH₃)

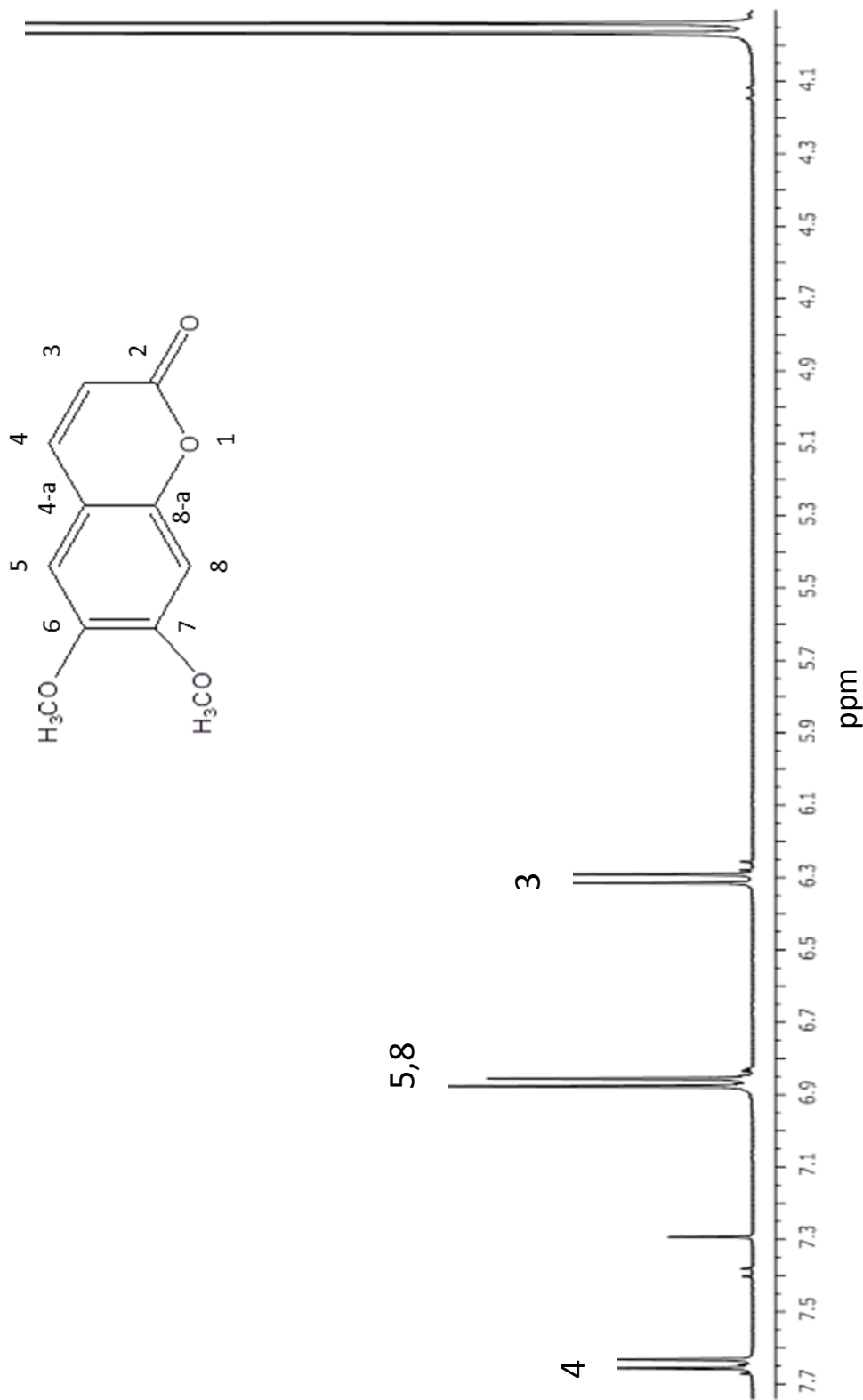


Fig. 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de la 6,7-dimetoxi cumarina

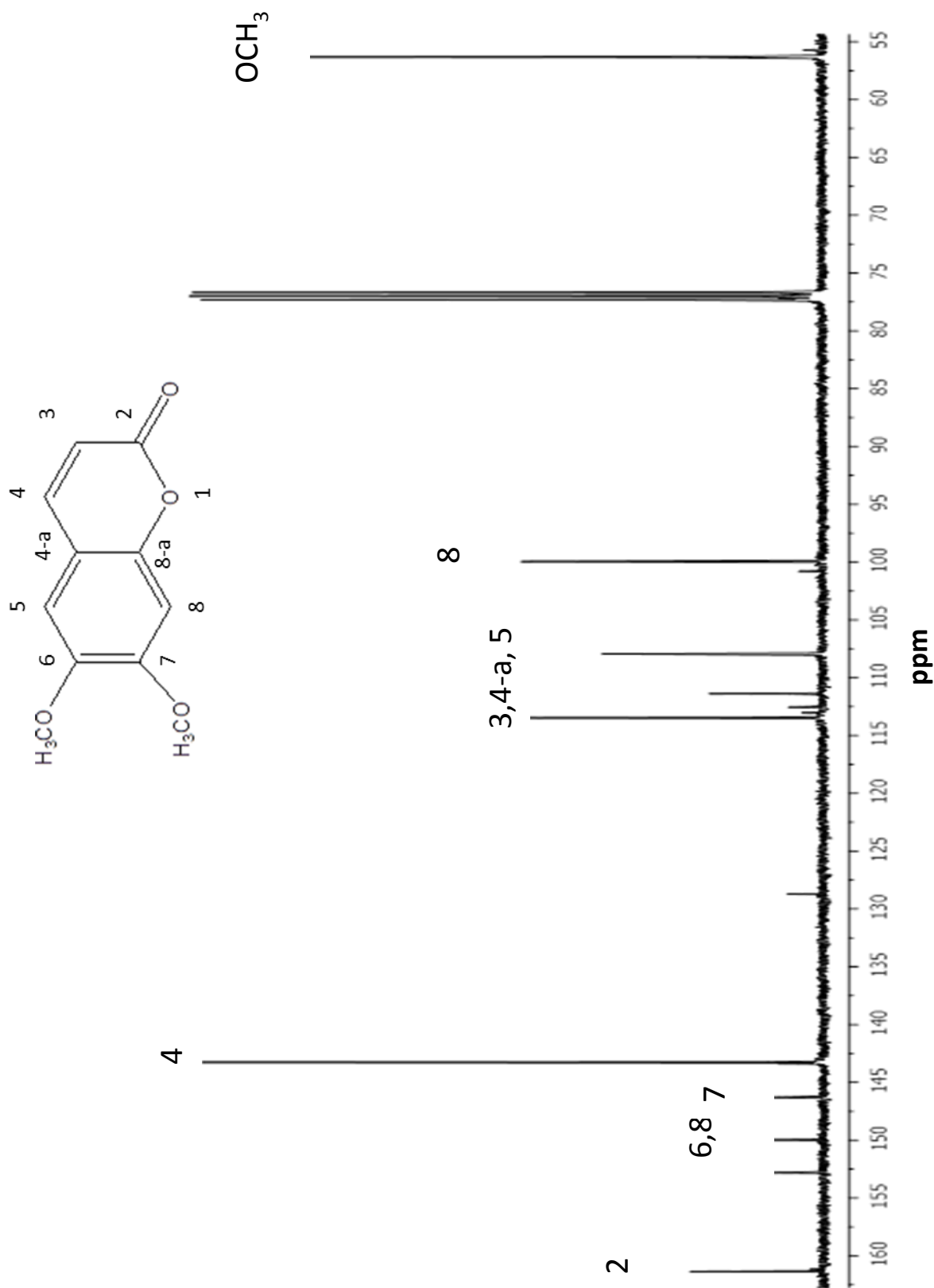


Fig. 21. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , de la 6,7-dimetoxi cumarina

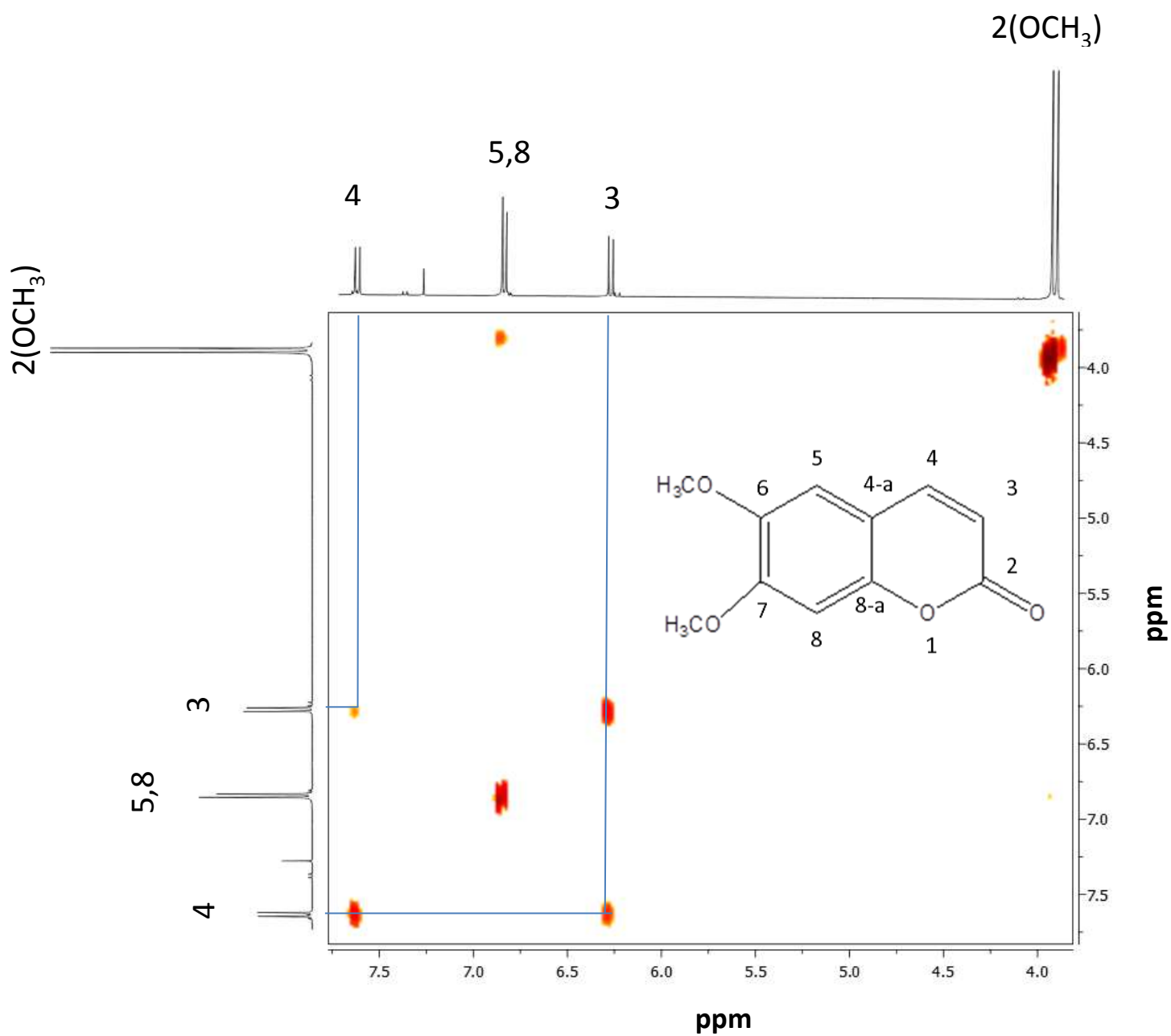


Fig. 22. Espectro de correlación homonuclear (COSY) de la 6-7-dimetoxi cumarina

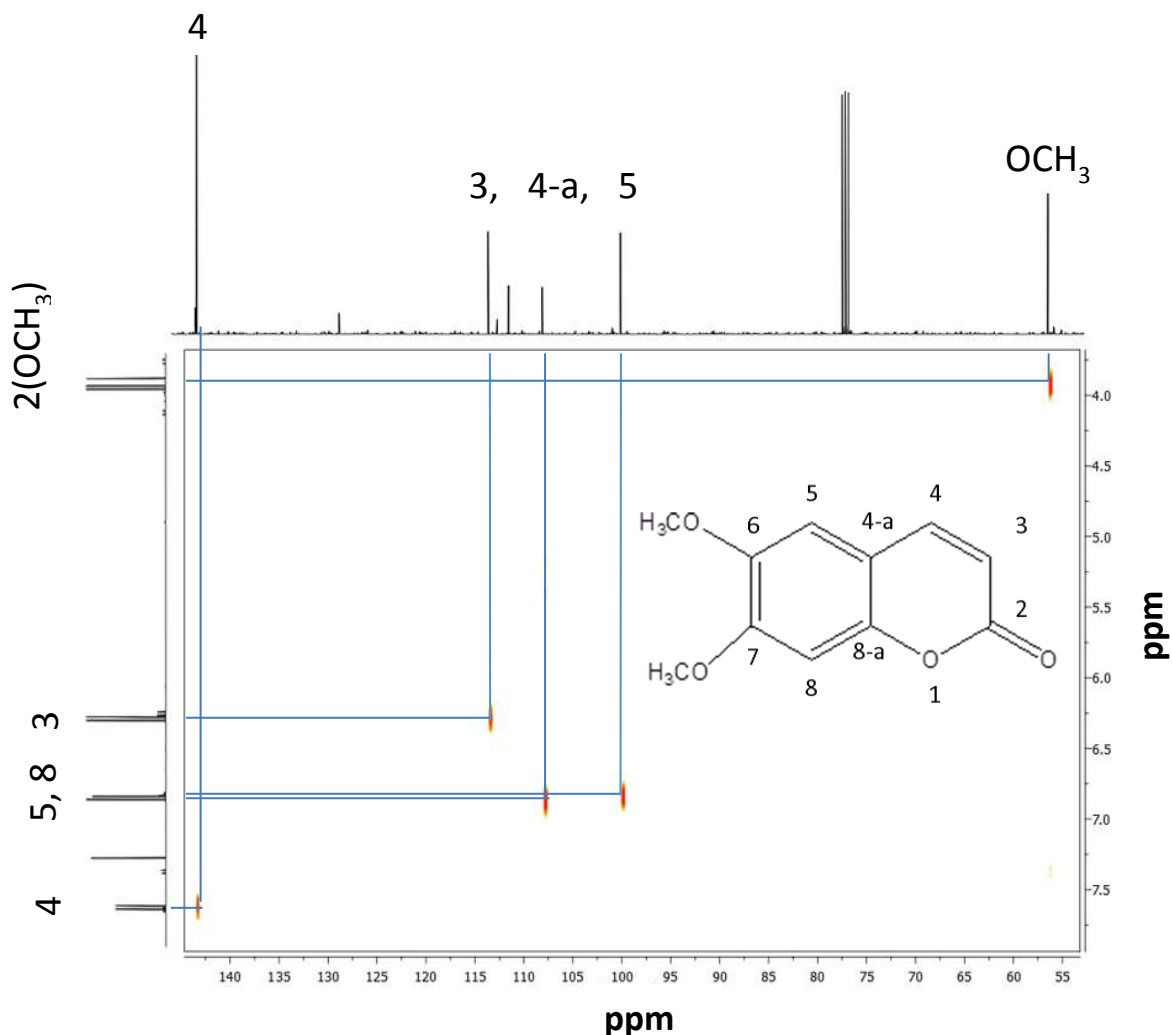


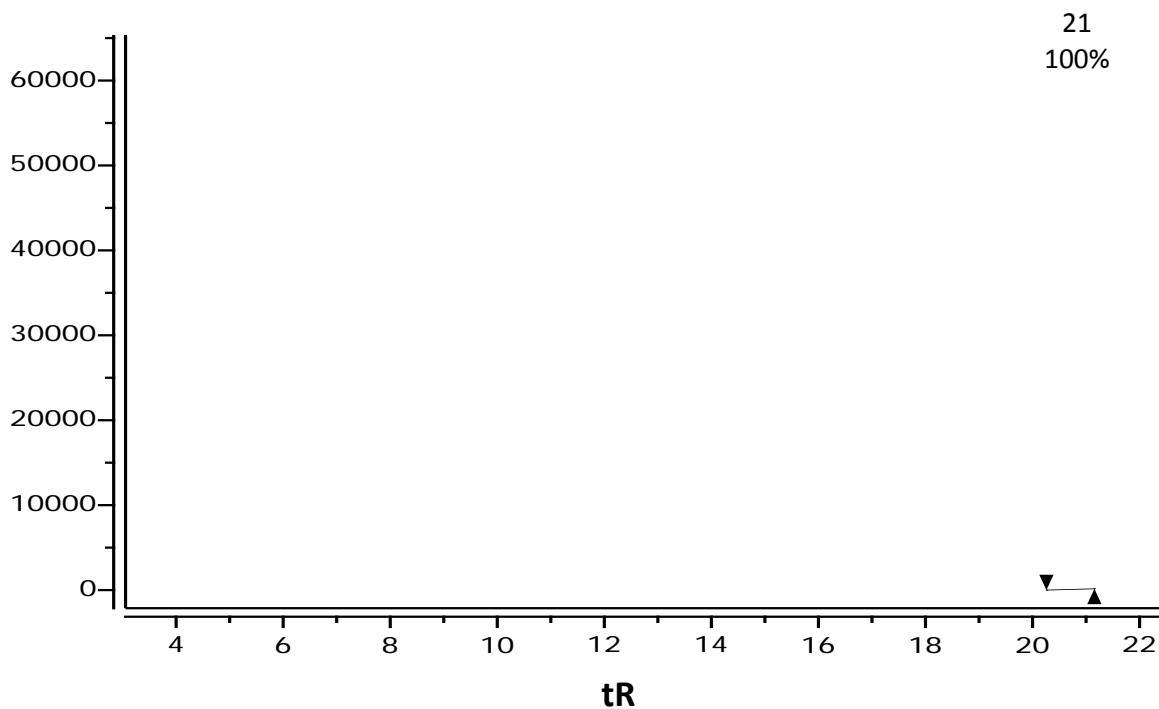
Fig. 23. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 6,7-dimetoxi cumarina

6.3.3. Análisis espectroscópico del primer compuesto aislado del extracto hexánico de raíz

En la figura 24. A se muestra el cromatograma de gases del primer compuesto del extracto hexánico de raíz aislado de las fracciones 5 a la 8. En el cromatograma de gases se observa una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 20.78 min y con un enriquecimiento del 100%. El espectro de masas nos muestra un patrón de fragmentación y un ion molecular de 216 uma (Fig. 24.B). Estos datos junto con la resonancia magnética nuclear de Hidrógeno y Carbono muestran que se trata de un compuesto con una fórmula química condensada $C_{12}H_8S_2$ que corresponde al 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno.

IIQB

A)



B)

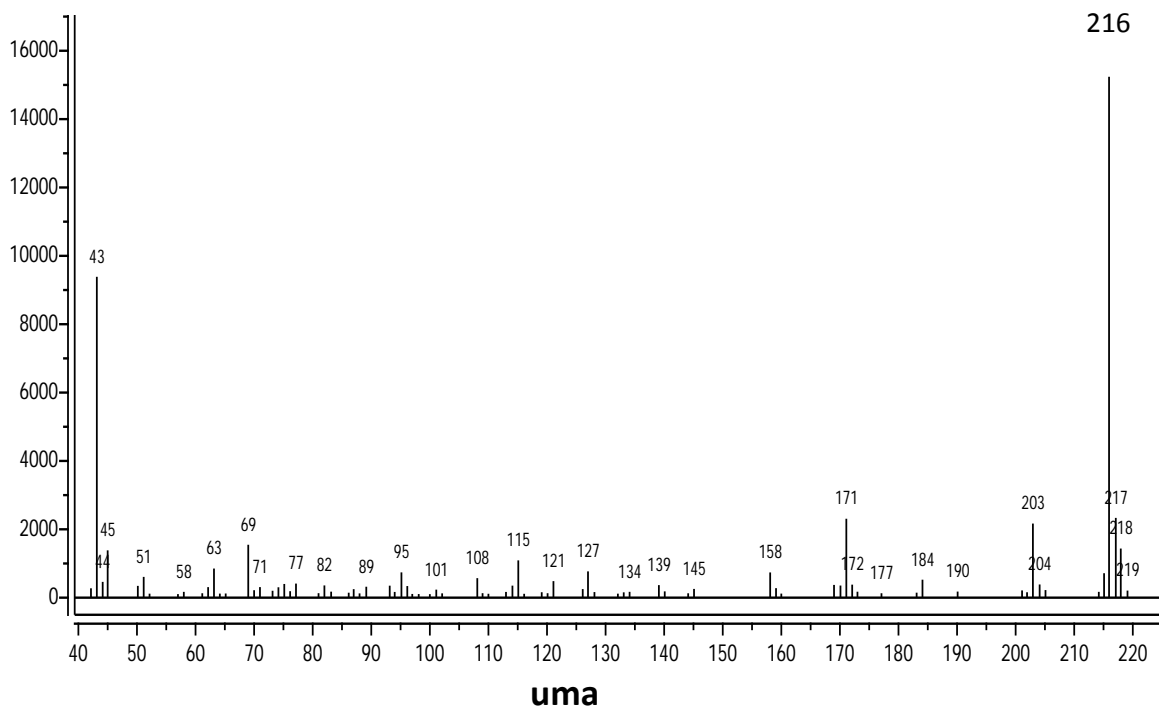


Fig. 24. Cromatograma de gases del primer compuesto aislado del extracto hexánico de raíz **A)**. Espectro de masas **B)**.

IIQB

La figura 25 nos muestra el espectro de Hidrógeno del primer bitiofeno aislado. El espectro de ^1H -RMN a 400 MHz muestra una señal doble de dobles que integra para un protón en 7.22 ppm correspondiente al H-5', con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 5.1$ Hz con H-4' y con una constante de acoplamiento $J_{meta} = 1.1$ Hz con H-3' de igual manera se observa una señal doble de dobles en 7.17 ppm que corresponde al H-3' con una integral para un protón y una constante de acoplamiento $J_{orto} = 3.6$ Hz con H-4' y una constante de acoplamiento $J_{meta} = 1.1$ Hz con H-5'. En 7.11 ppm se observa una señal doble que integra para un protón correspondiente al H-4 con una constante de acoplamiento $J = 3.8$ Hz. En 7.05 ppm una señal doble con una integral para un protón y una constante de acoplamiento $J = 3.8$ Hz que corresponde al H-3. En 7.00 ppm se observa una señal doble de dobles para H-4' con una integral para un protón y con dos constantes de acoplamiento $J_{orto} = 5.2$ Hz con H-5' y otra constante acoplamiento de $J_{orto} = 3.7$ Hz con H-3'. En 6.04 ppm se observa una señal doble de dobles con una integral para un protón que corresponde al H-8 con una constante de acoplamiento $J_{cis} = 11.2$ Hz con H-9' y con una constante de acoplamiento $J_{trans} = 17.5$ Hz con H-9. En 5.73 ppm se observa una señal doble de dobles que integra para un protón que corresponde al H-9 característico de un protón vinílico con una constante de acoplamiento $J_{trans} = 17.5$ Hz con H-8 y con una constante de acoplamiento $J_{gem} = 1.9$ Hz con H-9' y en 5.55 ppm se observa una señal doble de dobles para el H-9' con una constante de acoplamiento $J_{cis} = 11.2$ Hz con el H-8 y una constante de acoplamiento $J_{gem} = 1.9$ Hz con H-9.

En el espectro de ^{13}C (Fig. 26) se observan diez señales en el desplazamiento característico de los carbonos aromáticos que va de 110 ppm a 140 ppm. En 138.65 ppm y 136.35 ppm se observan dos señales de carbonos cuaternarios correspondientes a los carbonos 2' y 2 respectivamente, seguidas de una señal en 132.49 ppm del carbono 4. De 116 ppm a 128 ppm se observan siete señales de carbonos con dobles ligaduras y desplazado a campo más alto se observan dos señales, una señal en 92.61 ppm del carbono 6 y la otra señal en 82.88 ppm para el carbono 7, señales de dos carbonos alquinos.

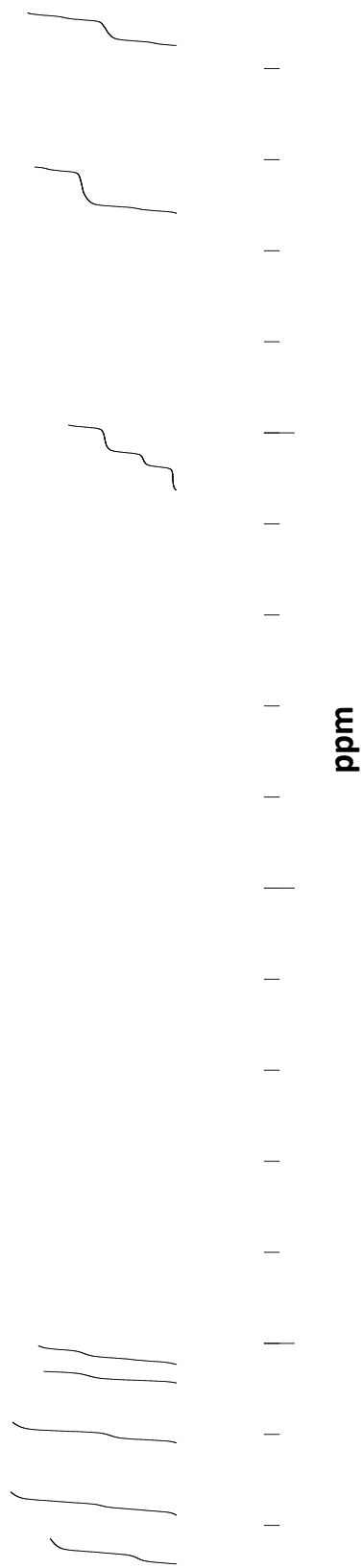
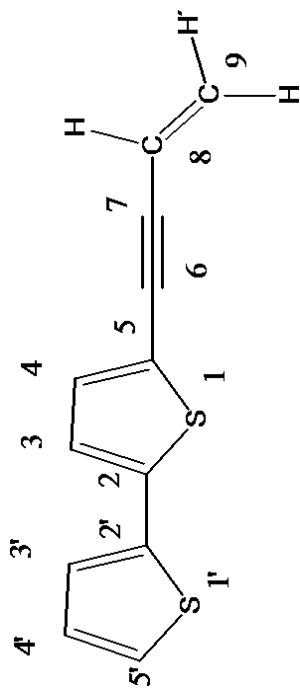
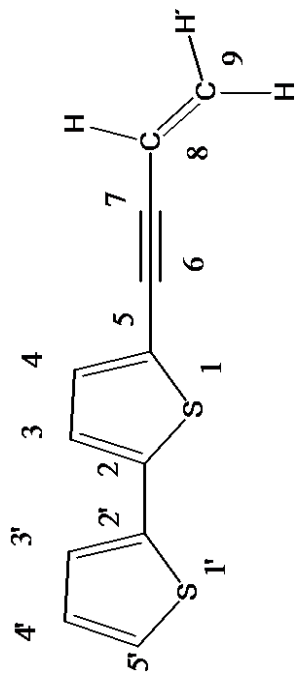


Fig. 25. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H del 5-(but-3-en-1-ynil)-5'-methyl-2,2'-bitiofeno



ppm

Fig. 26. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C, del 5-(but-3-en-1-ynil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno

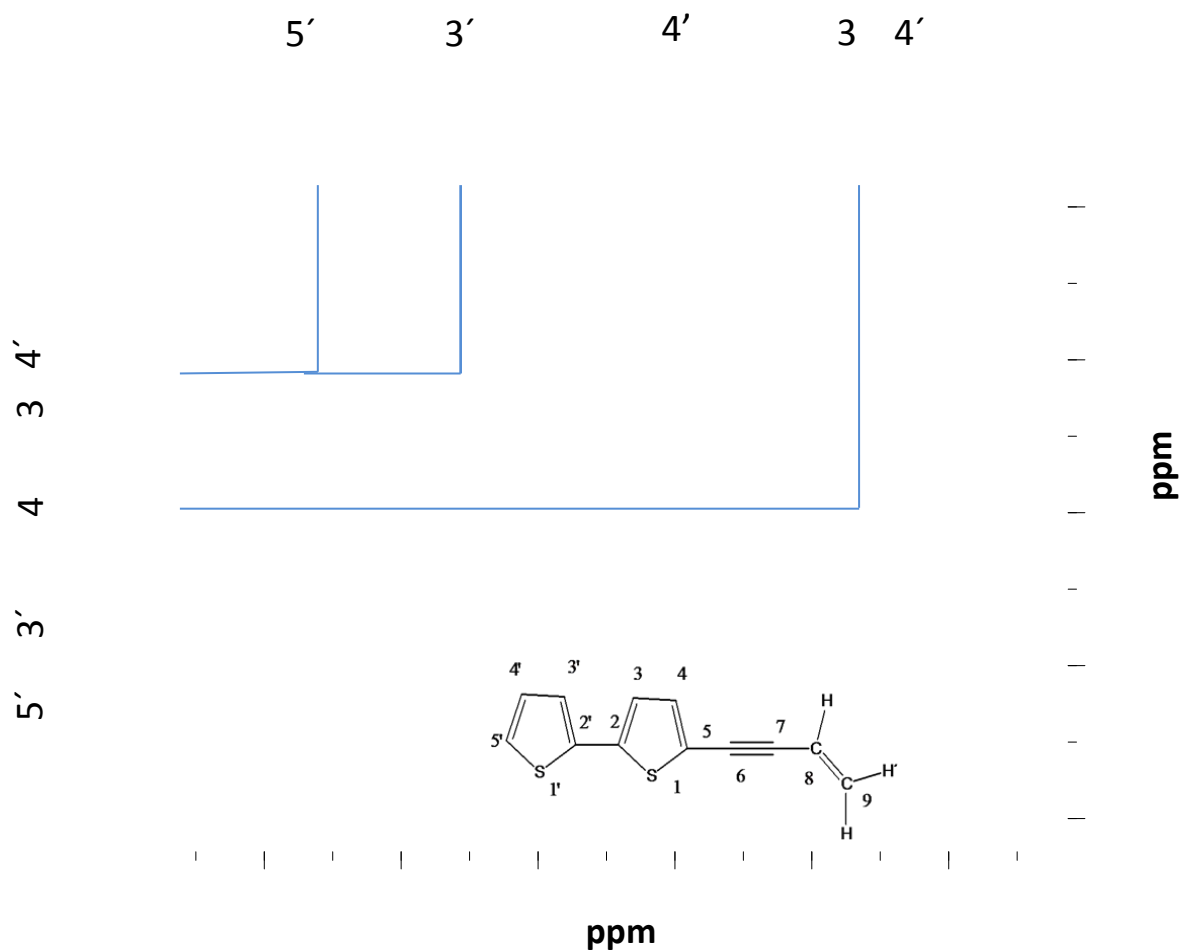


Fig. 27. Espectro de correlación homonuclear (COSY) del 5 - (But-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiopheno

Las asignaciones de los hidrógenos fueron realizadas en base al experimento de correlación homonuclear (COSY). Tomando como base la señal asignada para el H-5' en 7.22 ppm la cual correlaciona con una señal en 7.00 ppm por lo que asignamos H-4'. De igual manera la señal para H-4' en 7.00 ppm correlaciona con una señal en 7.17 ppm a la que asignamos el H-3'. En 7.05 ppm se observa la señal para el H-3 que correlaciona con una señal en 7.11 ppm correspondiente al H-4 (Fig. 27).

El espectro de RMN de ^{13}C fue asignado en base al experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) (Fig. 28). Así la señal asignada para H-5' en 7.22 ppm correlaciona con una señal en 124.68 ppm en la escala de carbono por lo que la señal corresponde al C-5'. En la escala de hidrógeno en 7.17 ppm se observa una señal asignada

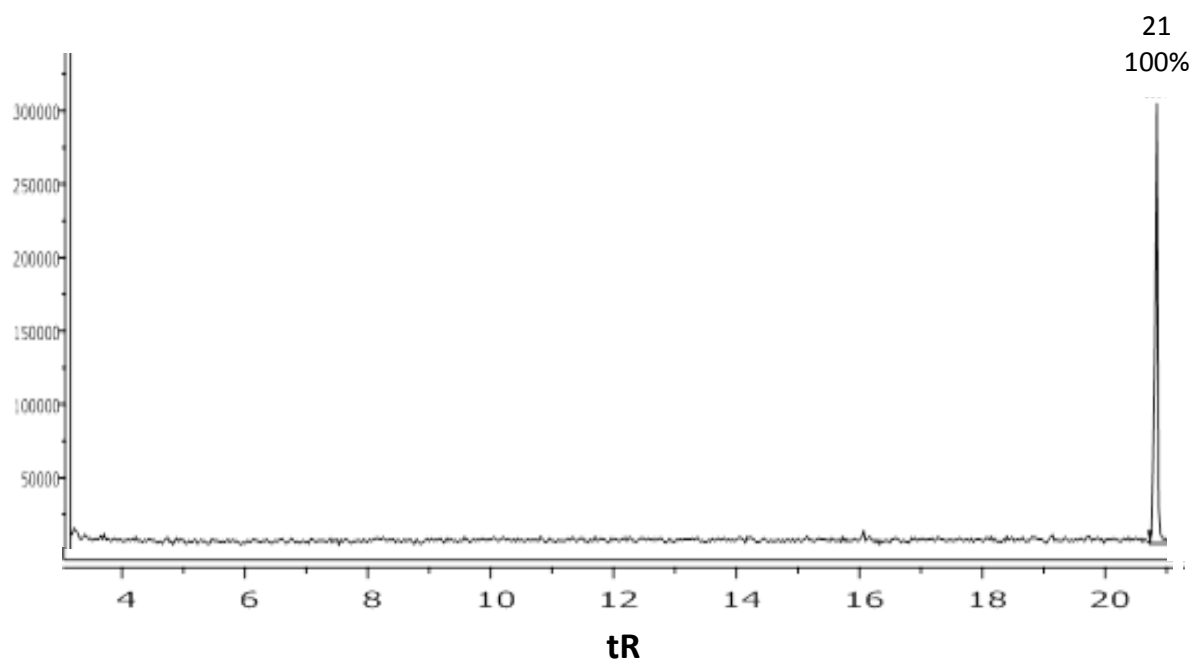
6.3.4. Análisis espectroscópico del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de raíz

Se identificó utilizando métodos espectroscópicos el segundo bitiofeno aislado de las fracciones 17 a la 19 del extracto hexánico de raíz. En la figura 29. A se muestra el cromatograma de gases del segundo bitiofeno aislado del extracto hexánico de raíz. Se observa una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 20.839 min y con un enriquecimiento del 100%. El espectro de masas del segundo compuesto mayoritario nos muestra un ión molecular de 276 uma (Fig. 29. B) que corresponde al 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno.

En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz se observa una señal doble de dobles que integra para un protón en 7.22 ppm correspondiente al H-5', con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 5.1$ Hz con H-4' de igual manera se observa una señal doble de dobles en 7.16 ppm que corresponde al H-3' con una integral para un protón y una constante de acoplamiento $J_{orto} = 3.6$ Hz con H-4'. En 7.04 ppm se observa una señal doble que integra para un protón correspondiente al H-6 con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 3.8$ Hz con el H-3. En 7.01 ppm se observa una señal doble de doble con una integral para un protón que corresponde al H-4' y una constante de acoplamiento $J = 5.1$ Hz con respecto al H-5'. En 7.00 ppm se observa una señal doble para el H-3 con una integral para un protón y una constante de acoplamiento $J_{orto} = 3.8$ Hz con el H-4. En 4.25 ppm se observa una señal triple con una integral para un protón que corresponde al H-9 con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 6.9$ Hz con el H-8. En 2.79 ppm se observa una señal triple que integra para dos protones que corresponde al H-8 con una constante de acoplamiento $J_{orto} = 6.9$ Hz con H-9. En 2.10 ppm se encuentra un singulete que integra para tres protones y que corresponde al H-AcO (Fig. 30)

IIQB

A)



B)

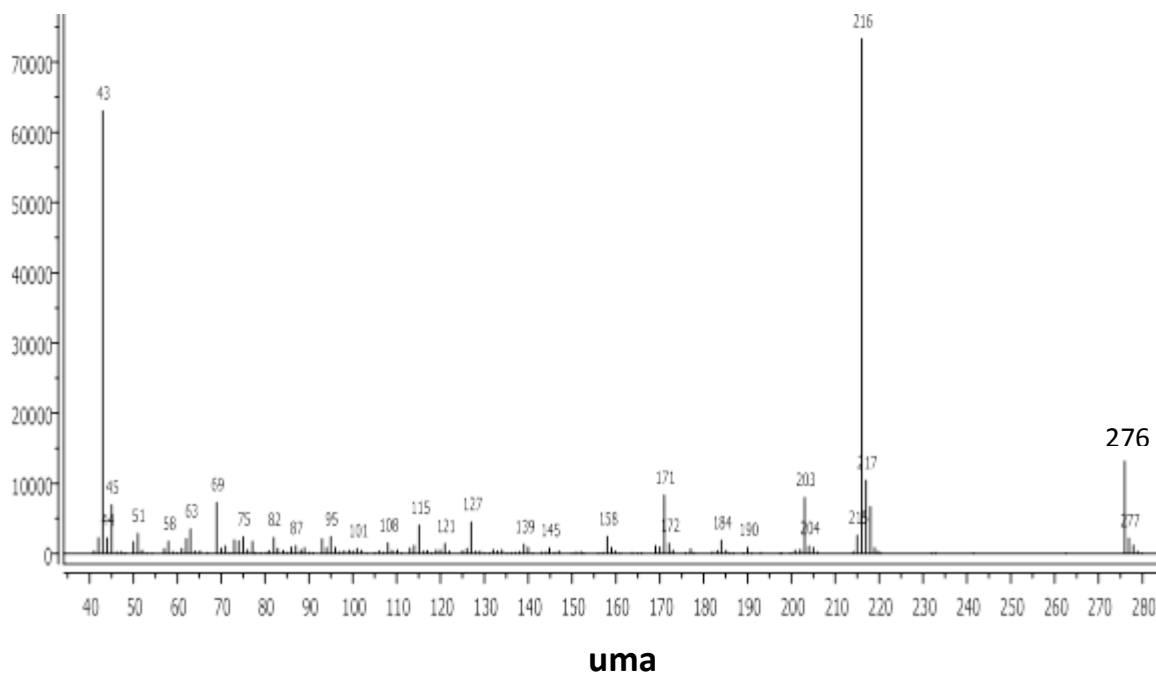


Fig. 29. Cromatograma de gases del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de raíz **A)**. Espectro de masas **B)**.

IIQB

En el espectro de ^{13}C del segundo compuesto aislado del extracto hexánico de raíz (Fig. 31) se observa una señal en 170.89 ppm que corresponde a un carbono de un éster, C-10. Se observan señales que van desde 122.02 ppm a 138.09 ppm que corresponden a los desplazamientos de los carbonos de los heterociclos del bitiofeno (cuadro 24). A campo más alto se observan señales en 90.61 ppm y 75.16 ppm que corresponden a carbonos alquinos C-7 y C-6, mientras que en 62.11 ppm una señal que corresponde a un carbono base de éster, C-9. A 20.94 ppm la señal que se observa corresponde al AcO y la señal en 20.27 ppm al C-8.

Cuadro 24. Desplazamiento de ^{13}C -RMN a 400MHz

Carbono	Desplazamiento (δ ppm)
C-2'	138.09
C-2	136.75
C-4	132.42
C-4'	127.90
C-5'	124.86
C-3'	124.11
C-3	123.27
C-5	122.02

Las asignaciones para los hidrógenos fueron realizadas en base al experimento COSY (Fig. 32) tomando la señal asignada para el H-8 como referencia, localizada en 2.79 ppm observamos que tiene correlación con la señal ubicada en 4.25 ppm la cual corresponde al H-9 vecino del H-8. Continuando con la asignación de señales observamos una señal en 7.22 ppm que corresponde al H-5' que tiene una correlación con una señal en 7.01 ppm por lo que la asignamos al H-4'. De igual manera se realizaron las asignaciones de los hidrógenos restantes.

IIQB

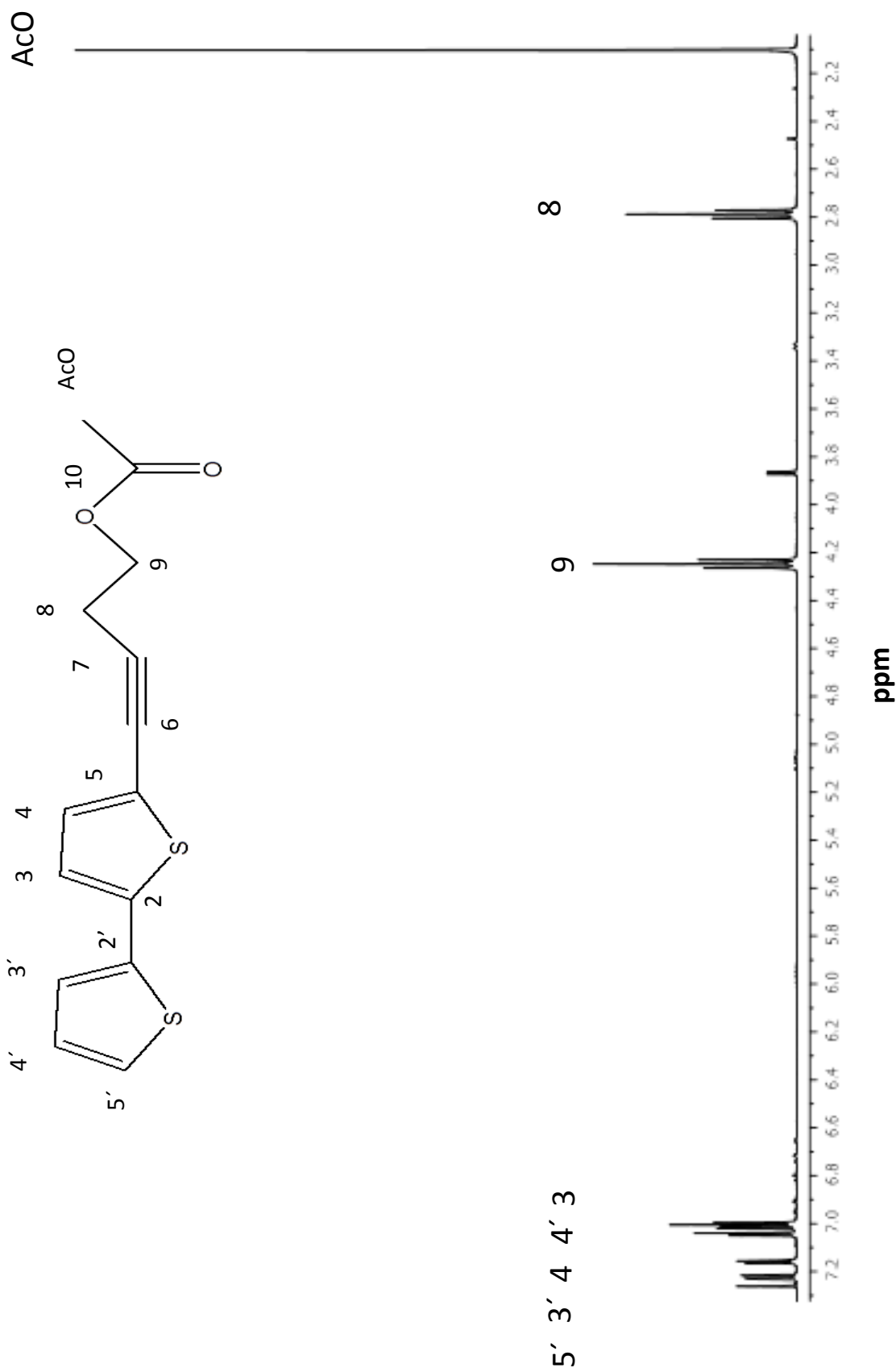


Fig. 30. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H del 5-(4-acetoxi-1-butini)-2,2'-bitiofeno

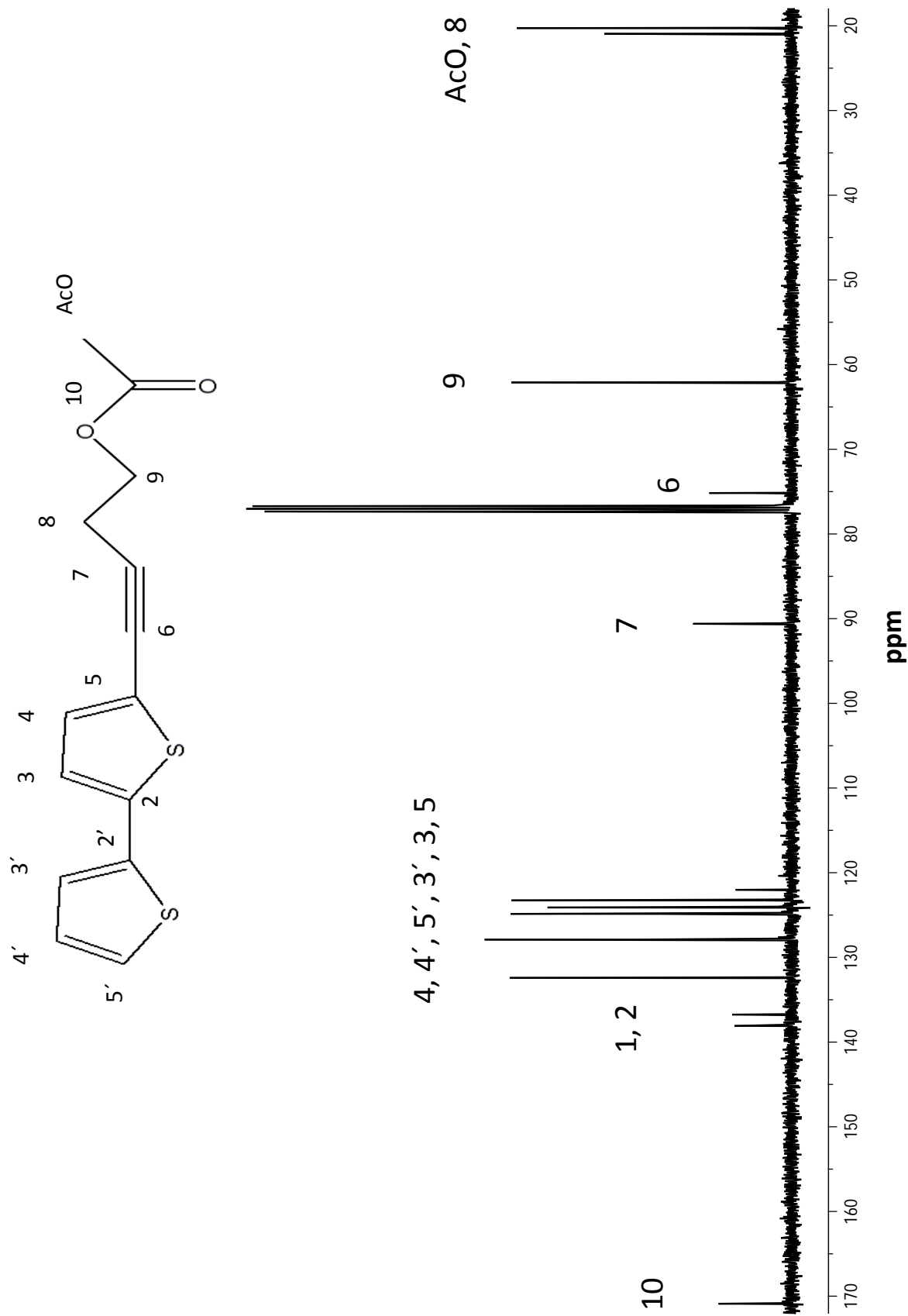


Fig. 31. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , del 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno

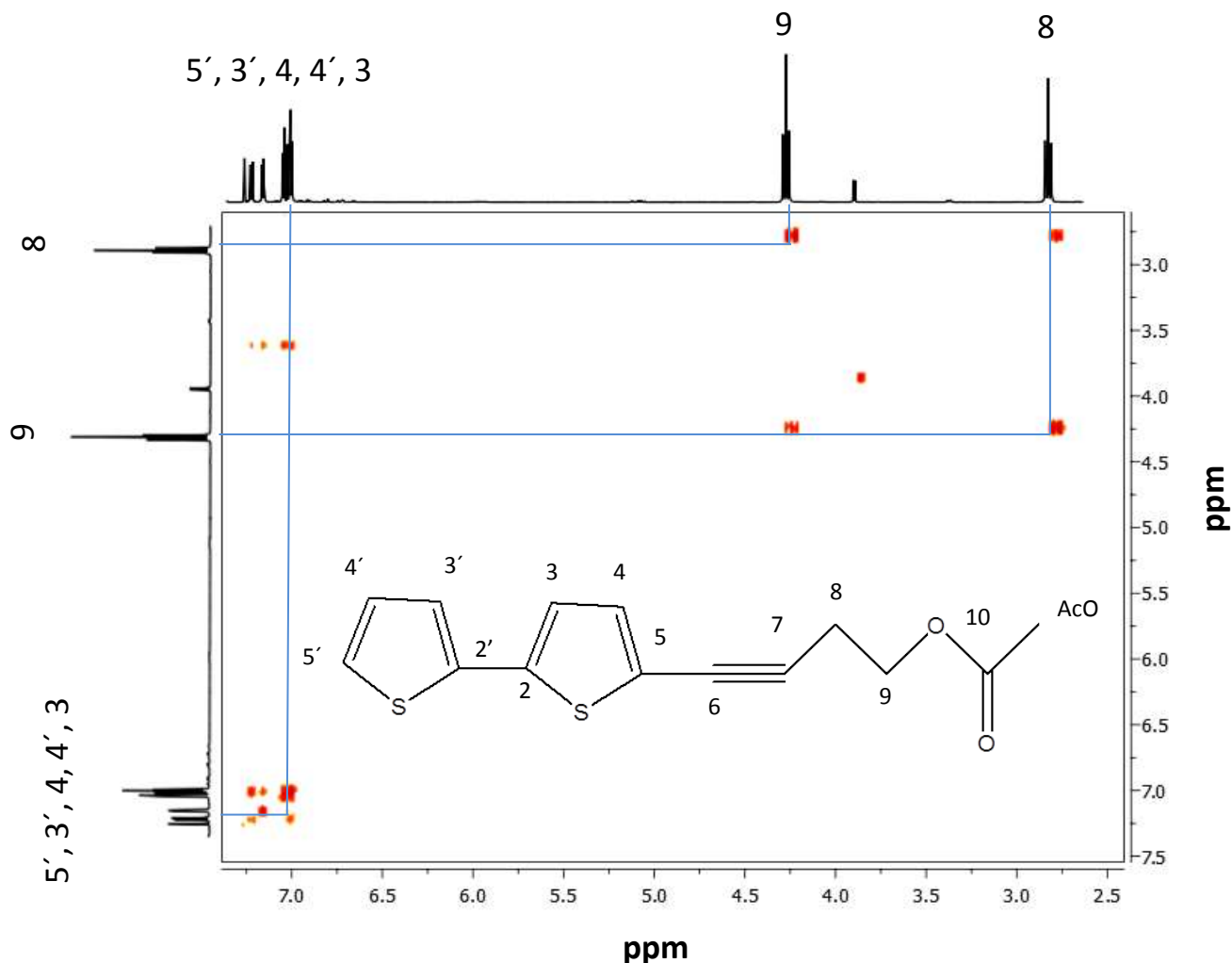


Fig. 32. Experimento de correlación homonuclear (COSY) del 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno

El espectro de RMN de ¹³C fue asignado en base al experimento HETCOR (Fig. 33). La señal en 2.79 ppm en la escala de hidrógeno asignada para H-8 correlaciona con la señal en 20.27 ppm en escala de carbono, por lo tanto esta señal corresponde al C-8. De igual manera la señal en 4.25 ppm correspondiente al H-9 correlaciona con la señal en 62.11 ppm por lo que es asignado al C-9. En 7.00 ppm se encuentra en la escala de hidrógeno una señal para H-3 que al extrapolar nos permite identificar al C-3 en 123.27 ppm en la escala de carbono. Muy cercana a esta señal en 7.01 ppm se encuentra una señal que corresponde al H-4' la cual correlaciona en 127.90 ppm con una señal lo que permite asignar al C-4'. En 7.04 ppm de la escala de hidrógeno se encuentra la señal para H-4 que correlaciona en 132.42 ppm con una señal la cual es asignada al C-4. Desplazado a campo

HQB

más bajo de las escalas se observa el H-3' en 7.16 ppm que correlaciona con una señal en 124.11 ppm la cual corresponde al C-3'. En 7.22 ppm se observa una señal para el H-5' la cual correlaciona en la escala de carbono con una señal en 124.86 ppm por lo que corresponde al C-5'.

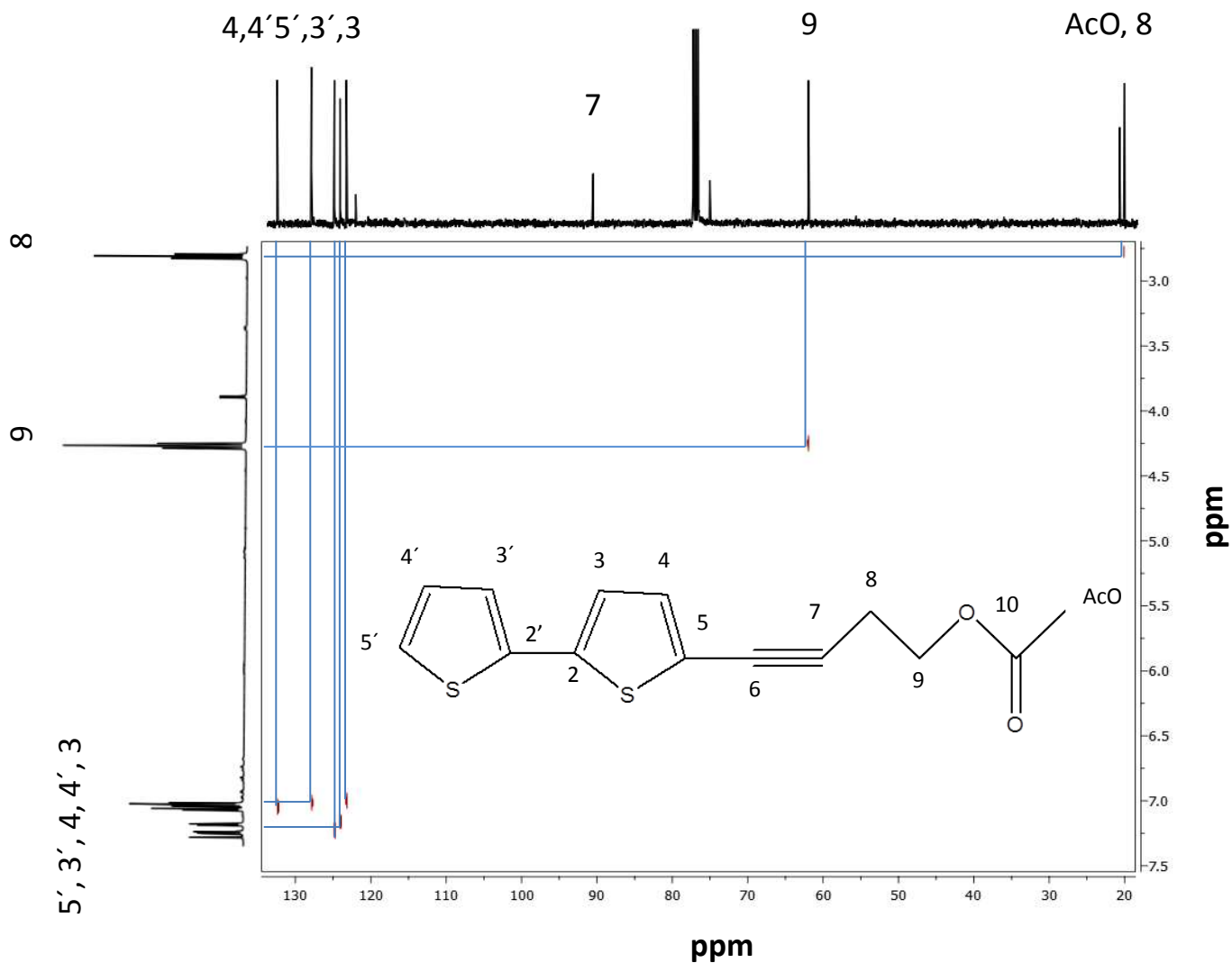


Fig. 33. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno

6.3.5. Parte experimental

6.3.5.1. Purificación e identificación de las cumarinas aisladas del extracto hexánico de hoja

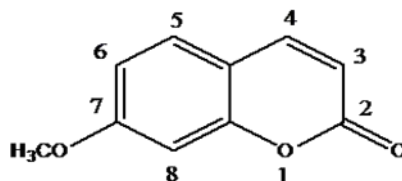
Para la purificación e identificación de cumarinas mayoritarias del extracto hexánico de hoja se siguió un procedimiento de separación cromatográfico.

Mediante la cromatografía en columna con la adición de 0.1 g de extracto hexánico de hoja y como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad ascendente se purificaron dos cumarinas mayoritarias y apoyados con espectroscopia de resonancia magnética nuclear se logró identificarlas.

Así se purificó una primer cumarina de la fracción 45 a la 47, con polaridad 80:20 (hexano: acetato de etilo) cuadro 25. Estas fracciones correspondieron a la 7-metoxi cumarina. Se purificó una segunda cumarina mayoritaria de la fracción 19 a la 22 con polaridad 40:60 de hexano con respecto acetato de etilo que corresponde a la 6,7-dimetoxi cumarina (cuadro 26).

Cuadro 25. Primer cumarina mayoritaria aislada del extracto hexánico de hoja de *T. lucida*

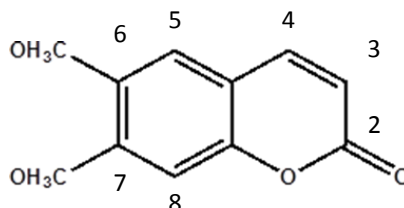
Fracción	Polaridad	Metabolito
45 - 47	80:20	7-metoxi Cumarina



RMN ¹H (400MHz,CDCl₃), δ ppm: 7.63 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-4), 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-5), 6.88 (dd, $J = 2.4, 8.5$ Hz, 1H, H-6), 6.87 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-8), 6.24 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-3), 3.90 (s,3H, OMe). **RMN ¹³C** (400MHz CDCl₃), δ ppm: 162.05 (C-7), 161.04 (C-2), 155.32 (C-4a), 142.84 (C-4), 128.16 (C-5), 112.51 (C-8a), 112.30 (C-3), 112.25 (C-6), 100.24 (C-8), 55.20 (OMe).

Cuadro 26. Segunda cumarina mayoritaria aislada del extracto hexánico de hoja de *T. lucida*

Fracción	Polaridad	Metabolito
45 - 47	80:20	6,7-dimetoxi cumarina



RNM ^1H (400MHz, CDCl_3), δ ppm: 7.63 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4), 6.86 (s, 1H, H-5), 6.84 (s, 1H, H-8), 6.30 (d, $J = 10.0$, 1H, H-3), 3.95 y 3.90 (s, 3H, OMe). **RMN ^{13}C** (400MHz CDCl_3), δ ppm: 161.35 (C-2), 152.80(C-6), 149.96 (C-5), 146.29 (C-8), 143.31 (C-4), 113.02 (C-3), 111.38 (C-8a), 107.94 (C-4a), 99.95 (C-7), 56.31 (OMe).

6.3.5.2. Purificación e identificación de los bitiofenos aislados del extracto hexánico de raíz

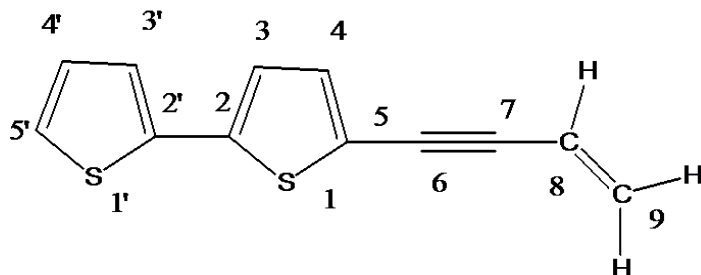
Para la purificación e identificación de los bitiofenos mayoritarios del extracto hexánico de raíz se utilizó cromatografía en columna con 1 g de extracto hexánico de raíz y una mezcla de hexano: acetato de etilo.

Se purificó un primer bitiofeno de la fracción 5 a la 8 con una polaridad 100:00 de hexano con respecto acetato de etilo (cuadro 27) que se identificó mediante técnicas espectroscópicas como 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno.

Se aisló un segundo bitiofeno mayoritario del extracto hexánico de raíz de las fracciones 17 a la 19 comenzando con una polaridad 91:9, 80:20 y 50:50 de hexano con respecto acetato de etilo (cuadro 28) identificado como 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno.

Cuadro 27. Primer bitiofeno mayoritario del extracto hexánico de raíz de *T. lucida*

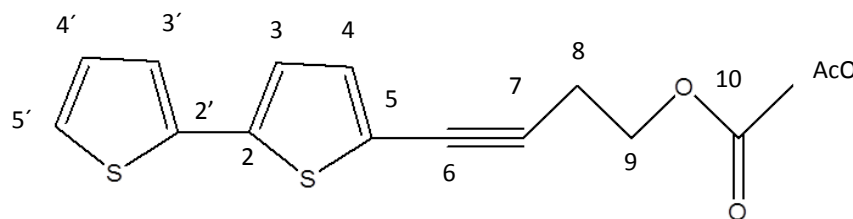
Fracción	Polaridad	Metabolito
05 - 08	100:00	5 - (But-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno



RMN ^1H (400MHz CDCl_3), δ ppm: 7.22 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.17 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.11 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4), 7.05 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-3), 7.00 (dd, $J = 3.7, 5.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.04 (dd, $J = 11.2, 17.5$ Hz, 1H, H-8), 5.73 (dd, $J = 1.9, 17.5$ Hz, 1H, H-9), 5.55 (dd, $J = 1.9, 11.2$ Hz, 1H, H-9). **RMN ^{13}C** (400MHz CDCl_3), δ ppm: 138.65 (C-2'), 136.35 (C-2), 132.49 (C-4), 127.61 (C-4'), 126.67 (C-9), 124.68 (C-5'), 123.91 (C-3'), 123.18 (C-3), 121.40 (C-5), 116.47 (C-8), 92.61 (C-6), 82.88 (C-7).

Cuadro 28. Segundo bitiofeno mayoritario del extracto hexánico de raíz de *T. lucida*

Fracción	Polaridad	Metabolito
17 - 19	91:09	5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno



$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3), δ ppm: 7.22 (dd, $J = 5.1, 1.2$ Hz, 1H, H-5'), 7.16 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.04 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4), 7.01 (dd, $J = 5.1, 3.6$, 1H, H-4'), 7.00 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-3), 4.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-9), 2.79 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, H-8), 2.10 (s, 3H, H-AcO). **RMN ^{13}C** (400MHz CDCl_3), δ ppm: 170.89 (C-10), 138.09 (C-2'), 136.75 (C-2), 132.42 (C-4), 127.90 (C-4'), 124.86 (C-5'), 124.11 (C-3'), 123.27 (C-3), 122.02 (C-5), 90.61 (C-6), 75.16 (C-7), 62.11 (C-9), 20.94 (C-AcO), 20.27 (C-8).

6.3.6. Rendimiento de los extractos hexánicos de hoja y raíz de *T. lucida*

En el cuadro 29 se presenta el peso en gramos del extracto hexánico de hoja y raíz de *T. lucida* así como el rendimiento en porcentaje de los compuestos obtenidos. Se observó un rendimiento hasta tres veces mayor en el extracto hexánico de hoja para la 7-metoxi cumarina con respecto a la segunda cumarina aislada la 6,7-dimetoxi cumarina. En cuanto el rendimiento de los bitiofenos hay un rendimiento de 9:1 del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno con respecto al 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno.

Cuadro 29. Rendimiento de los extractos hexánicos de hoja y raíz de *T. lucida*

Peso de los extractos hexánicos de hoja (A) y raíz (B) de <i>T. lucida</i> y sus rendimientos		
g	%	
(A)	7-metoxi cumarina	6,7-dimetoxi cumarina
10	7	2.5
(B)	5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno	5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno
6	9	1

6.3.7. Modificación química de las cumarinas y bitiofenos mayoritarios de los extractos hexánicos de hoja y raíz de *T. lucida*

6.3.7.1. Obtención de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina

Se disolvieron 100 mg de la 7-metoxi cumarina en 4 mL de AcOH a 80 °C en agitación con 125 mg de CH₂O hasta la completa disolución del CH₂O. Se agregaron 4 mL de HCl, se mezclaron y mantuvieron en agitación a 80 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ y se lavó en tres ocasiones con H₂O, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 20 mg de cristales finos de color blanco que se recrystalizaron en acetato como una placa gruesa de color blanco con p.f. 145-150°C que fue identificada como 7-metoxi-6-cloro metil cumarina.

6.3.7.2. Obtención de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina

Se disolvieron 100 mg de la 7-metoxi cumarina y 200 mg de CH₂O en 4 mL de AcOH a 100 °C en agitación, se agregaron 4 mL de HCl. Se mantuvo la reacción a 100 °C y agitación durante 24 horas. Transcurrido las 24 horas la mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ y se lavó en tres ocasiones con H₂O, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 10 mg de cristales gruesos de color blanco amarillento que se recrystalizaron en acetato como una placa, ligeramente amarilla con p.f. 130-145°C identificada como 7-metoxi-8-cloro metil cumarina.

6.3.7.3. Obtención de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina

Se disolvieron 100 mg de la 6,7-dimetoxi cumarina y 200 mg de CH₂O en 4 mL de AcOH a 100 °C en agitación, se agregaron 4 mL de HCl y se mantuvo la agitación a 100 °C durante 24 horas. Transcurrido las 24 horas la mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂ y se lavó en tres ocasiones con H₂O, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 13 mg de cristales finos de color verde fosforescente con p.f. 150-155°C identificados como 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina.

6.3.7.4. Obtención del 5-butil-2,2'-bitiofeno

Se disolvieron 100 mg del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno en 5 mL CH₂Cl₂ mediante agitación y se agregaron 10 mg de Pd/C. Se purgo la reacción con H₂ inyectándolo mediante jeringas y globos que contenían el H₂, después de purgada la reacción se selló y dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido las 24 h se filtró, lavó con CH₂Cl₂ en cinco ocasiones y se dejó evaporar a sequedad. El crudo de reacción fue purificado por cromatografía en columna obteniéndose 16 mg de un aceite de menor viscosidad que la materia prima con un color verde fosforescente que se identificó mediante comparación cromatográfica como 5-butil-2,2'-bitiofeno.

6.3.8. Análisis espectroscópico de las cumarinas modificadas químicamente

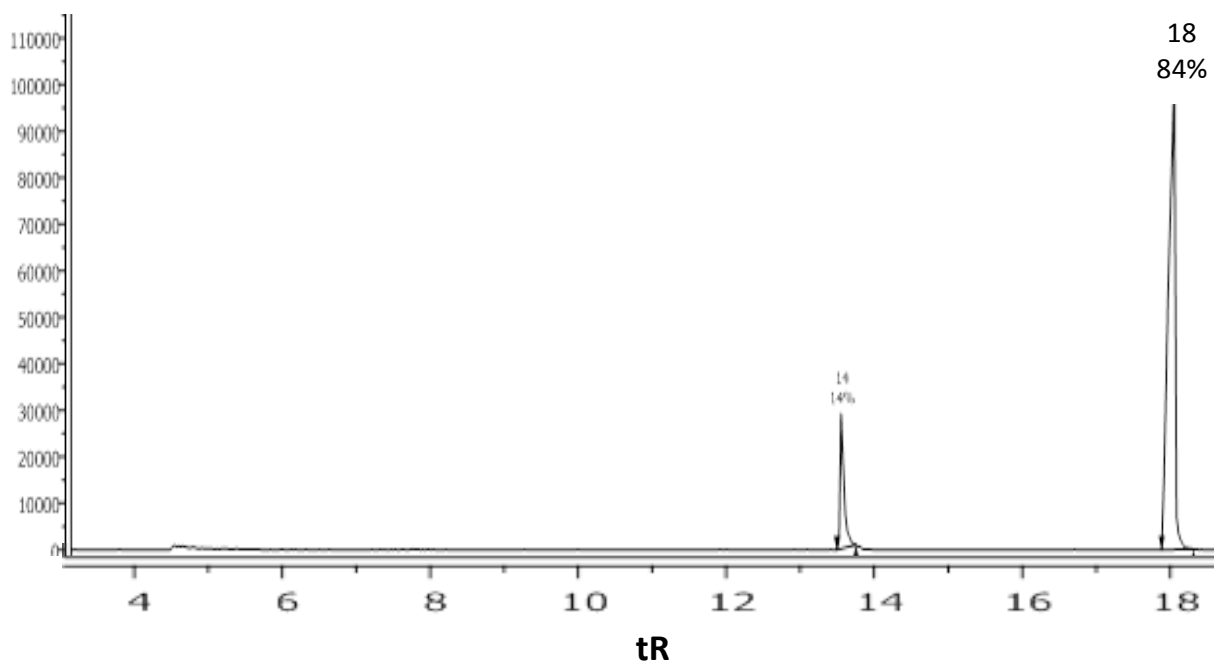
6.3.8.1. Análisis espectroscópico de la primer cumarina modificada químicamente

El análisis espectroscópico mostro que se trata de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina. En la figura 34. A se muestra el cromatograma de gases de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina obtenida a partir de la 7-metoxi cumarina. En el cromatograma de gases se observa una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 18.38 min y con un enriquecimiento del 84 %. El espectro de masas de la primer cumarina modificada químicamente a partir de la 7-metoxi cumarina nos muestra un ión molecular de 224 uma (Fig. 34. B).

En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 35) se observa una señal doble en 7.66 ppm que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{orto} = 9.3$ Hz correspondiente al H-4. En 7.50 ppm y 6.85 ppm se observan señales simples que integran para un protón cada una y que corresponden al H-5 y H-8 respectivamente. En 6.29 ppm se observa una señal doble que integra para un protón del H-3 y presenta una constante de acoplamiento $J_{orto} = 9.3$ Hz con respecto al H-4. Desplazado hacia campo más alto en 4.67 ppm se encuentra un singulete que integra para dos protones del grupo CH_2Cl . En 3.97 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones del grupo metoxi de la 7-metoxi cumarina usada como materia prima de la reacción. Con respecto al espectro de ^1H -RMN de la materia prima (7-metoxi cumarina) se observa que la señal para de H-5 pasa de ser una señal doble a una señal simple debido a la sustitución del H-6 por el grupo CH_2Cl . En el espectro de ^{13}C (Fig. 36) de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina se observan las señales características de los carbonos aromáticos que van desde 99.27 ppm a 160.40 ppm con una señal en 56.23 ppm para el carbono del grupo metoxilo. Estas señales corresponden a la 7-metoxi cumarina, sin embargo, el desplazamiento del C-6 comparado con el desplazamiento del mismo carbono de la materia prima se ve a campo más bajo en 123.29 ppm debido a la adición del grupo CH_2Cl . El carbono del grupo adicionado se observa en 40.60 ppm. El desplazamiento de las señales con sus carbonos respectivos se muestra en el cuadro 30.

IIQB

A)



B)

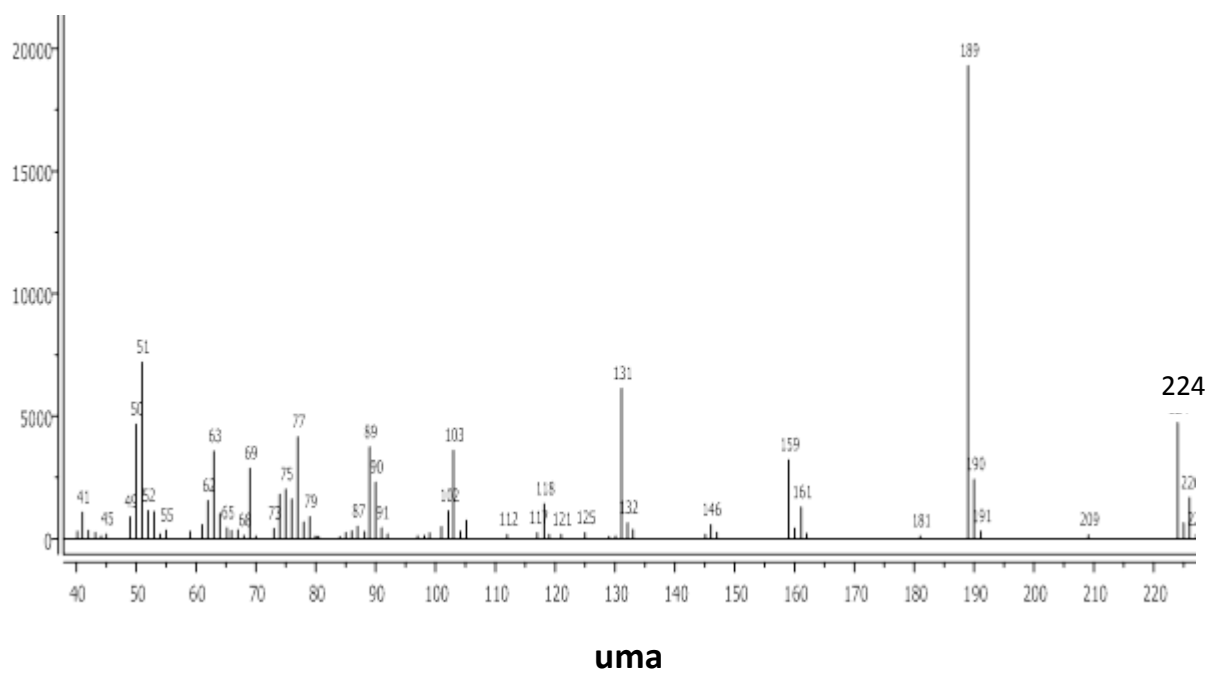


Fig. 34. Cromatograma de gases de la de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina **A)**. Espectro de masas **B)**.

Cuadro 30. Desplazamiento de ^{13}C -RMN a 400MHz de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina

Carbono	Desplazamiento (δ ppm)
C-2	160.40
C-7	160.31
C-4a	156.07
C-4	143.14
C-5	129.28
C-3	113.61
C-8a	111.90
C-8	99.27

En la figura 37 se muestra la asignación de los hidrógenos 3 y 4 en base al experimento COSY. Tomando la señal asignada para el H-3 que se localiza en 6.29 ppm observamos que tiene correlación con la señal ubicada en 7.66 ppm la cual corresponde al hidrógeno vecino, H-4. Continuando con la asignación de señales observamos una señal simple en 6.86 ppm que corresponde al H-5 para el cual no se observa una señal de correlación ya que el H-6 fue sustituido. En 6.85 ppm se observa una señal simple que corresponde al H-8.

En el experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) se observan desplazamientos para los carbonos aromaticos en el campo de 99.27 a 143.14 ppm, mientras que a campo más alto en 56.23 ppm se observa el carbono del metoxilo. En el cuadro 31 se observan los desplazamientos de los carbonos con los hidrógenos que correlacionan. La señal para el carbono 6 en 123.29 ppm no correlaciona con ninguna señal en el plano de los hidrógenos ya que se sustituyo el hidrógeno de la 7-metoxi cumarina por un grupo CH_2Cl (Fig. 38).

Cuadro 31. Correlación de las señales de los carbonos de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina con sus hidrógenos

Carbono	Desplazamiento (δ ppm)	Hidrógeno	Desplazamiento (δ ppm)
C-4	143.14	H-4	7.66
C-5	129.28	H-5	7.50
C-3	113.61	H-3	6.29
C-8	99.27	H-8	6.85

IIQB

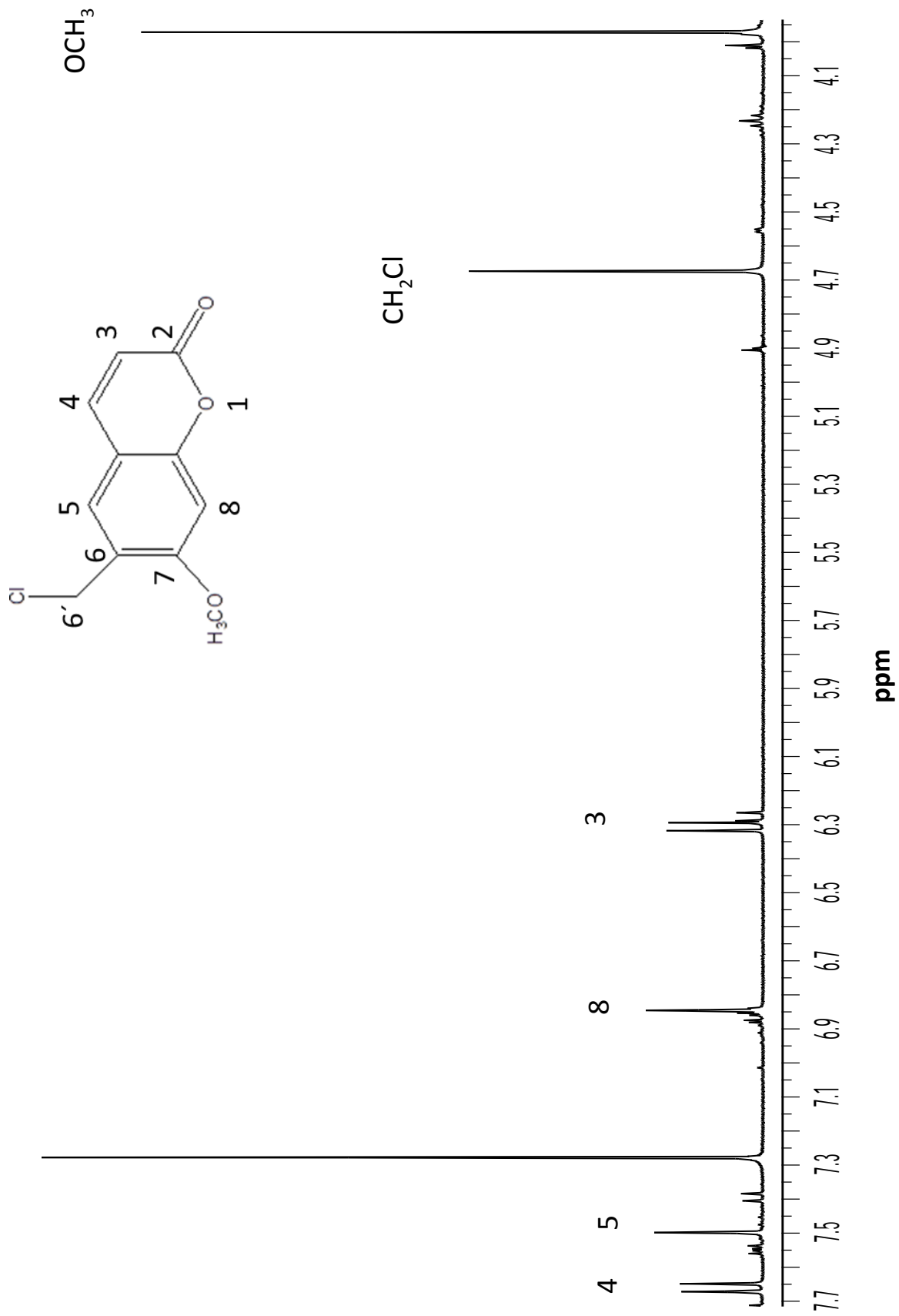


Fig. 35. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina

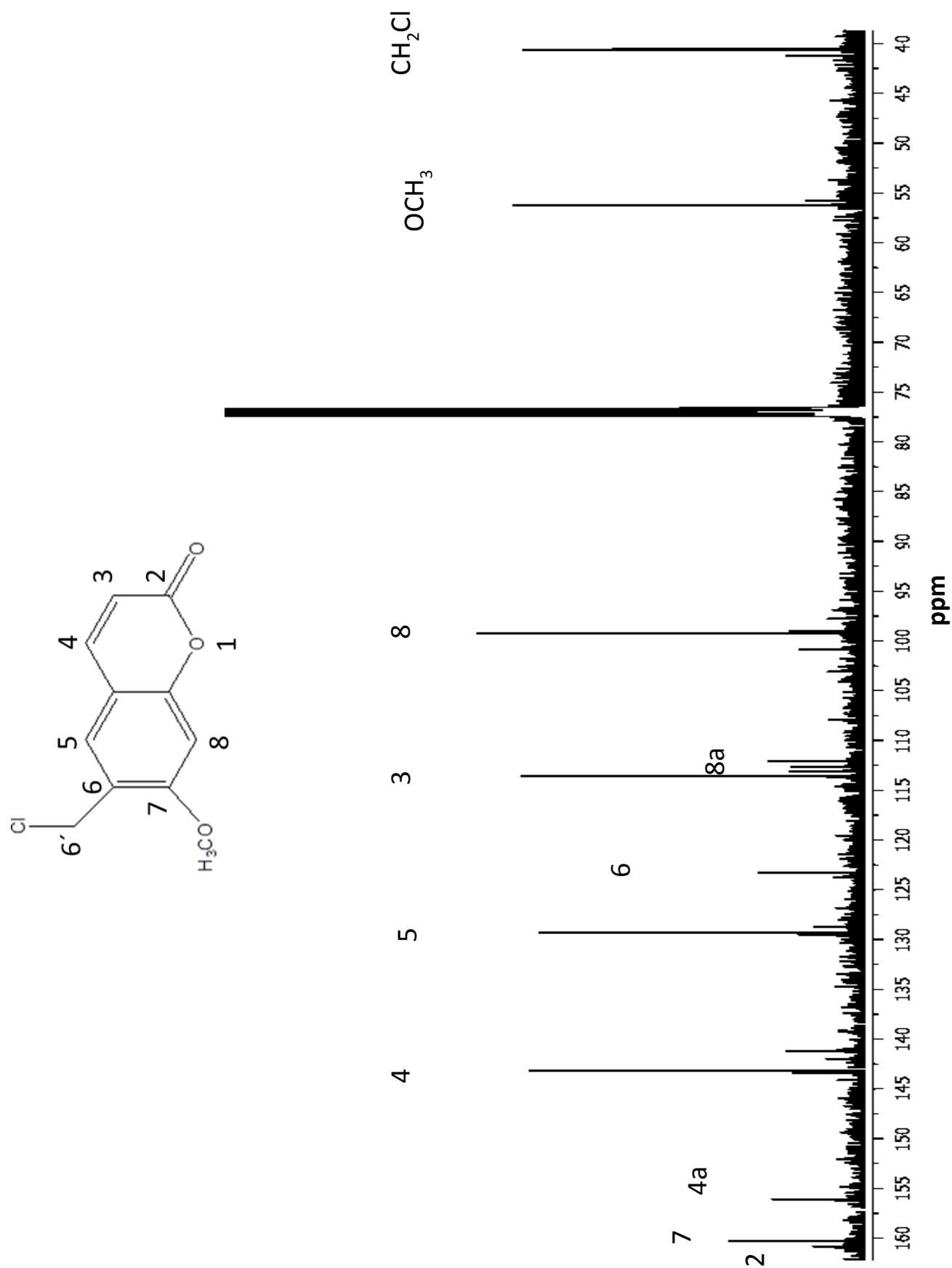


Fig. 36. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , de la 7-metoxi-6-cloro metil coumarina

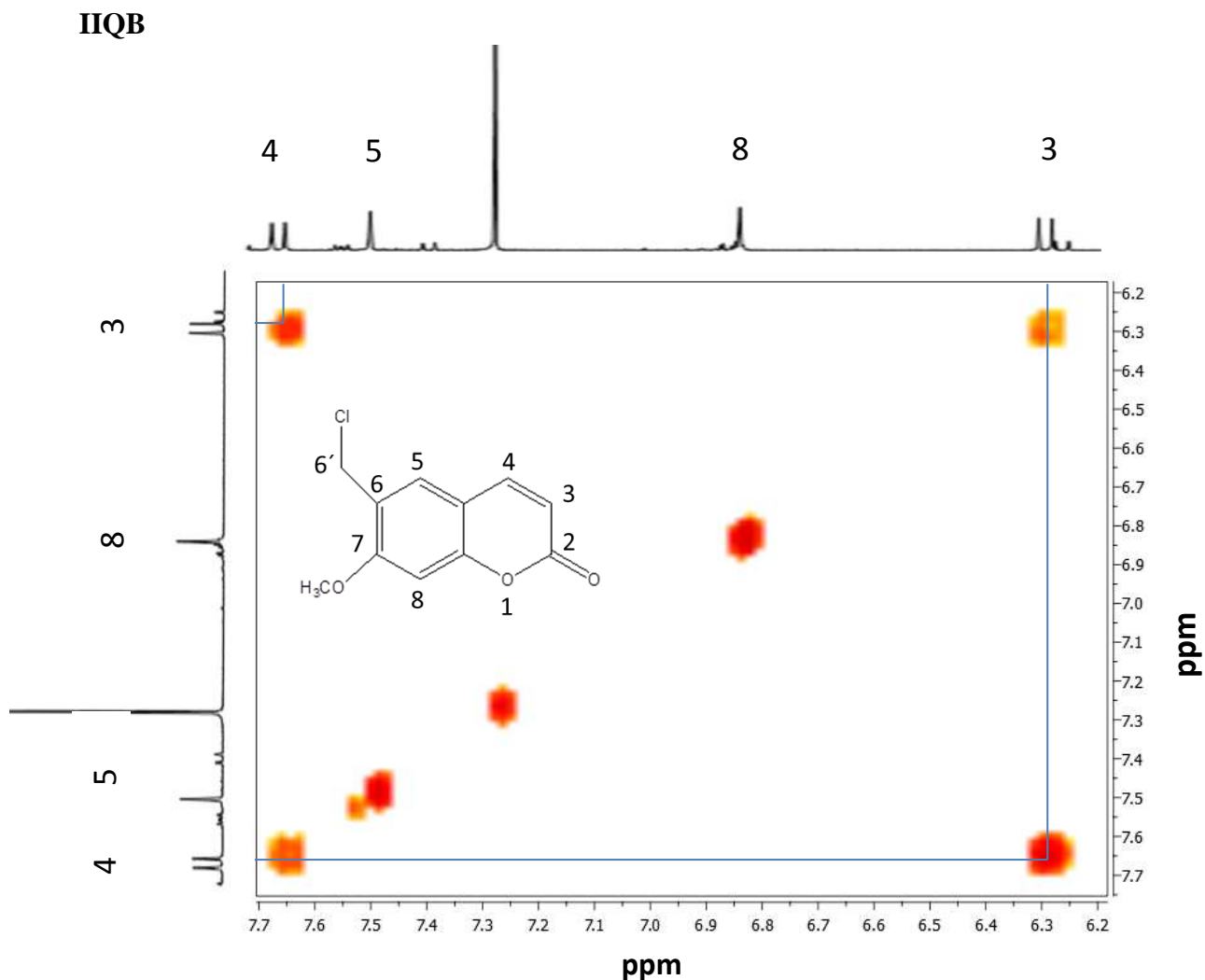


Fig. 37. Experimento de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina

6.3.8.2. Análisis espectroscópico de la segunda cumarina modificada químicamente

De acuerdo al análisis espectroscópico la segunda cumarina obtenida de la modificación química de la 7-metoxi cumarina corresponde a la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina. En la figura 39. A se muestra el cromatograma de gases de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina obtenida de la reacción utilizando como materia prima la 7-metoxi cumarina. Se observa una señal mayoritaria con un tiempo de retención de 18.29 min y con un enriquecimiento mayor al 92 %. El espectro de masas de la segunda cumarina modificada químicamente a partir de la 7-metoxi cumarina nos muestra un ión molecular de 224 uma al igual que la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina (Fig. 39. B).

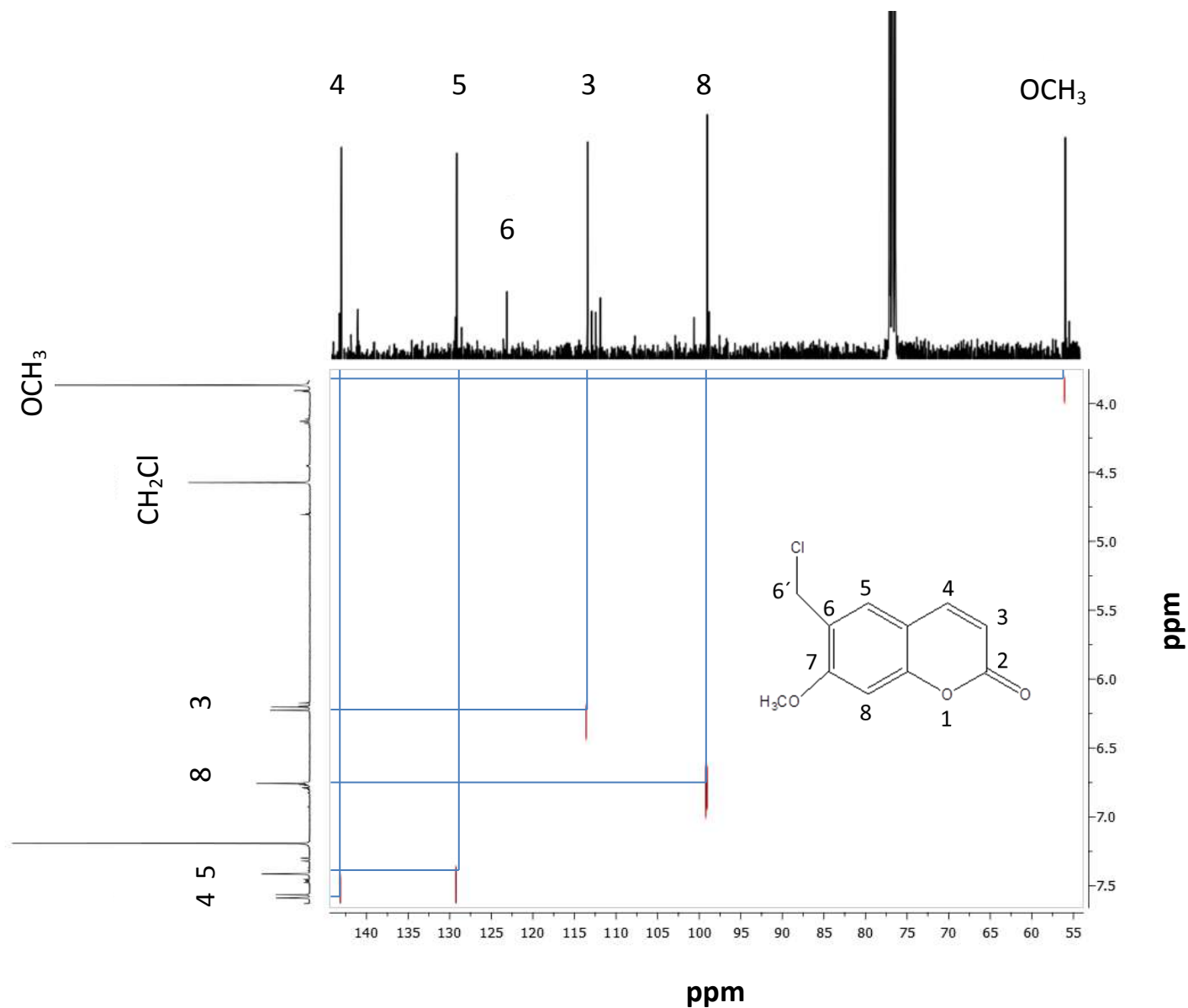


Fig. 38. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi-6-cloro metil cumarina

En el espectro de ¹H-RMN a 400 MHz (Fig. 40) se observa una señal doble en 7.66 ppm que integra para un protón con una constante de acoplamiento de $J_{cis} = 9.5$ Hz correspondiente al H-4. En 7.46 ppm se observa otra señal doble que integra para un protón, con una constante $J_{orto} = 8.7$ Hz y que corresponde al H-5. En 6.90 ppm se observa otra señal doble que integra para el protón del H-6 y presenta una constante de acoplamiento $J_{orto} = 8.7$ Hz con respecto al H-5. En 6.30 se encuentra una señal doble del H-3, con una constante $J_{cis} = 9.5$ Hz con el H-4. Desplazado a campo más alto en 4.90 ppm se encuentra una señal simple la cual no se observa en el espectro de la 7-metoxi cumarina

IIQB

(Fig. 15), que integra para dos protones y pertenece al grupo CH_2Cl . En 3.99 ppm al igual que para la 7-metoxi cumarina se observa una señal simple que integra para tres protones del grupo metoxilo. A diferencia del espectro de ^1H -RMN de la materia prima (7-metoxi cumarina) no se observa la señal para el H-8 debido a su sustitución por el grupo CH_2Cl .

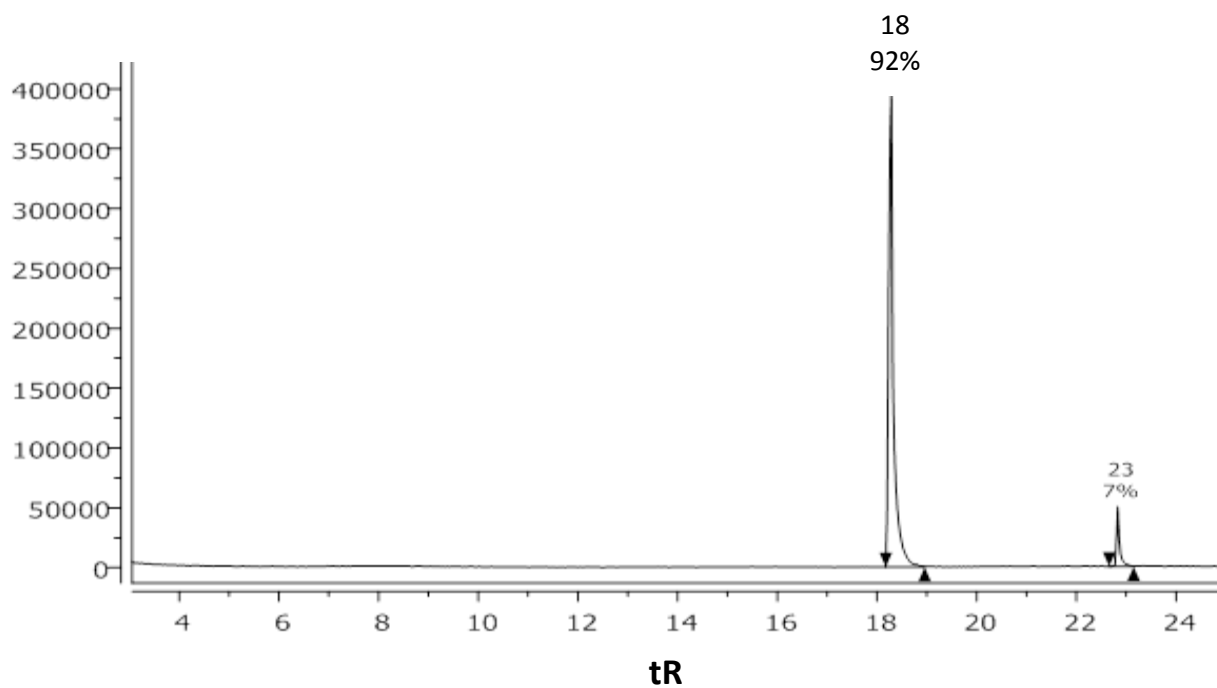
En el espectro de ^{13}C (Fig. 41) de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina se observan las señales características de los carbonos aromáticos con una señal en 56.23 ppm que corresponden a la 7-metoxi cumarina. El desplazamiento del C-8 pasa de observarse en 100.24 ppm en el espectro de carbono de la 7-metoxi cumarina (Fig. 15) a 107.53 ppm lo que nos indica la adición del grupo CH_2Cl . El carbono del CH_2Cl se observa en 33.56 ppm.

En el experimento de correlación homonuclear (COSY) podemos observar como correlacionan la señal del H-4 en 7.66 ppm con la señal del H-3 en 6.30 ppm. En 7.46 ppm la señal del H-5 muestra una correlación con el H-6 en 6.90 ppm. Se observa que la señal del H-8 presente en el espectro de la 7-metoxi cumarina en 100.24 ppm ya no se encuentra en el espectro de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina (Fig. 42).

En el experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) se observa una señal en 3.99 ppm en el plano de los hidrógenos la cual correlaciona en el plano de los carbonos con la señal simple asignada para el metoxilo en 56.41 ppm mientras que en 33.56 ppm del mismo plano correlaciona con la señal observada en 4.90 ppm del plano de los hidrógenos y que pertenece al grupo CH_2Cl (Fig. 43).

IIQB

A)



B)

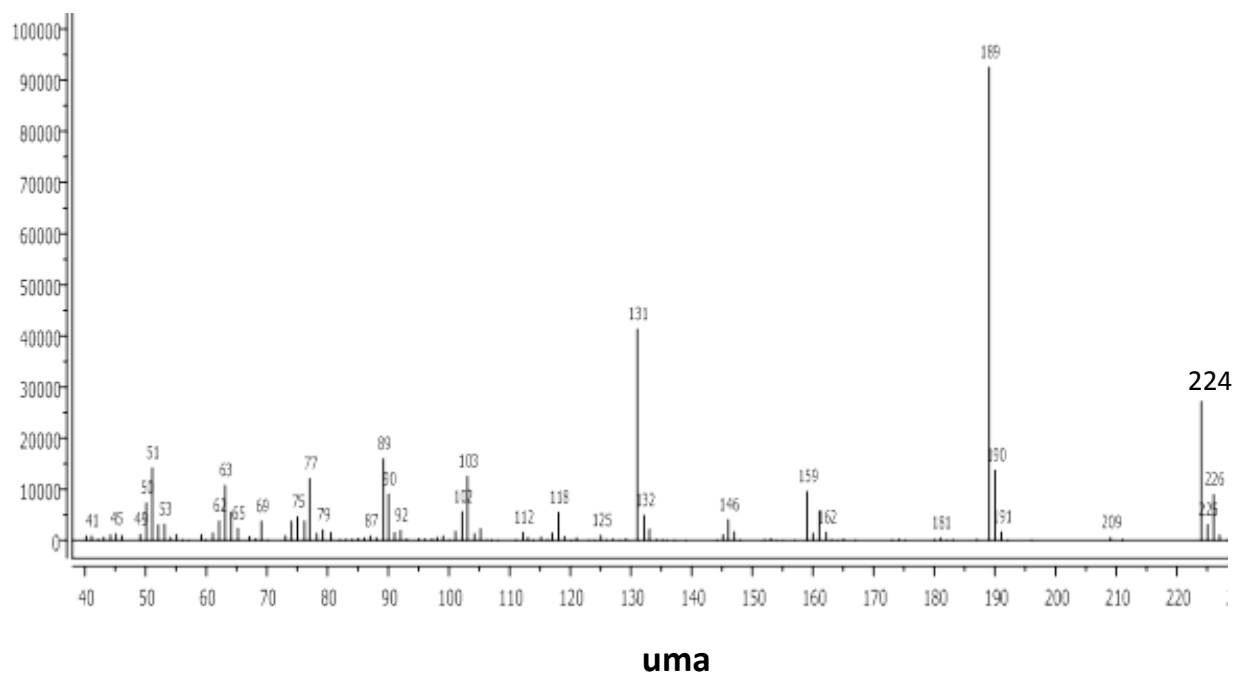


Fig. 39. Cromatograma de gases de la de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina **A)**. Espectro de masas **B)**.

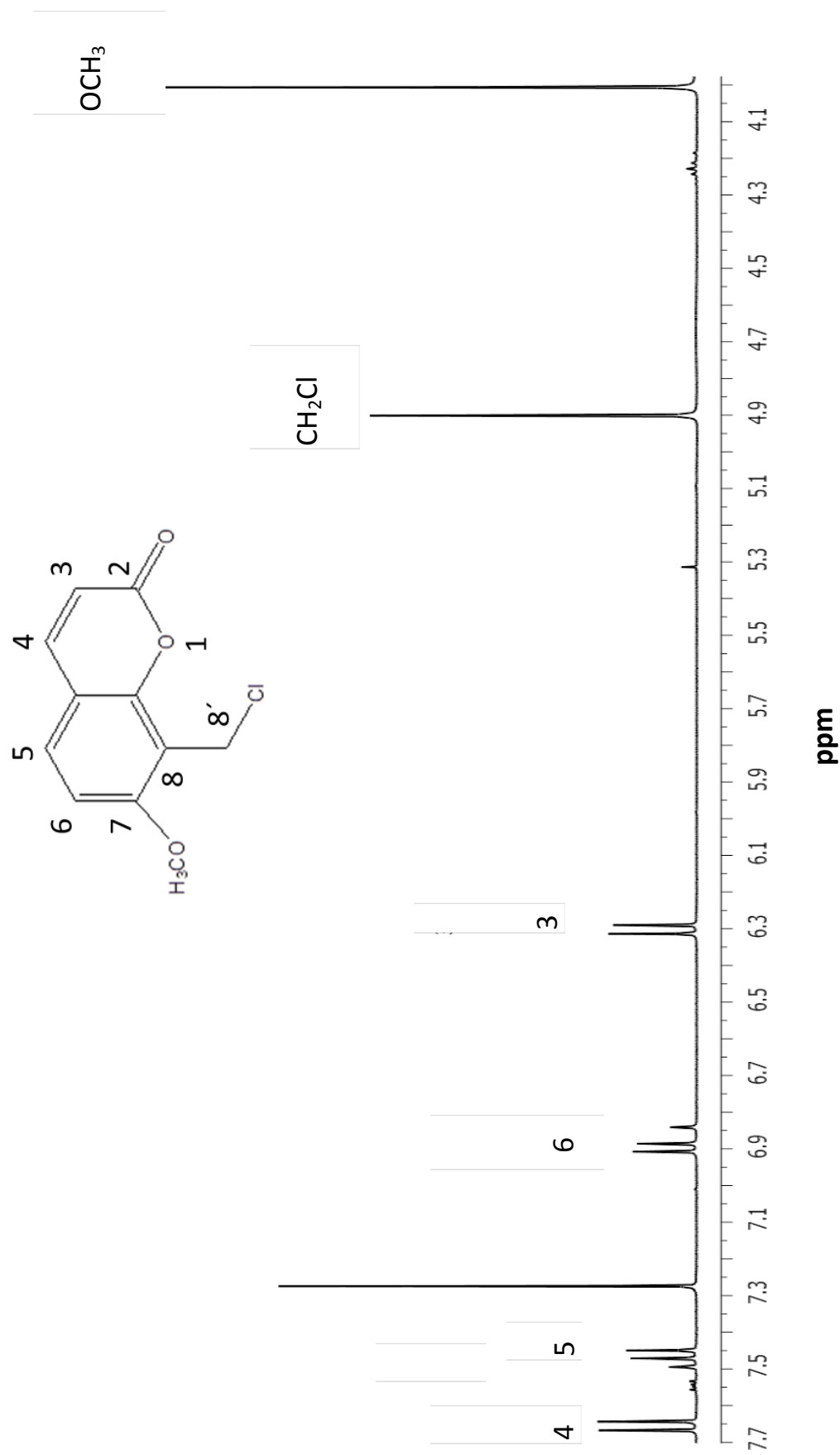


Fig. 40. A. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina

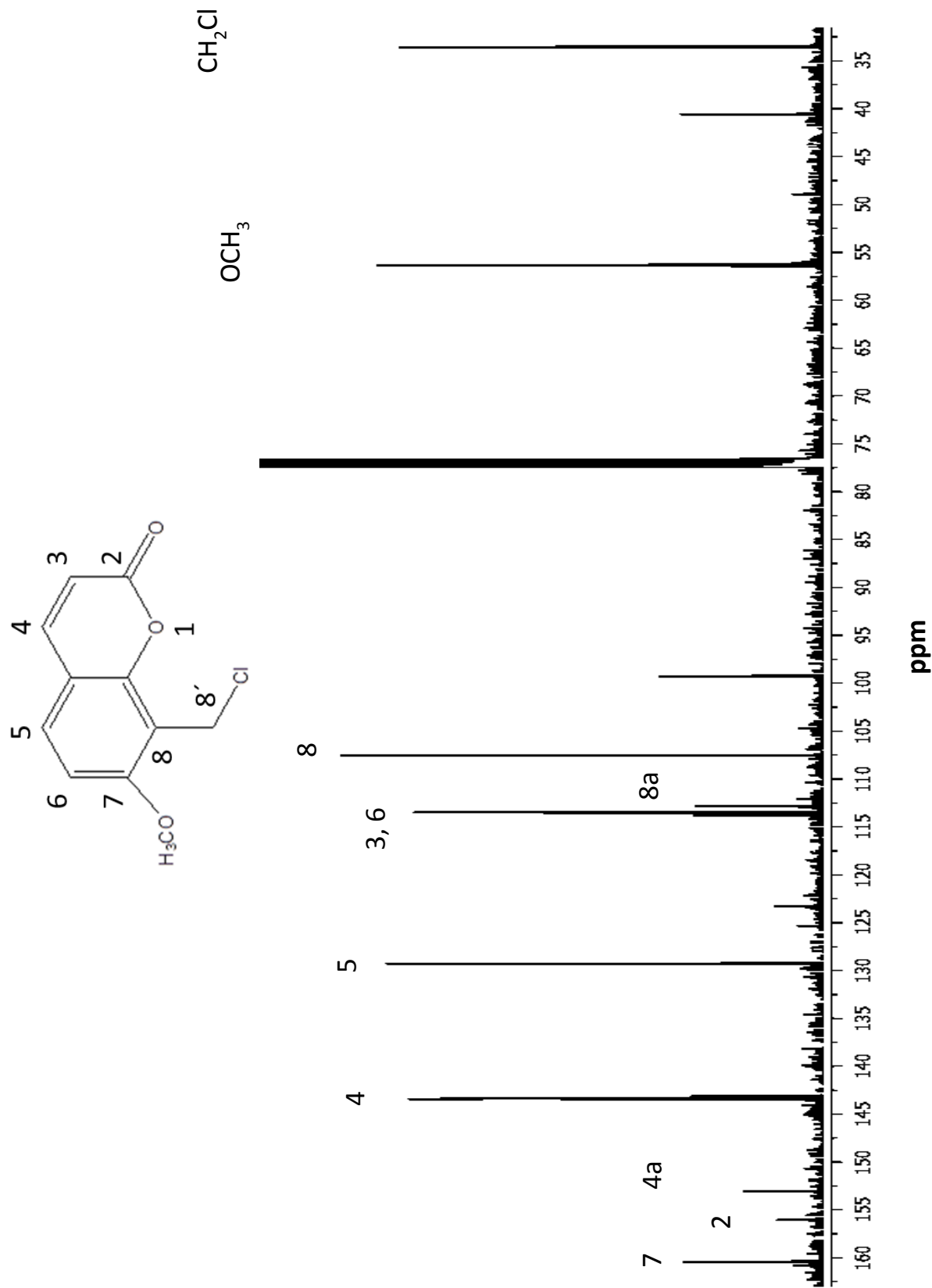


Fig. 41. A. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , de la 7-metoxi-8-cloro metil coumarina

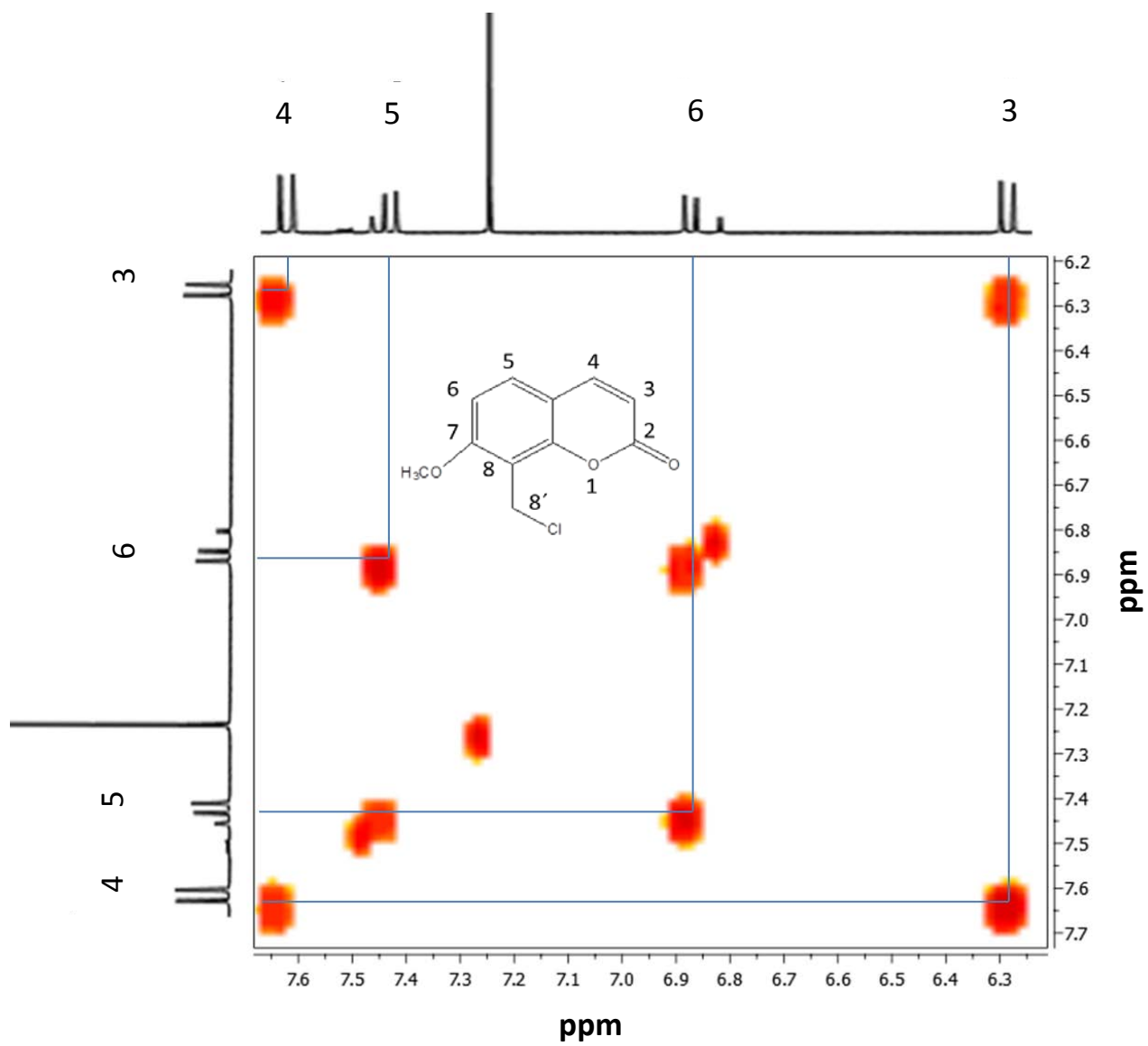


Fig. 42. Experimento de correlación homonuclear (COSY) de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina

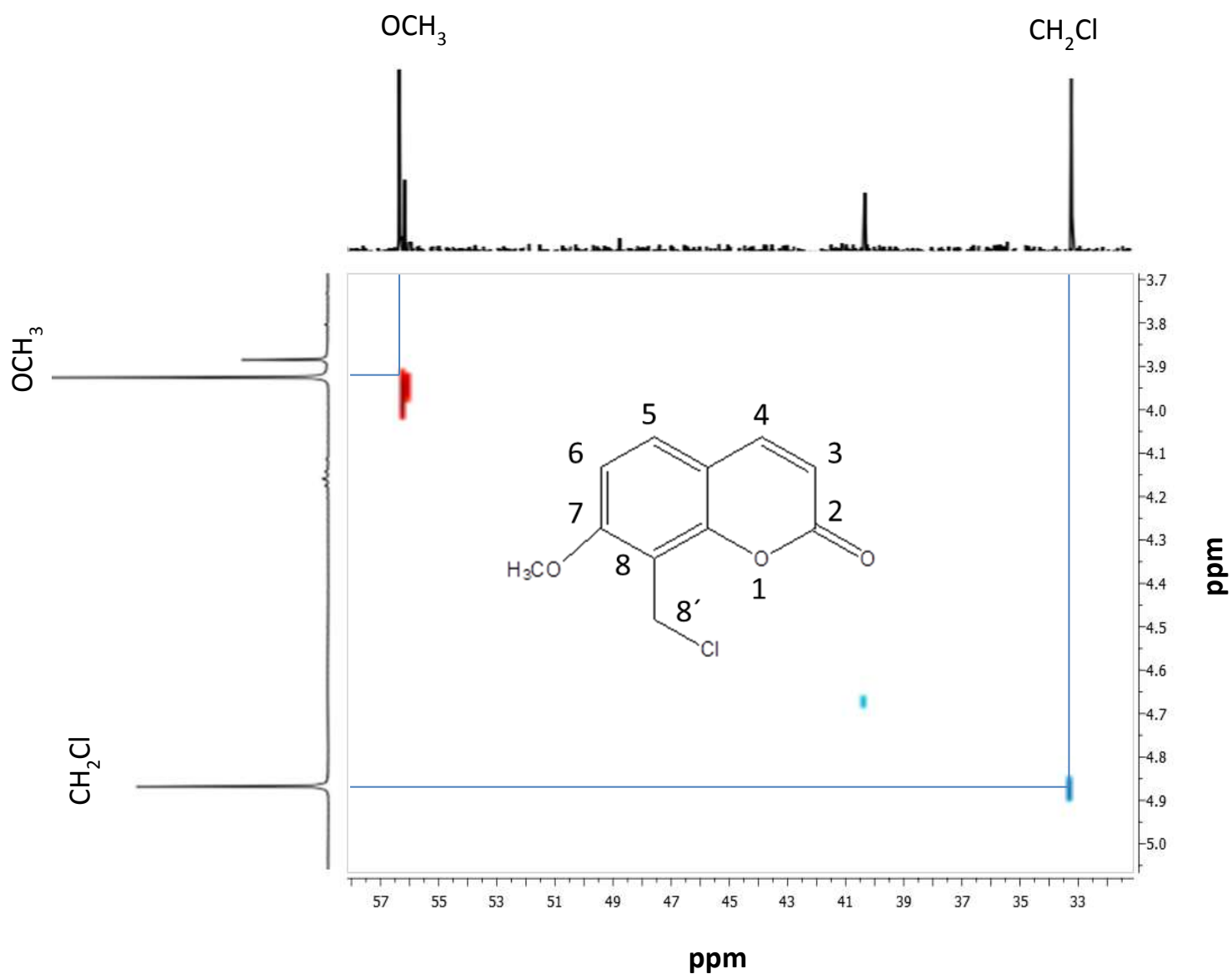


Fig. 43. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina

6.3.8.3. Análisis espectroscópico de la cumarina obtenida de la clorometilación de la 6,7-dimetoxi cumarina

La cumarina obtenida de la modificación química de la 6,7-dimetoxi cumarina se identificó mediante técnicas espectroscópicas como 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina.

IIQB

En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 44) se observa una señal simple en 7.81 ppm que integra para un protón y que corresponde al H-4. En 6.90 ppm se observa otra señal simple que integra para un protón, H-5. Una señal simple en 6.85 ppm que integra para el protón del H-8. A campo más alto en 4.54 ppm se encuentra una señal simple que no se encuentra en el espectro de la 6,7-dimetoxi cumarina (Fig. 20) e integra para dos protones que pertenecen al grupo CH_2Cl . En 3.94 ppm dos señales simples de los metoxilos. A diferencia del espectro de ^1H -RMN de la 6,7-dimetoxi cumarina no se observa la señal doble en 6.30 ppm del H-3 debido a su sustitución por el grupo CH_2Cl y la señal doble del H-4 en 7.63 ppm cambia de observarse como doble a simple (Fig. 44).

En el experimento de correlación homonuclear (COSY) no se observa una correlación entre los planos de los hidrógenos debido a que la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina no presenta hidrógenos vecinos (Fig. 45. A). El experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) muestra una señal en 7.81 ppm en el plano de los hidrógenos que corresponde al H-4, está señal correlaciona con la señal en 14.40 ppm del plano de los carbonos por lo que corresponde al C-4. En 6.90 ppm se encuentra el H-5 y correlaciona con la señal en 107.90 ppm que es asignada al C-5. A campo más alto en 99.93 ppm se encuentra la señal que por correlación es asignada al C-8 en base a la señal en 6.85 ppm del H-8 (Fig. 45. B).

6.3.9. Análisis espectroscópico del producto de la reducción del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno

El bitiofeno obtenido de la semi- síntesis se identificó como 5-butil-2,2'- bitiofeno mediante la comparación del espectro de ^1H -RMN del producto obtenido y del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno. En el espectro de ^1H -RMN a 400 MHz (Fig. 46) se observan las señales de los hidrógenos del heterociclo de 6.72 a 7.20 ppm. Las señales de los hidrógenos de la cadena lateral del 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno que se observan de 5.55 a 6.722 ppm (Fig. 25) ya no se encuentran en el espectro de hidrógeno del producto obtenido (Fig. 46. A). A campo más alto de 2.85 a 1.0 ppm se observa señales triples y múltiples que integran para dos y tres hidrógenos y que corresponden a los H-6,H-7,H-8 y H-9 de la cadena lateral del 5-butil-2,2'- bitiofeno (Fig. 46. B).

IIQB

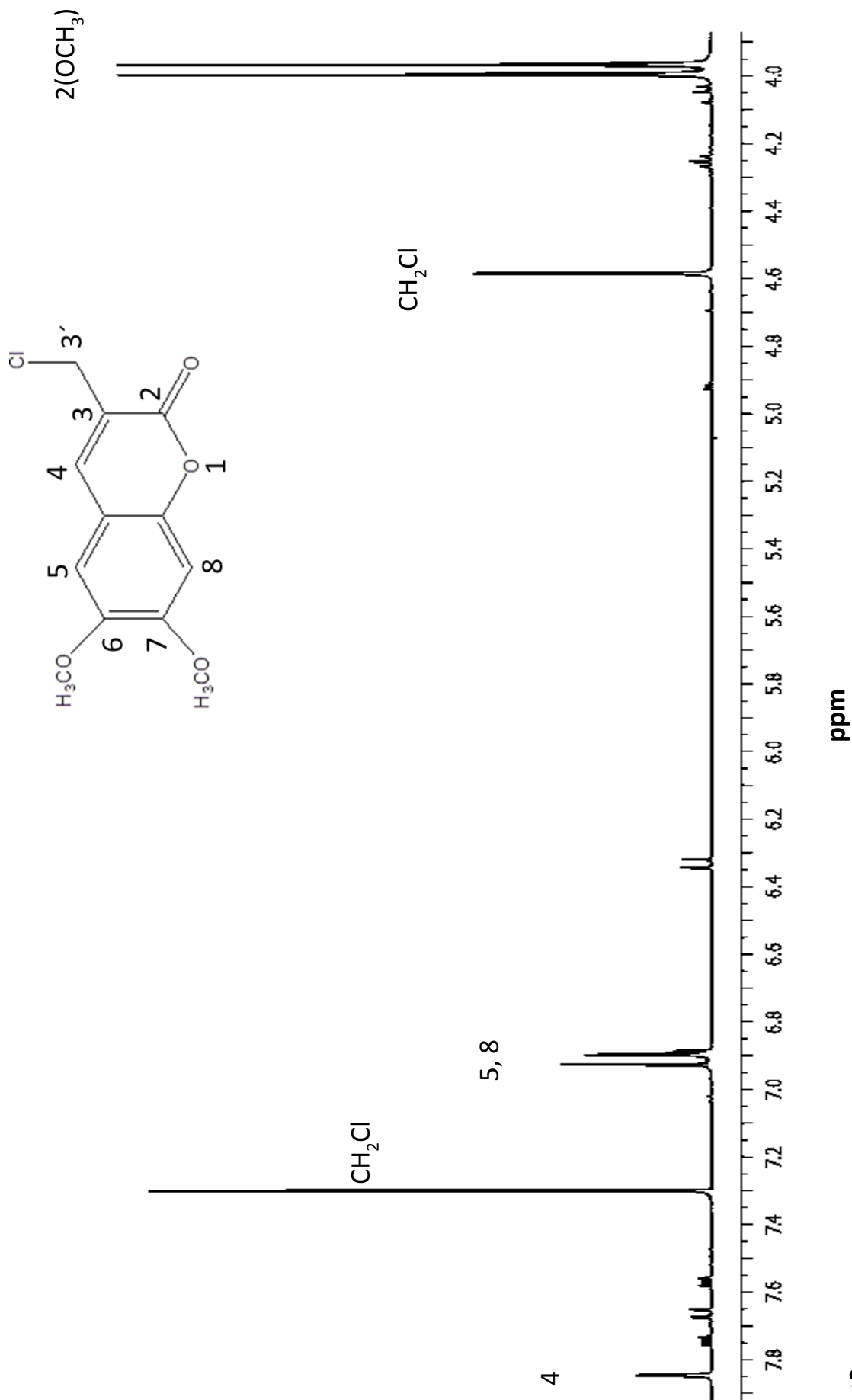
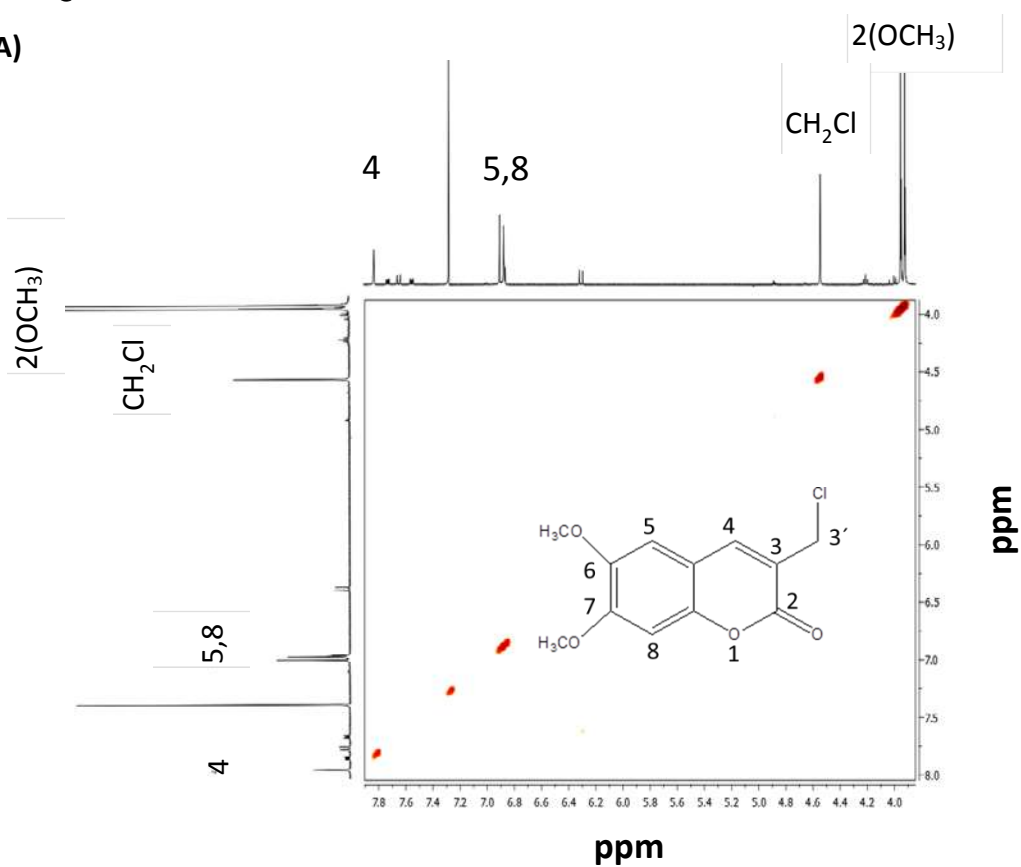


Fig. 44. Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina

IIQB

A)



B)

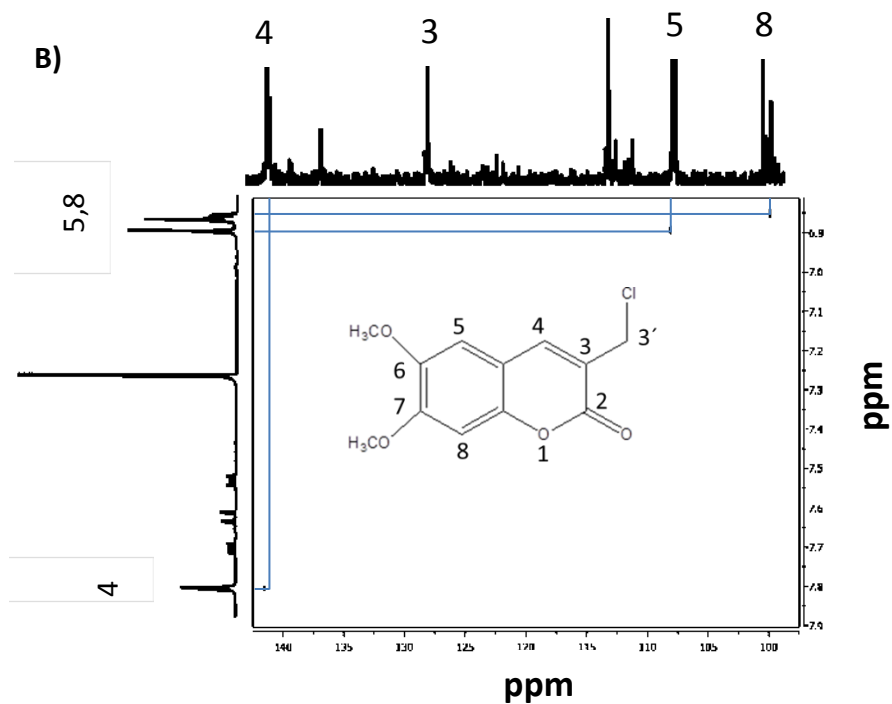
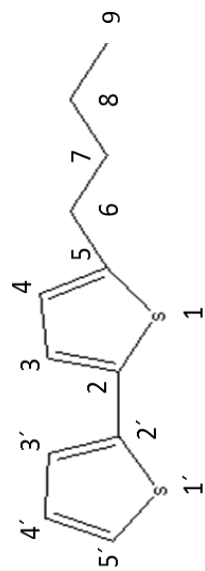
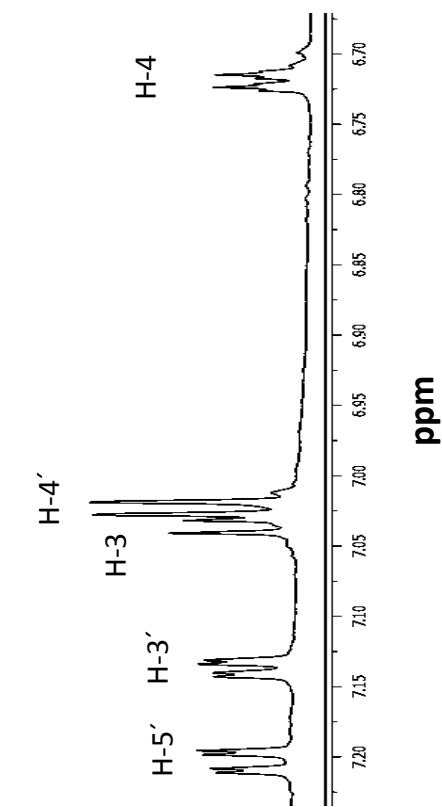


Fig. 45. A) Experimento de correlación homonuclear (COSY) y B) experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina

A)



B)

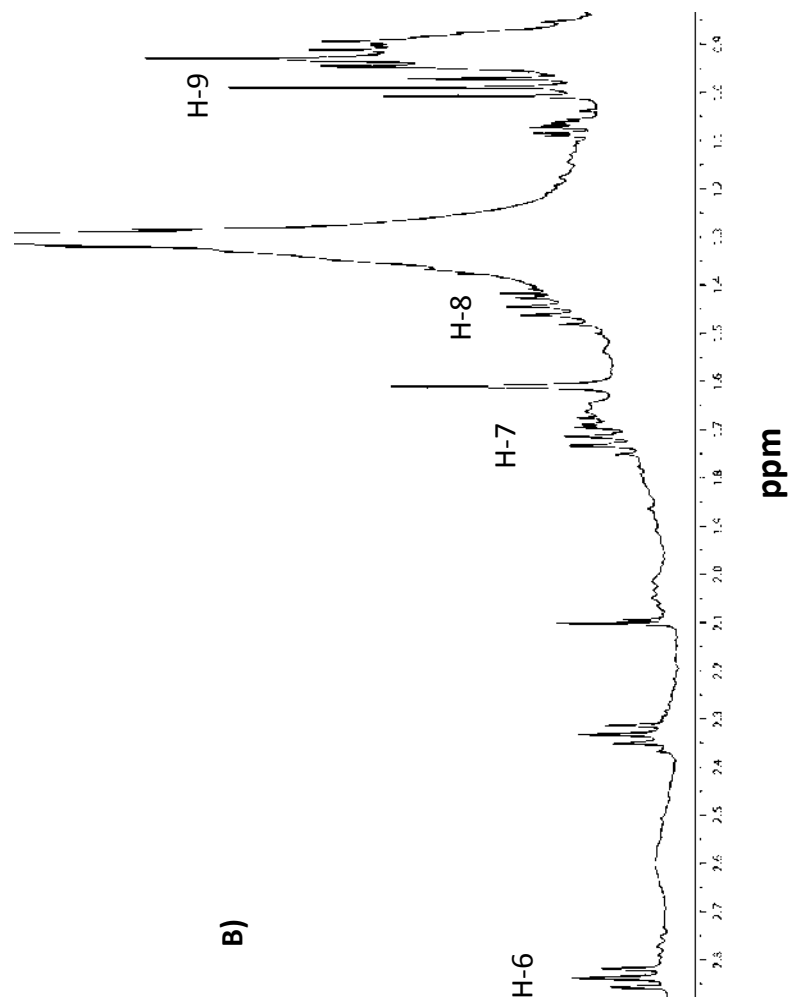


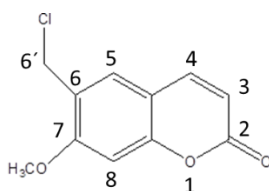
Fig. 46. A. Espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H del 5-butil-2,2'- Bitiofeno. **A)** Fracción heterocíclica. **B)** Fracción alifática

6.4. Parte experimental

6.3.5.1. Identificación de las cumarinas modificadas químicamente

Mediante técnicas cromatográficas se identificaron las cumarinas obtenidas de la clorometilación de la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina como:

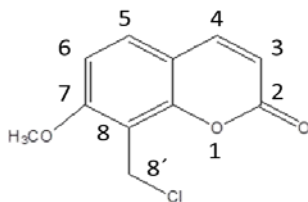
Cuadro 32. 7-metoxi-6-cloro metil cumarina	
Placa gruesa de color blanco (Acetato de etilo)	Punto de fusión 145-150°C



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7.66 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-4), 7.50 (s, 1H, H-5), 6.85 (s, 1H, H-8), 6.29 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, H-3), 4.67 (s, 2H, CH₂Cl), 3.97 (s, 3H, OMe).

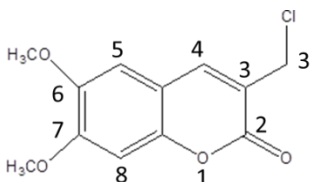
RMN ¹³C (400MHz CDCl₃), δ ppm: 160.40 (C-2), 160.31 (C-7), 156.07 (C-4a), 143.14 (C-4), 129.28 (C-5), 113.61 (C-3), 111.90 (C-8a), 99.27 (C-8), 56.23 (OMe), 40.60 (C-6).

Cuadro 33. 7-metoxi-8-cloro metil cumarina	
Placa ligeramente amarilla (Acetato de etilo)	Punto de fusión 130-145°C



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.66 (d, $J = 9.5$ Hz, 4H), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 5H), 6.90 (d, $J = 8.70$ Hz, 6H), 6.30 (d, $J = 9.5$ Hz, 3H), 4.90 (s, 2H, CH₂Cl), 3.99 (d, $J = 15.5$ Hz, 3H, MeO). **RMN ¹³C** (400MHz CDCl₃), δ ppm: 160.46 (C-7), 156.07(C-2), 153.0 (C-4a), 143.41 (C-4), 129.26 (C-5), 113.61 (C-3), 113.50 (C-6), 112.5 (C-8a), 107.53 (C-8), 56.41 (OMe), 33.56 (CH₂Cl).

Cuadro 34. 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina	
Cristales finos de color verde (Acetato de etilo)	Punto de fusión 150-155°C

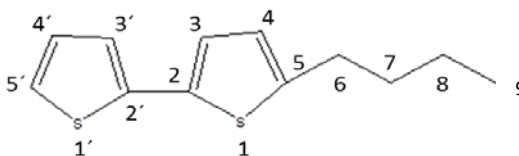


RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7.81 (s, 1H, H-4), 6.90 (s, 1H, H-5), 6.85 (s, 1H, H-8), 4.54 (s, 2H, CH₂Cl), 3.94 (dd, $J = 11.8, 2.0$ Hz, 6H, MeO).

6.3.5.2. Identificación del bitiofeno modificado químicamente

El bitiofeno obtenido mediante semi-síntesis se identificó como 5-butil-2,2'-bitiofeno mediante la comparación del espectro de ¹H-RMN con el del 5 - (but-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno

Cuadro 35. 5-butil-2,2'-bitiofeno
Aceite verde (hexano: acetato de etilo)



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ ppm: 7.20 (dd, $J = 5.1, 1.1$ Hz, 1H, H-5'), 7.14 (dd, $J = 3.6, 1.1$ Hz, 1H, H-3'), 7.04 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-3), 7.02 (dd, $J = 3.8, 5.2$ Hz, 1H, H-4'), 6.72 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H-4), 2.85 (t, 2H, H-6), 1.72 (m, 2H, H-7), 1.45 (m, 2H, H-8), 1.0 (m, 3H, H-9).

6.4.3. Actividad citotóxica de las cumarinas aisladas de *T. lucida* y modificadas químicamente

6.4.4. Actividad citotóxica de las cumarinas aisladas de *T. lucida*

Se determinó el porcentaje de mortalidad a partir de la viabilidad que se obtuvo mediante el método MTT en las líneas celulares. El efecto en la línea celular de cáncer de prostata (DU-145) expuesta a las cumarinas aisladas de *T. lucida* se observa en la gráfica 1 (A). Como control positivo se utilizó el 5-fluorouracilo y como control negativo dimetil sulfóxido (DMSO). El control 5-FU presentó la mayor actividad citotóxica sobre la línea celular DU-145 causando la mortalidad de más del 50 % desde 1 µg/mL, mientras que la 7-metoxi cumarina presentó un efecto dependiente de la concentración hasta 60 µg/mL (gráfica 1 (A)). Para la 6,7-dimetoxi cumarina el efecto en el % de mortalidad sobre la línea celular DU-145 aumentó significativamente de 0 a más del 50 % de 1 a 10 µg/mL mostrando una ligera tendencia a un aumento en el % de mortalidad al incrementar su concentración (gráfica 1 (A)).

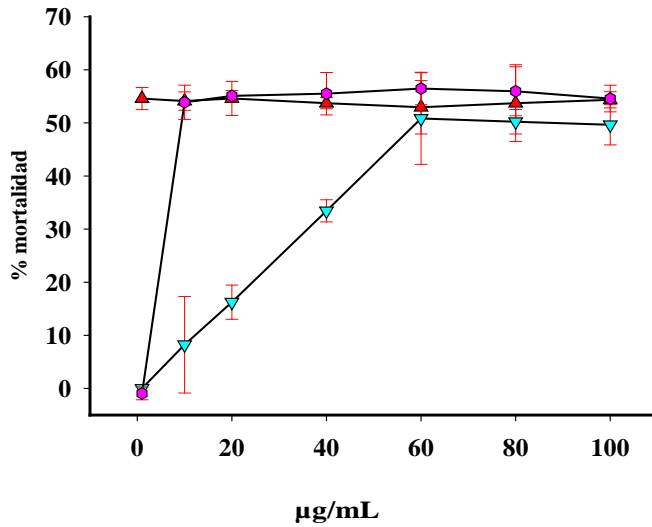
En la línea celular de carcinoma hepatocelular de hígado humano Hep-G2 se observó una mortalidad causada por el 5-FU dependiente de la concentración, el % de mortalidad aumentó de manera significativa gradualmente de 1 a 100 µg/mL (gráfica 1 (B)), mientras que no se observó citotoxicidad causada por la 7-metoxi cumarina o 6,7-dimetoxi cumarina a una concentración de hasta 100 µg/mL (Gráfica 1 (B)).

En la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina no presentaron citotoxicidad significativa a una concentración \leq a 100 µg/mL (gráfica 1 (C)).

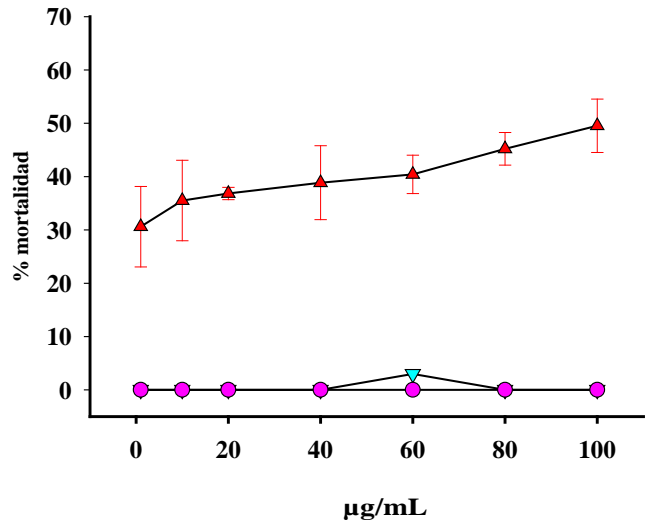
En la línea celular de fibroblastos de ratón (3T3) se observó un % de mortalidad causado por la 7-metoxi cumarina sin diferencias significativas con respecto al 5-FU, con una mortalidad por arriba del 30 % desde 1 µg/mL (gráfica 2 (D)). La 6,7-dimetoxi cumarina no exhibió citotoxicidad en esta línea celular. Las concentraciones letales cincuenta (CL₅₀) de las cumarinas aisladas de *T. lucida* en las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3 se observan en el cuadro 36.

IIQB

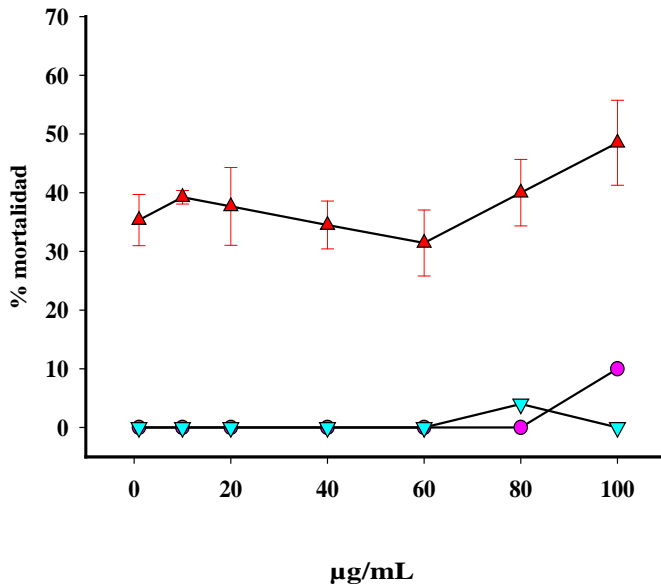
A) DU-145



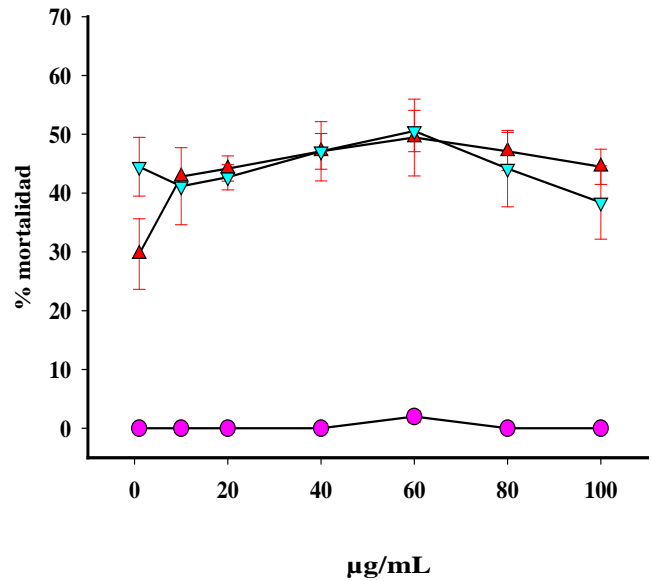
B) Hep-G2






C) MCF-7



D) 3T3



Gráfica 1. Efecto citotóxico de las cumarinas aisladas de *T. lucida* sobre las líneas celulares DU-145 (A), Hep-G2 (B), MCF-7 (C) y 3T3 (D).  5-fluorouracilo,  7-metoxi cumarina y  6,7-dimetoxi cumarina. Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S.

Concentración letal media de citotoxicidad de las cumarinas de <i>T. lucida</i> Cav				
Línea celular	CL ₅₀ (µg/mL)			
	C-7 (7-metoxi cumarina)	C-6,7 (6,7-dimetoxi cumarina)	5-FU (5-fluoruracilo)	DMSO (Dimetil sulfoxido)
DU-145	58.89±5.2	9.17±4.5	≤ 1±4.0	---
Hep-G2	---	---	100±2.5	---
MCF-7	---	---	100±6.0	---
3T3	≤ 1±5.0	---	62±3.4	---

Cuadro 36. Control positivo 5-fluoruracilo (5-FU) y control negativo dimetil sulfóxido (DMSO). “---” (no presentó toxicidad). Marcado en color rojo la CL₅₀ de la cumarina que no presentó una diferencia significativa en su citotoxicidad con respecto al control positivo. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student con un $\alpha=0.05$.

Se determinó el % de mortalidad provocado por las cumarinas modificadas químicamente en la línea celular DU-145. El compuesto que presentó la mayor actividad citotóxica sobre la línea celular DU-145 fue el control positivo provocando más del 50% de mortalidad a 1 µg/mL. La 6,7-dimetoxi-3-cloro-metil cumarina presentó el mismo efecto que el control positivo a partir de 10 µg/mL y su efecto en el % de mortalidad no fue significativamente diferente conforme aumentó su concentración (gráfica 2 (A)). La 7-metoxi-6-cloro metil cumarina presentó un efecto dependiente de la concentración así como la 7-metoxi-8-cloro metil cumarina siendo más pronunciado el efecto para esta última (gráfica 2 (A)), ambas cumarinas provocaron el 50% de mortalidad a concentraciones mayores a 50 µg/mL (cuadro 37) sin diferencias significativas a su materia prima.

Las cumarinas 7-metoxi-6-cloro metil cumarina y 7-metoxi-8-cloro metil cumarina obtenidas mediante semi-síntesis presentaron citotoxicidad en la línea celular de carcinoma hepatocelular de hígado humano (Hep-G2) (gráfica 2 (B)) con diferencias estadísticamente significativas a su materia prima, ya que la 7-metoxi cumarina no presentó actividad

IIQB

citotóxica para esta línea celular (gráfica 1 (B)). El % de mortalidad para estas dos cumarinas en la línea Hep-G2 fue dependiente de la concentración al igual que el control positivo, con el cual no mostrarán diferencias significativas. La 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina no presentó citotoxicidad para esta línea celular hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para la línea celular MCF-7 no se observó citotoxicidad debido a las cumarinas 7-metoxi-6-cloro metil cumarina, 7-metoxi-8-cloro metil cumarina y 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina (gráfica 2 (C)), por lo que se conservó el efecto de su materia prima la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina que no presentaron actividad citotóxica para esta línea celular (gráfica 1 (C)).

En la línea celular de fibroblastos de ratón (3T3) no se observó citotoxicidad de las tres cumarinas semi-sintetizadas (gráfica 2 (D)) lo que difiere con respecto a la materia prima de las cumarinas 7-metoxi-6-cloro metil cumarina y 7-metoxi-8-cloro metil cumarina ya que la 7-metoxi cumarina sí presentó citotoxicidad en esta línea celular desde una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$.

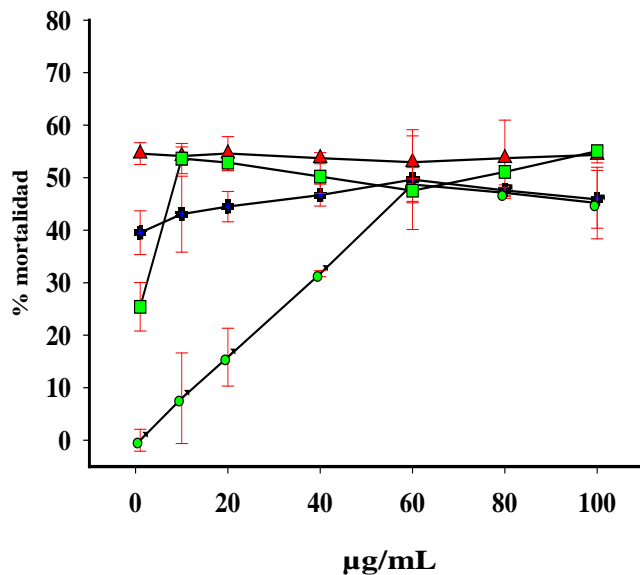
Las concentraciones letales cincuenta (CL_{50}) de las cumarinas modificadas químicamente en las líneas celulares se observan en el cuadro 37.

Concentración letal media de las cumarinas modificadas químicamente					
Líneas celulares	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
	C-6Cl (7-metoxi-6-cloro metil cumarina)	C-8Cl (7-metoxi-8-cloro metil cumarina)	C-D-3 (6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina)	5-FU (5-fluoruracilo)	DMSO (Dimetil sulfóxido)
DU-145	62.84 \pm 5.2	62.04 \pm 4.2	8.7 \pm 4.0	\leq 1 \pm 4.0	---
Hep-G2	<u>90</u> \pm 8.0	<u>100</u> \pm 5.0	---	100 \pm 2.5	---
MCF-7	---	---	---	100 \pm 6.0	---
3T3	---	---	---	62 \pm 3.4	---

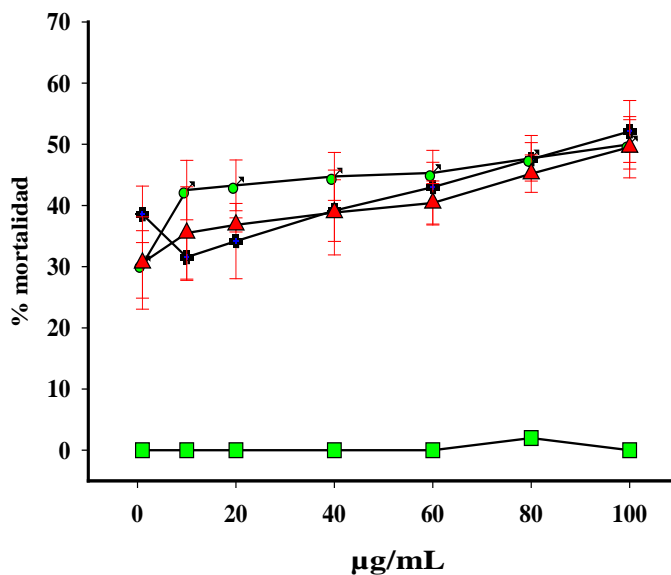
Cuadro 37. Control positivo 5-fluoruracilo (5-FU) y control negativo dimetil sulfóxido (DMSO). “---” (no presentó toxicidad). Marcado en color rojo la CL_{50} de la cumarina que no presentó una diferencia significativa en su citotoxicidad con respecto al control positivo y en cursiva subrayada la CL_{50} de la cumarina que presentó diferencia significativa a su materia prima. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student con un $\alpha=0.05$.

IIQB

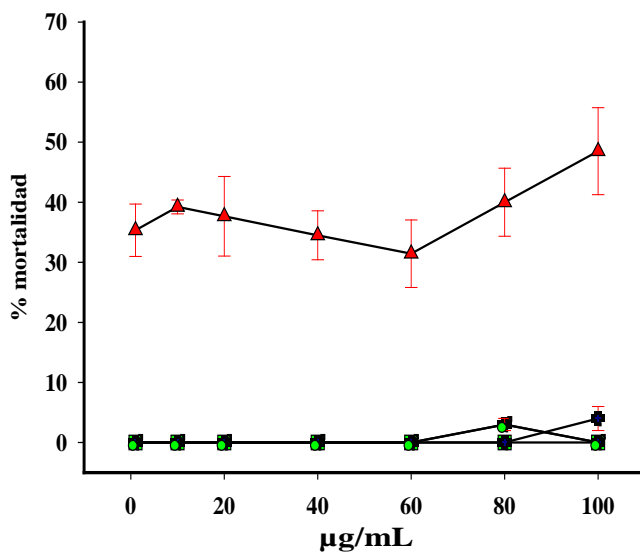
A) DU-145



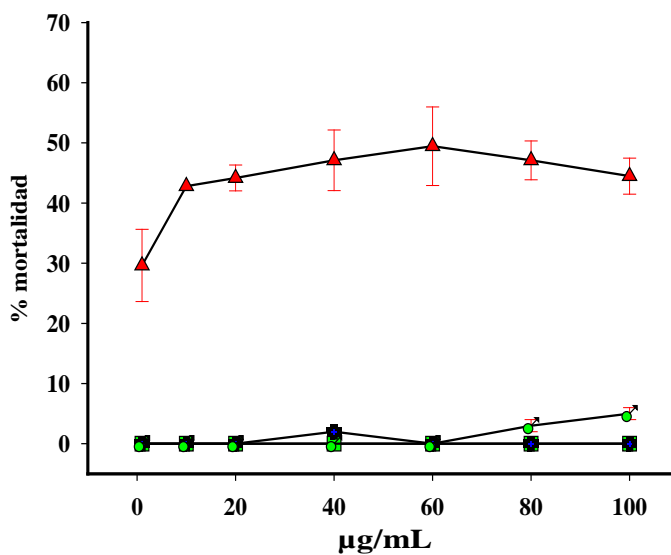
B) Hep-G2







C) MCF-7



D) 3T3



Gráfica 2. Efecto citotóxico de las cumarinas modificadas sobre las líneas celulares DU-145 (A), Hep-G2 (B), MCF-7 (C) y 3T3 (D).  5-fluorouracilo,  7-metoxi-6-cloro metil cumarina,  7-metoxi-8-cloro metil cumarina y  6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina. Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S.

6.4.5. Actividad citotóxica de los bitiofenos aislados de *T. lucida* y modificados químicamente

64.6. Actividad citotóxica de los bitiofenos aislados de *T. lucida*

Como se observa en la gráfica 3 (A) los dos bitiofenos aislados de *T. lucida* presentaron una actividad citotóxica menor al 5-fluorouracilo a una concentración por debajo de 60 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a una concentración \geq a 60 $\mu\text{g/mL}$ no hay diferencias significativas. De los dos bitiofenos ensayados en la línea celular DU-145 el 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno presentó mayor actividad citotóxica mientras que el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno aumento conforme a su concentración hasta 60 $\mu\text{g/mL}$ donde ya no mostró diferencias significativas hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 3 (A)).

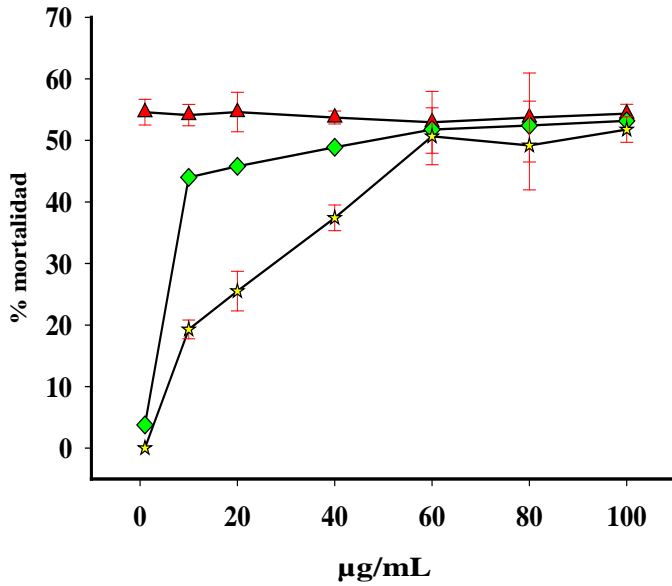
En la línea celular Hep-G2 el 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno presentó citotoxicidad sin diferencias significativas al control positivo con un efecto creciente de acuerdo a una mayor concentración, por otro lado, el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno aunque si presentó citotoxicidad en la línea Hep-G2 no mostró un 50% de mortalidad a una concentración \leq a 100 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 3 (B)).

De los dos bitiofenos ensayados contra la línea celular MCF-7 el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno presentó actividad citotóxica con un comportamiento sin diferencias significativas al 5-fluorouracilo, gráfica 3 (C). Tanto el control positivo como el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno presentaron citotoxicidad desde 1 $\mu\text{g/mL}$ alcanzando su mayor citotoxicidad a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 3 (C)). El 5-(but-3-en-1-inil)-5'-metil-2,2'-bitiofeno no presento citotoxicidad en esta línea celular.

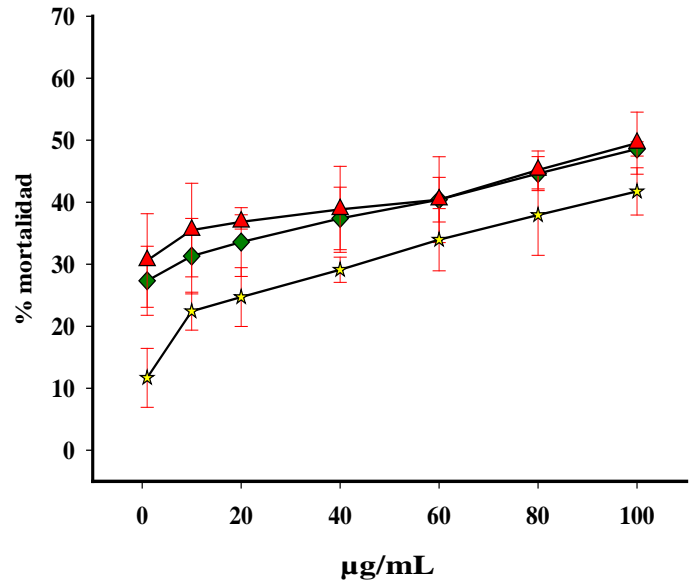
En la línea celular 3T3 el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno presentó una mortalidad arriba del 40% desde 1 $\mu\text{g/mL}$, actividad que se mantuvo sin cambios significativos hasta una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ donde aumentó significativamente y se mantuvo en 100 $\mu\text{g/mL}$ aumentando conforme la concentración (gráfica 3 (D)). El 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno no presentó citotoxicidad hasta 80 $\mu\text{g/mL}$ y en 100 $\mu\text{g/mL}$ provoco una mortalidad del 10 % (gráfica 3 (D)). La concentración letal cincuenta (CL_{50}) se muestra en el cuadro 38.

IIQB

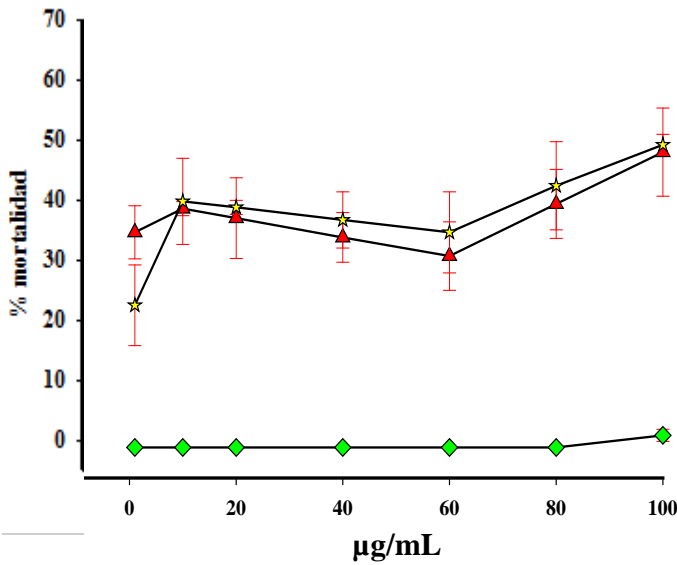
A) DU-145



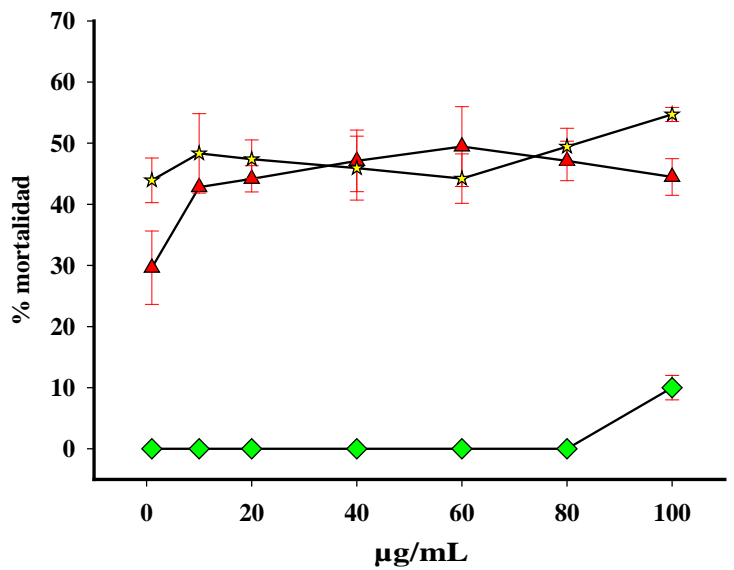
B) Hep-G2






C) MCF-7



D) 3T3



Gráfica 3. Efecto citotóxico de los bitiofenos aislados de *T. lucida* sobre las líneas celulares DU-145 (A), Hep-G2 (B), MCF-7 (C) y 3T3 (D).  5-fluorouracilo,  5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno y  5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno. Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S.

6.4.7. Actividad citotóxica del bitiofeno modificado químicamente

El 5-butil-2,2'-bitiofeno obtenido mediante reducción del 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno presentó citotoxicidad causando arriba del 30% de mortalidad a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ (gráfica 4 (A)) en la línea celular DU-145. No presento diferencias significativas con respecto a su materia prima hasta una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

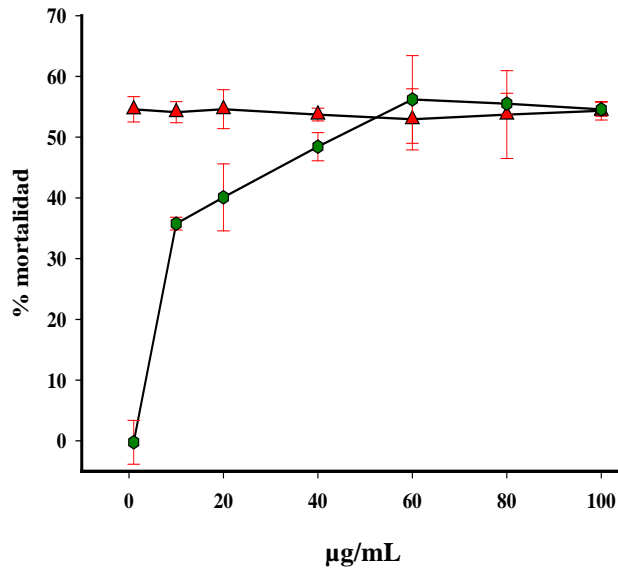
El 5-butil-2,2'-bitiofeno a diferencia de su materia prima el 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno no presentó citotoxicidad en la línea celular de carcinoma hepatocelular de hígado humano Hep-G2 (gráfica 4 (B)) ni en la línea de cáncer de mama MCF-7 y 3T3 (gráfica 4 (C y D)). Su concentración letal cincuenta (CL_{50}) se muestra en el cuadro 38.

Concentración letal media del efecto de los bitiofenos aislados de <i>T. lucida</i> Cav y modificado químicamente sobre líneas celulares					
Líneas celulares	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
	B-A (5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno)	B-B (5-(4-acetoxi-1-butilinil)-2,2'-bitiofeno)	B-C (5-butil-2,2'-bitiofeno)	5-FU (5-fluoruracilo)	DMSO (Dimetil sulfóxido)
DU-145	48.9 \pm 1.0	68.54 \pm 1.8	44.56 \pm 3.2	\leq 1 \pm 4.0	---
Hep-G2	100 \pm 4.0	---	---	100 \pm 2.5	---
MCF-7	---	100 \pm 5.0	---	100 \pm 6.0	---
3T3	---	10 \pm 4.3	---	62 \pm 3.4	---

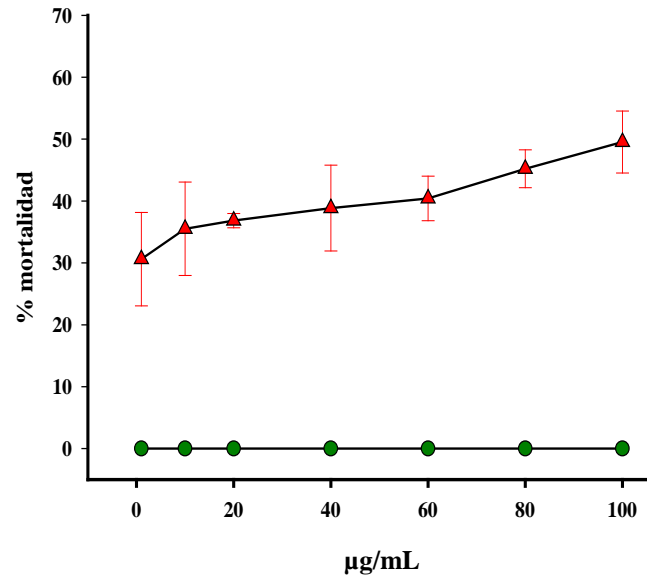
Cuadro 38. Control positivo el 5-fluorouracilo (5-FU) y control negativo dimetil sulfóxido (DMSO). "----" (no presentó toxicidad). Marcado en color rojo la CL_{50} del bitiofeno que no presentó una diferencia significativa en su citotoxicidad con respecto al control positivo. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-Student con un $\alpha=0.05$.

IIQB

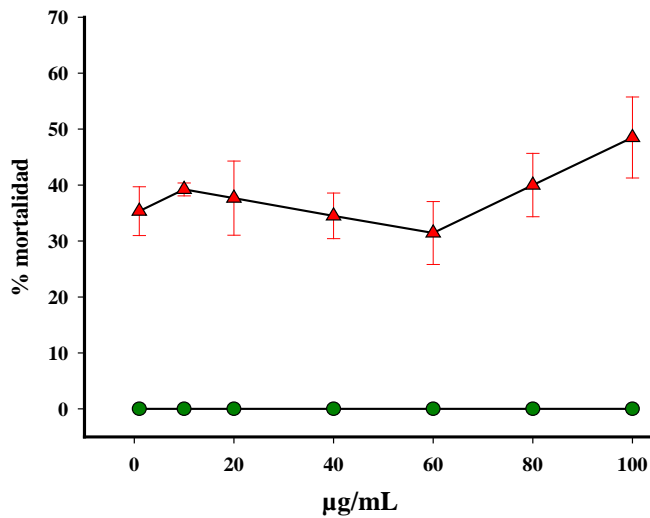
A) DU-145



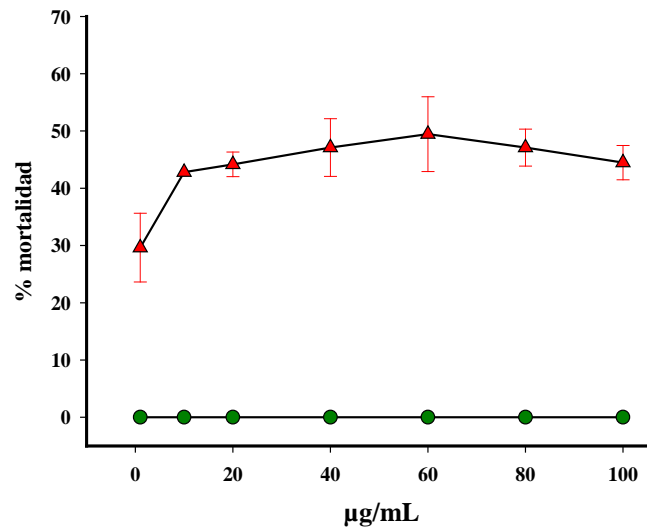
B) Hep-G2



C) MCF-7



D) 3T3



Gráfica 4. Efecto citotóxico del bitiofeno modificado químicamente sobre la línea celular DU-145 (A), Hep-G2 (B), MCF-7 (C) y 3T3 (D). ▲ 5-fluorouracilo, ● 5-butil-2,2'-bitiofeno. Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S.

6.4.8. Actividad citotóxica en presencia de luz UV-A

6.4.9. Efecto citotóxico de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente en presencia de luz UV-A

No se observó actividad citotóxica para las líneas celulares Hep-G2, MCF-7 y 3T3 por ninguna de las cumarinas ensayadas en presencia de luz UV-A (cuadro 39). En la línea celular DU-145 la cumarina semi-sintetizada 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina aumento su actividad citotóxica en presencia de luz UV-A (cuadro 39), el cual no es un cambio significativo estadísticamente con respecto al mismo compuesto en ausencia de luz UV-A.

6.4.10. Efecto citotóxico de los bitiofenos aislados y modificadas químicamente en presencia de luz UV-A

No se observó un efecto citotóxico de los bitiofenos en presencia de luz UV-A para las líneas celulares DU-145, MCF-7 y 3T3. En la línea celular Hep-G2 el 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno presentó toxicidad sin una diferencia significativa a la concentración letal cincuenta (CL_{50}) que presentó el mismo compuesto sin exposición a luz UV-A. El 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno si presentó toxicidad en Hep-G2 en presencia de luz UV-A a diferencia del mismo compuesto que sin luz UV-A no presentó actividad citotóxica (cuadro 39).

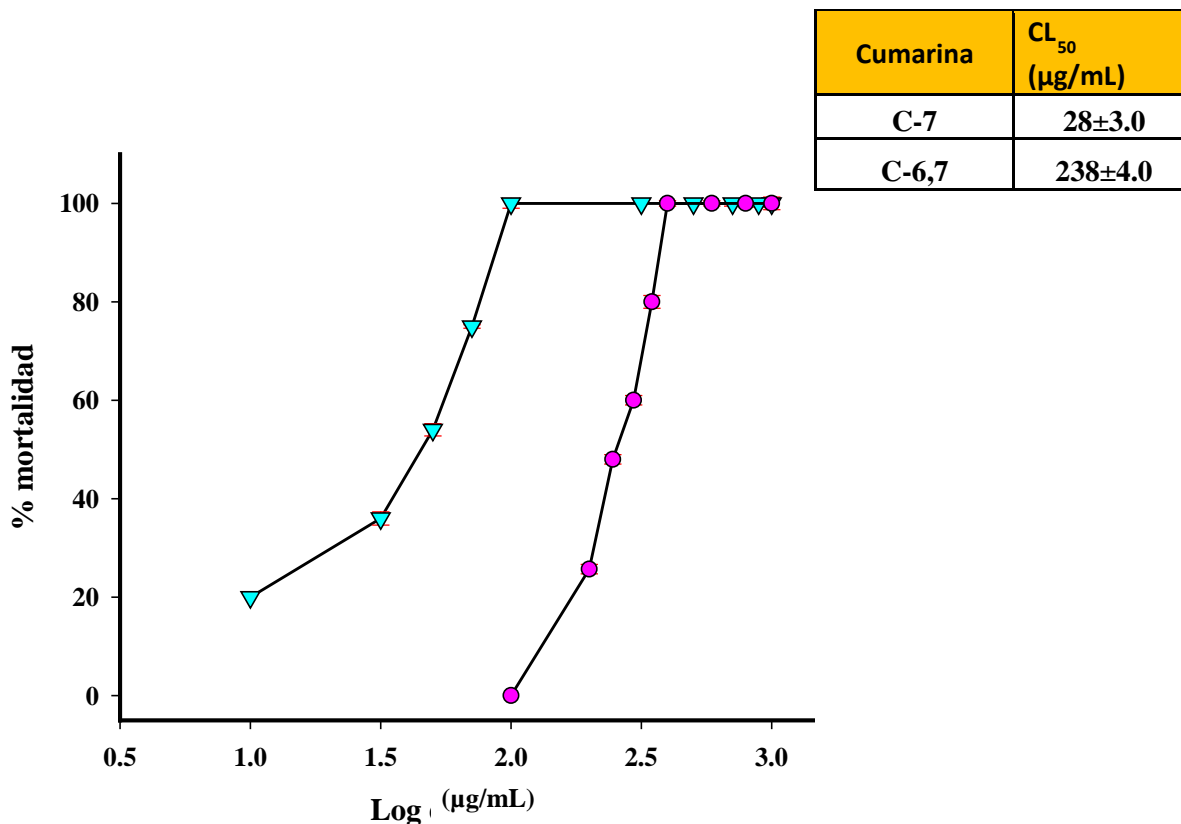
Concentración letal media sobre líneas celulares en presencia de luz UV-A de las cumarinas y bitiofenos aislados y modificados químicamente									
Líneas celulares	CL ₅₀ en µg/mL								
	C-7	C-6,7	C-6Cl	C-8Cl	C-D-3	B-A	B-B	B-C	DMSO
DU-145	---	---	---	---	1.14±3.8	---	---	---	---
Hep-G2	---	---	---	---	---	89±7.0	100±5.0	---	---
MCF-7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3T3	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Cuadro 39. C-7 (7-metoxi cumarina), C-6,7 (6,7-dimetoxi cumarina), C-6Cl (7-metoxi-6-cloro metil cumarina), C-8Cl (7-metoxi-8-cloro metil cumarina), C-D-3 (6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina), B-A (5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno), B-B (5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno), B-C (5-butyl-2,2'-bitiofeno). "----"(no presentó toxicidad). Marcado en color rojo la CL₅₀ de los compuestos que presentaron una diferencia significativa con una mayor citotoxicidad con respecto al mismo compuesto sin exposición a luz UV-A. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística *t*-Student con un $\alpha=0.05$.

6.4.11. Actividad tóxica en *A. salina* de las cumarinas y bitiofenos aislados de *T. lucida* y modificadas químicamente

6.4.12. Actividad tóxica en *A. salina* de las cumarinas aisladas de *T. lucida*

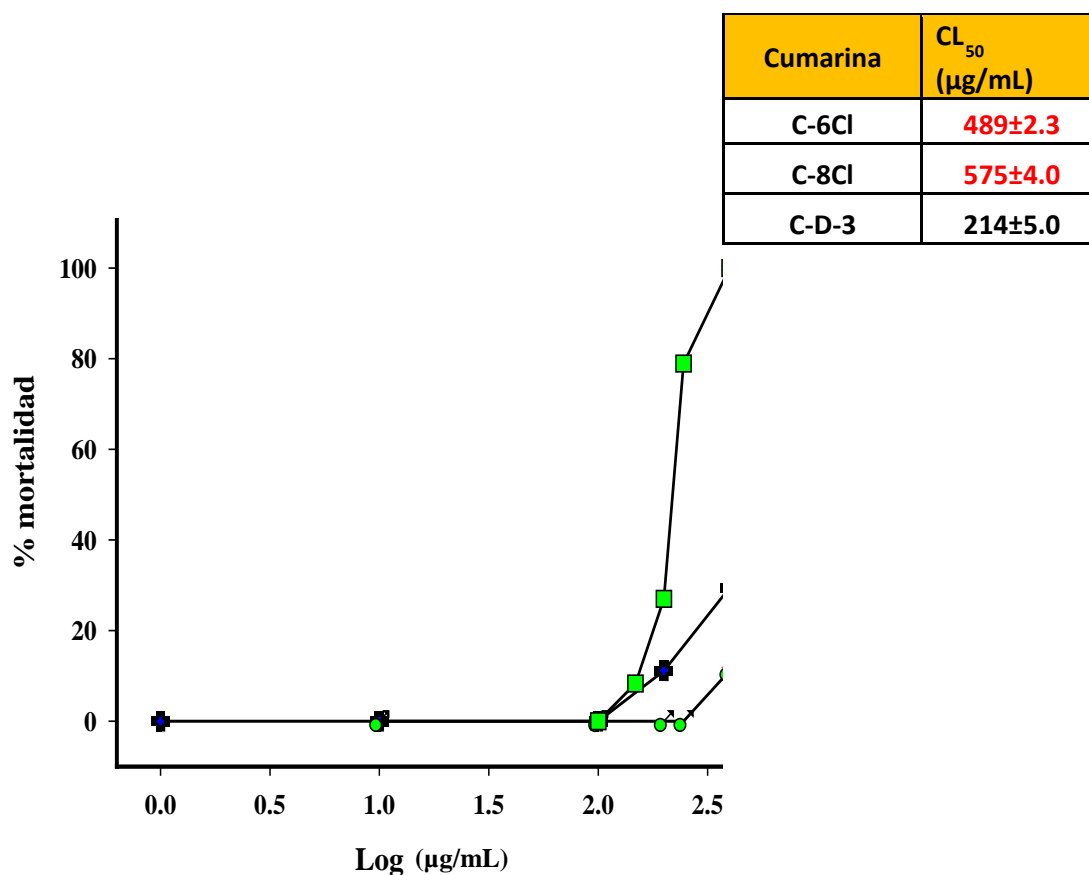
Las dos cumarinas aisladas presentaron toxicidad en *A. salina*. Se observó una mayor toxicidad en *A. salina* por la 7-metoxi cumarina (gráfica 5) mostrando toxicidad desde los 10 µg/mL, mientras que la 6,7-dimetoxi cumarina no presentó toxicidad aun a los 100 µg/mL, sin embargo, a concentraciones de 63 y 316 µg/mL para la 7-metoxi y 6,7-dimetoxi cumarina respectivamente, se observó la mortalidad del 100% de *A. salina*. Las concentraciones letales cincuenta (CL₅₀) se muestran en la gráfica 5.



Gráfica 5. Efecto tóxico sobre *A. salina* de las cumarinas aisladas de *T. lucida*. ▼ 7-metoxi cumarina (C-7) y ● 6,7-dimetoxi cumarina (C-6,7). Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S.

6.4.13. Actividad tóxica en *A. salina* de las cumarinas modificadas químicamente

Como se observa en la gráfica 6 la toxicidad disminuyó de manera significativa en las cumarinas semi-sintetizadas a partir de 7-metoxi cumarina. La 7-metoxi-6-cloro metil cumarina mostró un 100 % de mortalidad en *A. salina* a 630 µg/mL. La 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina no mostro diferencias significativas en su toxicidad con respecto a su materia prima la 6,7-dimetoxi cumarina (gráfica 5).

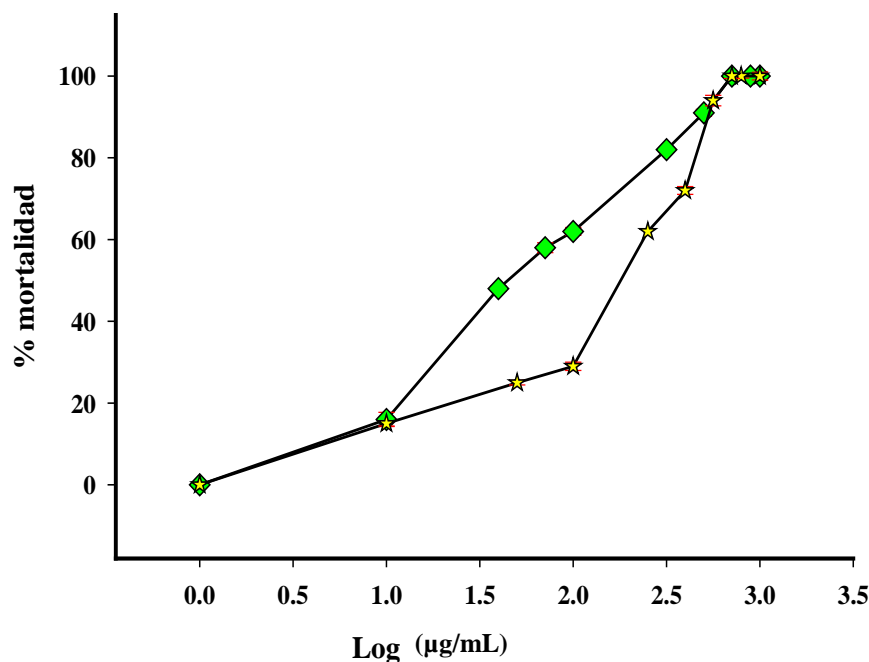


Gráfica 6. Actividad tóxica en *A. salina* de las cumarinas modificadas químicamente \blacksquare 7-metoxi-6-cloro metil cumarina (C-6Cl), \blacksquare 7-metoxi-8-cloro metil cumarina (C-8Cl) y \bullet 6,7-dimetoxi-3-cloro metil cumarina (C-D-3). Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. D.S. Marcado en color rojo la CL₅₀ si presentó un valor estadísticamente menor al de su materia prima. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-student con un $\alpha=0.05$.

6.4.14. Actividad tóxica de los bitiofenos mayoritarios purificados de *T. lucida*

De los dos bitiofenos aislados del extracto hexánico de raíz de *T. lucida* el 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno presentó la mayor toxicidad causando el 20 % de mortalidad a una concentración 10 µg/mL hasta una concentración de 500 µg/mL donde no presentaron diferencias significativas en su toxicidad ambos bitiofenos (gráfica 7).

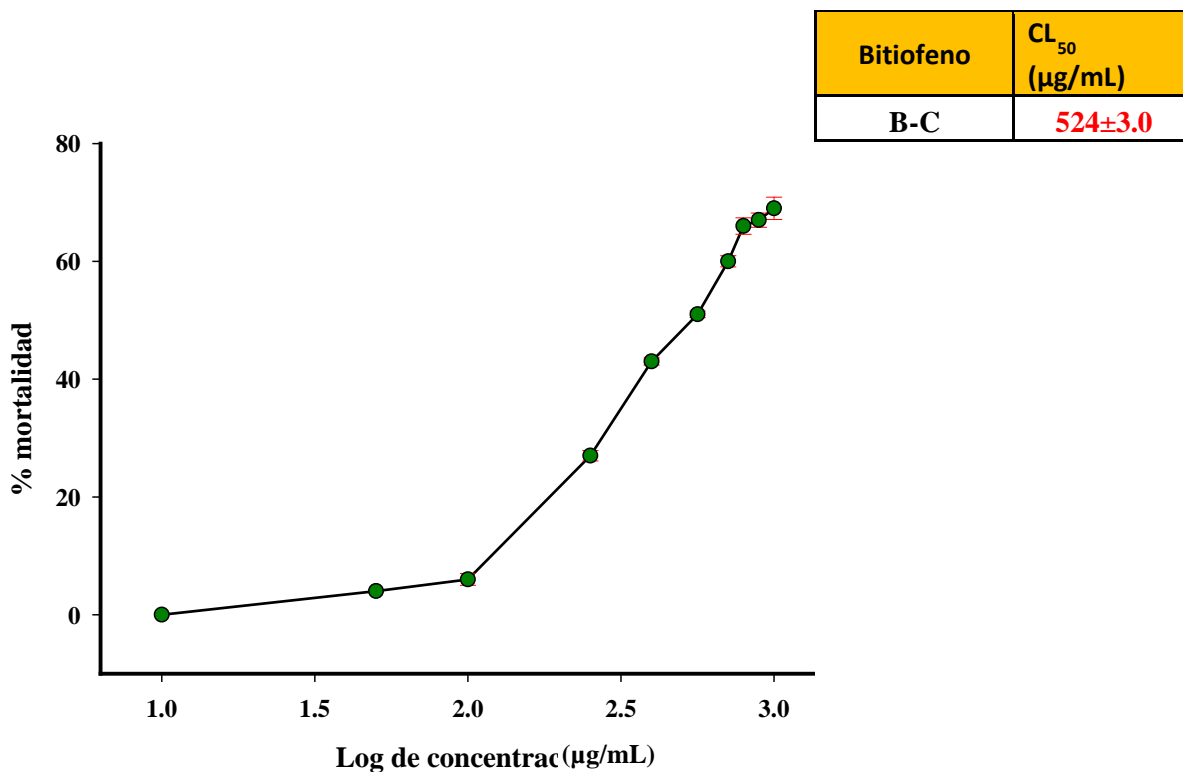
Bitiofeno	CL ₅₀ (µg/mL)
B-A	43±4.0
B-B	177±3.0



Gráfica 7. 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno (B-A) y 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno (B-B). Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. S.D.

6.4.15. Actividad tóxica del bitiofeno modificado químicamente

La reducción de los enlaces de la cadena alifática del 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno obteniendo el 5-butil-2,2'-bitiofeno redujo de manera significativa la toxicidad en *A. salina* presentando actividad tóxica a 100 µg/mL con un crecimiento significativo conforme aumentó la concentración hasta 500 µg/mL con un % de mortalidad arriba del 70 % que permaneció así hasta una concentración de 1000 µg/mL (gráfica 8).

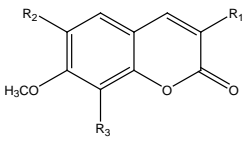


Gráfica 8. —●— 5-butil-2,2'-bitiofeno. Los datos analizados son promedio de 3 experimentos por separado con un tamaño de muestra de 3. S.D. Marcado en color rojo la CL₅₀ si presentó un valor estadísticamente menor al de su materia prima. Las comparaciones se realizaron con la prueba estadística t-student con un $\alpha=0.05$.

6.4.16. Análisis estructura-actividad de las cumarinas y bitiofenos aislados de *T. lucida* y modificados químicamente

6.4.17. Análisis estructura-actividad de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente

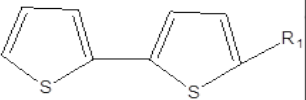
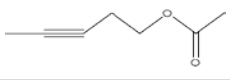
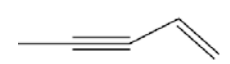

Con estos resultados podemos sugerir que sustituciones en el radical 2 y 3 en la 7-metoxi cumarina disminuye de manera significativa su toxicidad, la adición de un OCH₃ en radical 2 aumenta la citotoxicidad en DU-145 y un grupo CH₂Cl en estos radicales le confiere actividad citotóxica en Hep-G2 e inhibe la citotoxicidad en la línea celular no tumoral 3T3 (cuadro 40).

Estructura (Cumarinas)		CL ₅₀ en µg/mL				
		A. salina	DU-145	Hep-G2	MCF-7	3T3
	7-metoxi cumarina	28±3.0	58.89±5.2	---	---	≤1±5.0
	CH ₃ O en R-2 y R-3	238±10	9.17±4.5	---	---	---
	CH ₃ O en R-3 y CH ₂ Cl en R-2	489±7.3	62.84±5.2	90±8.0	---	---
	CH ₃ O en R-3 y CH ₂ Cl en R-4	575±8.0	62.04±4.2	100±5.0	---	---
	CH ₃ O en R-2,3 y CH ₂ Cl en R-1	214±15	8.7±4.0	---	---	---

Cuadro 40. Análisis estructura-actividad de las cumarinas aisladas y modificadas químicamente
“---”(no presentó actividad)

6.4.18. Análisis estructura-actividad de los bitiofenos aislados y modificados químicamente

De acuerdo a nuestros resultados la toxicidad de los derivados de tiofenos está en función del número de insaturaciones y grupos funcionales de la cadena lateral de la estructura base del bitiofeno. Una actividad citotóxica en la línea celular DU-145 es independiente de las insaturaciones y grupos funcionales de la cadena lateral, más no así para un efecto citotóxico en otras líneas celulares como Hep-G2. La presencia de grupos funcionales como éster es necesaria para una actividad citotóxica en otras líneas celulares como MCF-7 y 3T3.

Estructura (2,2'-bitiofeno)		CL ₅₀ en µg/mL				
		A. salina	DU-145	Hep-G2	MCF-7	3T3
		177±3.0	68.54±1.8	---	100±5.0	10±4.3
		43±4.0	48.9±1.0	100±4.0	---	---
		524±7.0	44.56±3.2	---	---	---

Cuadro 41. Análisis estructura-actividad de los bitiofenos aislados y modificados químicamente
“---”(no presentó actividad)

7. Discusión

IIQB

T. lucida es una planta nativa de México que es utilizada para el tratamiento de padecimientos generales mezclada con ruda, hinojo y clavo. Esta planta se cultiva a nivel de huertos y jardines como ornamental y para el uso tradicional en dolencias estomacales y del sistema nervioso. Actualmente, se encuentra en desarrollo la búsqueda de sus condiciones óptimas de plantación y cosecha así como métodos de control de calidad con fines comerciales en países como Cuba y México (Acosta de la Luz *et al.*, 2011; 2012). En Costa Rica ya existen cultivos comerciales con la finalidad de un empleo como condimentoy se le reconoce como una efectiva hierba medicinal con actividad antifúngica, antibacteriana y antioxidante (Céspedes *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008; Olivero-Verbelet *et al.*, 2010).

De *T. lucida* se obtuvieron sus extractos hexánicos de hoja y raíz debido a que la hoja es el órgano primario de biogénesis de cumarinas en donde tienen una función de defensa contra plagas y depredadores (Murray *et al.*, 1982). Por otro lado, los bitiofenos han sido reportados con mayores concentraciones en la raíz con respecto a los órganos restantes de *T. lucida* en donde tienen una función como compuestos biocidas (Marottiet *et al.*, 2011). Mejía-Barajas *et al.* (2010) reportaron una mayor concentración de cumarinas y bitiofenos en los extractos hexánicos de hoja y raíz con respecto a extractos de mayor polaridad y otros órganos de *T. lucida*. Los rendimientos obtenidos de la maceración de la hoja y raíz de *T. lucida* con hexano fueron de 0.95 % y 1.0 % respectivamente, valores que se observan dentro de los rendimientos generales de las plantas medicinales.

Para la purificación de las cumarinas y bitiofenosa partir de los extractos hexánicos de hoja y raíz se utilizó cromatografía en columna, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo y como fase estacionaria sílice gel. La cromatografía en columna se usa para separar cantidades de material mayores a 100 mg, para que haya una separación efectiva de los componentes la velocidad de la fase móvil a través de la columna debe ser suficientemente diferente y la longitud de la columna adecuada. En general se dice que la separación en la cromatografía se basa en la afinidad diferencial de los distintos compuestos por la fase móvil o la fase estacionaria. De esta manera se purificaron dos compuestos del extracto hexánico de hoja y dos más del extracto hexánico de raíz que mediante técnicas espectroscópicas tales como resonancia magnética nuclear y

IIQB

cromatografía de gases con detector de masas se identificaron como dos cumarinas; 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina (Fig. 47 (A y B)). Dos bitiofenos; 5 - (But-3-en-1-ino) - (2,2') - bitiofeno y 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno (Fig. 47 (C y D)). El aislamiento de estas cumarinas y bitiofenos a partir de *T. lucida* ya ha sido descrito por **Céspedes *et al.* (2006)** y **Marottiet *al.* (2010)**.

Las cumarinas son compuestos polifenólicos (**Loa *et al.*, 2009**) que se encuentran en la dieta normal y plantas medicinales (**Yugaraniet *al.*, 1992**). Se ha reportado que poseen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas (**Middleton *et al.*, 2000**). Las cumarinas sensibilizan a los organismos a la luz UV (**Singh *et al.*, 2006**) y son utilizadas en la fotoquimioterapia para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T y psoriasis (**Babilaset *al.*, 2010; Fayteret *al.*, 2010**).

La 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina aisladas de *T. lucida* presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares DU-145 y 3T3 (gráfica 1 (A y D)). Sin presentar actividad citotóxica para las líneas celulares MCF-7 y Hep-G2. En la línea celular DU-145 se observó un efecto citotóxico dependiente de la concentración para ambas cumarinas, mientras que en la línea celular 3T3 no se observó un cambio en el efecto citotóxico desde 1 µg/mL hasta 100 µg/mL para la 7-metoxi cumarina. No existen reportes de la actividad citotóxica de la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina en DU-145 por lo que es la primera ocasión en la que se reporta, sin embargo, otros derivados de las cumarinas como oxipeucedanina y decursinol han mostrado actividad citotóxica en esta línea celular (**Yimet *al.*, 2005; Jinet *al.*, 2009**). Para la 7-metoxi cumarina se han reportado otros efectos tales como estimulación de melanogénesis (**Jeong-yehet *al.*, 2006**) e inhibe la liberación de mediadores químicos de células leucémicas basofílicas RBL-2H3 de rata (**Watanableet *al.*, 2007**) y la activación del antígeno precoz del virus Epstein-Barr (**Itoet *al.*, 1998**). Además de otras actividades farmacológicas como fitotóxica (**Timothy *et al.*, 2009**), antifúngica y antibacteriana (**Céspedes *et al.*, 2006**). A diferencia de la 7-metoxi cumarina, la 6,7-dimetoxi cumarina presentó actividad citotóxica en la línea celular no tumoral 3T3 resultado que coincide con el reportado por **Pan *et al.* (2009)** en donde mencionan que un derivado de las cumarinas (scopoletina) inhibe la angiogénesis y proliferación de células sin causar citotoxicidad en células endoteliales no tumorales. Así como el reporte de

IIQB

Asmahet al. (2009) en el que mencionan que la 8-hidroxiisocapnolactona-29,39 aislada de *Micromelum minutum* mostró actividad citotóxica con una CL_{50} de 2 a 7 $\mu\text{g/mL}$ sobre las líneas celulares HL60, HeLa, Hep-G2 y no presentó actividad citotóxica en 3T3. La 6,7-dimetoxi cumarina presenta otras actividades farmacológicas como inhibición de la gomosis causada por *Citrophthora*, *Verticillium dahliae*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diplodanatalensis* y *Hendersonulactoruloidea*. (**Uziet al., 2001**), decrece la producción de mediadores inflamatorios como óxido nítrico y la prostaglandina E2 (**Seonet al., 2005**) y estimula melanogénesis (**Jeong-yehet al., 2006**).

Los tiofenos tienen usos farmacéuticos e industriales y son un tipo de producto natural que han demostrado poseer potencial significativo en fotoquimioterapia de infecciones virales y cáncer (**Marleset al., 1992**). Según **Mishra et al. (2011)** la estructura del tiofeno se ha incorporado en varios compuestos farmacológicamente activos con propiedades como antifúngicos, tóxicos (**Chobotet al., 2003; 2006**), citotóxicos (**Wang et al., 2007**) y antileismaniasicos (**Teruet al., 2011**).

El 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2') – bitiofeno presentó actividad citotóxica en las líneas celulares DU-145 y Hep-G2 con un efecto dependiente de la concentración sin diferencia significativa con respecto al 5-FU. Mientras que en las líneas MCF-7 y 3T3 no presentó actividad citotóxica. Para este bitiofeno ya existen reportes de una actividad citotóxica en las líneas celulares de leucemia humana HL60 y K562 y se ha observado que no presenta actividad citotóxica en MCF-7 y Hep-G2 a una concentración $\leq 50 \mu\text{g/mL}$ (**Wenrong et al., 2008**). Un resultado que concuerda con los obtenidos ya que este bitiofeno presentó una CL_{50} en Hep-G2 de 100 $\mu\text{g/mL}$. Para este bitiofeno se ha reportado también un efecto insecticida y termicida contra la termita *Coptotermes formosanus* (**Young-Cheolet al., 2003; Fokialakiset al., 2006**).

El 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno presentó actividad citotóxica en las líneas celulares DU-145, MCF-7 y 3T3. Este bitiofeno fue el único de los compuestos aislados que presentó actividad citotóxica en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El primer reporte del aislamiento de este compuesto menciona que fue a partir de las raíces transformadas de *T. patula* mediante *Agrobacterium rhizogenes* (**Parodi et al., 1988**). No hay reportes de actividad citotóxica de este bitiofeno pero se ha observado que presenta

IIQB

actividad contra la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa D7 sin ocasionar genotoxicidad (Muzzoliet *al.*, 2001). También presenta actividad antiprotozoaria contra *Leishmania brasiliensis* y *L. infantum* (Lima *et al.*, 2009). Así como actividad contra las formas amastigote y promastigote de *L. amazonensis* (Teruet *al.*, 2011). Otra actividad reportada es contra los dermatofitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *T. mentagrophytes* (Lima *et al.*, 2009).

Las cumarinas y tiofenos han servido como precursores para el diseño y síntesis de análogos anticancerígenos, aunado al antecedente de que estos compuestos son una fuente de nuevas estructuras pero no necesariamente la entidad final de la droga, se buscó su potencialización mediante modificaciones químicas y exposición a luz UV-A.

La clorometilación de cumarinas no ha sido estudiada aun cuando esta reacción es importante en la síntesis de fármacos ya que los compuestos órganoclorados son utilizados en procesos y aplicaciones muy variadas como pesticidas agrícolas (Arriagada *et al.*, 2004). De igual manera los compuestos que presentan un radical-Cl en su estructura son utilizados como intermediarios en la síntesis de otros compuestos debido a las condiciones necesarias de sustitución de este radical. Las cumarinas clorometiladas son utilizadas como compuestos fluorescentes ya que atraviesan rápidamente las membranas de células vivas y conservan fluorescencia hasta por 24 h. Marescaet *al.* (2010) mencionan que las cumarinas clorometiladas son compuestos intermediarios importantes en la síntesis de compuestos con propiedades anti-hepatitis "C", VIH y como inhibidores selectivos de la enzima anhidrasa carbónica. Para la clorometilación de las cumarinas aisladas de *T. lucida* se modificó el método de Lele *et al.* (1960). En función de los rendimientos obtenidos de la purificación de las cumarinas del extracto hexánico de hoja a partir de la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina se realizaron dos y una reacción respectivamente, en donde la variante fue la cantidad de paraformaldehído y temperatura utilizados. De la 7-metoxi cumarina se obtuvieron dos compuestos, uno con la sustitución del H-6 por el radical-CH₂Cl y uno más con la sustitución del H-8 por el mismo radical, estos compuestos fueron identificados como 7-metoxi-6-cloro metilcumarina y 7-metoxi-8-cloro metilcumarina (Fig. 47 (E y F)). De la 6,7-dimetoxi cumarina se obtuvo la 6,7-dimetoxi-3-cloro metilcumarina (Fig. 47 (G)) ya que el radical-CH₂Cl se adicionó en el C-3. Identificados los compuestos

IIQB

obtenidos de la clorometilación de la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina se determinó su actividad citotóxica en las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7 y 3T3.

Al adicionar el radical $-\text{CH}_2\text{Cl}$ en el C-6 o C-8 de la 7-metoxi cumarina se modificó de manera significativa la actividad citotóxica en DU-145 y MCF-7 se inhibió de manera favorable la actividad citotóxica en la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3 y le confirió citotoxicidad en la línea celular de carcinoma humano Hep-G2 (cuadro 37). Este resultado nos indica que el adicionar un radical $-\text{CH}_2\text{Cl}$ en el C-6 o C-8 de la 7-metoxi cumarina confiere actividad citotóxica en una línea celular tumoral como Hep-G2 e inhibe el mismo efecto en una línea celular no tumoral como 3T3. Para la 6,7-dimetoxi-3-cloro metilcumarina no se observó ningún cambio significativo en la citotoxicidad con respecto a su materia prima la 6,7-dimetoxi cumarina, ya que, como se observa en el cuadro 37, este derivado solo presentó actividad en la línea celular DU-145 con una CL_{50} similar a su materia prima (6,7-dimetoxi cumarina). No hay reportes de actividades farmacológicas de los compuestos obtenidos ya que estos derivados de la 7-metoxi cumarina y 6,7-dimetoxi cumarina no han sido reportados. Las sustituciones realizadas por **Lele et al. (1960)** fueron en los C-3 y C-4 de derivados de cumarinas diferentes a los utilizados en este trabajo.

Se observó una variación en la actividad citotóxica de los compuestos en las líneas celulares utilizadas. Esta puede ser debido a las características bioquímicas y fisiológicas de cada una de las líneas celulares, ya que todas se multiplican en diferente órgano como próstata, hígado y glándula mamaria, presentan diferentes factores de crecimiento como la línea celular MCF-7 que es dependiente de estrógenos a diferencia de DU-145 que no es sensible a hormonas como andrógenos (**Mayora et al., 2011**) y la línea celular 3T3 que presenta un mayor número de receptores y sistemas de segundos mensajeros. La configuración de la estructura de los compuestos obtenidos también es un factor que puede estar causando las diferencias en la actividad citotóxica, ya que al presentar un nuevo radical como el $-\text{CH}_2\text{Cl}$ se alteran propiedades físico-químicas como tamaño, polaridad y de manera importante la lipofilia. Por lo que en función a estas diferencias bioquímicas y fisiológicas de las líneas celulares así como físico-químicas de los compuestos obtenidos mediante semi-síntesis se puede observar un efecto citotóxico diferente del mismo compuesto en las líneas celulares utilizadas. Este resultado es comparable al obtenido por

IIQB

Yi-mingMaet al. (2012) donde al determinar la actividad citotóxica de 36 derivados de cumarinas en líneas celulares tumorales de colón, pulmón, hígado, cáncer cervical y leucemia, observan diferente actividad citotóxica en función de la línea celular y el compuesto, en este trabajo mencionan que de los diferentes derivados de cumarinas aquellos que contenían un radical -Cl en el C-6 presentaron la mayor actividad citotóxica.

Los rendimientos obtenidos del 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno a partir del extracto hexánico de raíz de *T. lucida* no fueron suficientes para la modificación química de este bitiofeno por lo que solo se realizó la modificación química del 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofeno. **Wenronget al. (2008)** sugirieron que la actividad citotóxica de los bitiofenos esta en función del grado de polimerización y sustituyentes de la cadena lateral del bitiofeno ya que observaron en un estudio donde evaluaron la actividad citotóxica de bitiofenos aislados del extracto etanólico de *EchinopsgrijissiHance* en las líneas celulares tumorales Hep-G2, K562, HL60 y MCF-7 que los bitiofenos con mayor número de sustituyentes y polimerización de la cadena lateral presentaron mayor citotoxicidad. Sin embargo, no evaluaron la actividad citotóxica de algún bitiofeno de cadena saturada por lo que mencionan que son necesarias modificaciones químicas de la cadena lateral de los bitiofenos que les permita afirmar su sugerencia. Bajo esta observación así como la posibilidad de modificaciones químicas de acuerdo a la estructura del 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofeno (Fig. 47 (C)) se realizó la saturación de la cadena lateral mediante una hidrogenación modificando el método de **Moriet al. (2006)**. Cabe destacar que se realizaron otras reacciones como bromaciones en donde el producto de reacción no se pudo purificar. El producto obtenido de la modificación química del 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofeno se identificó mediante $^1\text{H-RMN}$ como 5-butil-2,2'-bitiofeno (Fig. 47 (H)). Este bitiofeno fue obtenido mediante semi-síntesis a partir del mismo bitiofeno utilizado en este trabajo (5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofeno) por **Hornet al. (1963)**. Sin embargo, no lograron purificarlo, por lo que este trabajo es el primero en el que se semi-sintetiza y purifica el 5-butil-2,2'-bitiofeno.

El 5-butil-2,2'-bitiofeno presentó actividad citotóxica en la línea celular DU-145 sin diferencias significativas con respecto a su materia prima el 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-

IIQB

bitiofeno, por lo que la actividad citotóxica de los bitiofenos ensayados en la línea celular DU-145 es independiente de la cadena lateral. En contraste, esta saturación inhibió la actividad citotóxica en Hep-G2 ya que su materia prima si presentó actividad citotóxica en esta línea celular. El 5-butil-2,2'-bitiofeno no presentó citotoxicidad en MCF-7 y 3T3. Estos resultados concuerdan con lo sugerido por **Wenrong et al. (2008)** observando que la saturación de la cadena lateral del 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofenodisminuyó su actividad citotóxica, por lo que con estos resultados y los resultados de **Wenrong et al. (2008)** podemos afirmar que la actividad citotóxica de los bitiofenos está en función del grado de polimerización y radicales funcionales de su cadena lateral. No existen reportes de actividad farmacológica de este bitiofeno ya que parece no sintetizarse de forma natural y es la primera ocasión que se logra su purificación. El 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno que se diferencia del compuesto obtenido de la modificación química por un radical-OH en el cuarto carbono de la cadena lateral del bitiofeno presentó actividad contra dermatofitos (**Muzzoliet al., 2001**) por lo que la modificación química de esta cadena lateral del 5-(But-3-en-1-ino)-(2,2')-bitiofeno podría proporcionar diferentes actividades farmacológicas aun no estudiadas.

Con el antecedente de la importancia y búsqueda de compuestos que presenten la mayor actividad citotóxica en líneas celulares tumorales y el menor grado de toxicidad llevamos acabo la determinación de su toxicidad de acuerdo al método de **Meyer et al. (1982)**. Este método utiliza *A. salina* como un bio-indicador de toxicidad ya que este crustáceo presenta un tubo digestivo formado por una sola capa de células epiteliales y un sistema osmótico que le permite estar alimentándose constantemente lo que provoca que almacene una mayor concentración de compuestos en un menor tiempo que otros organismos y por ende manifieste síntomas de toxicidad como muerte al encontrarse expuesto a compuestos tóxicos en un menor lazo de tiempo (**Varó et al., 2003**). Además de que este método se ha caracterizado por su rapidez, bajo costo y confiabilidad también proporciona una correlación de actividad citotóxica (**Meyer et al., 1982**).

Las dos cumarinas aisladas del extracto hexánico de hoja de *T. lucida*, sus tres derivados clorometilados así como los dos bitiofenos aislados del extracto hexánico de raíz y el derivado saturado presentaron actividad tóxica en *A. salina*. La 7-metoxi

IIQB

cumarinapresentó la mayor actividad tóxica la cual disminuyó al adicionar el radical-CH₂Cl en el C-6 y C-8, mientras que la toxicidad de la 6,7-dimetoxi cumarina se conservó sin cambios significativos al adicionar el mismo radical en el C-3. El 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno presentó la mayor toxicidad de los bitiofenos con una CL₅₀ de 43 µg/mL, la cual disminuyó de manera considerable al saturar su cadena lateral presentando una CL₅₀ de 524 µg/mL. Este es el primer reporte acerca de la actividad tóxica en *A. salina* de estas cumarinas y bitiofenos la cual es considerable de acuerdo al método de **Meyer et al. (1986)** y se encuentran en la clase III con la clasificación de la Agencia de Protección Ambiental (**epa.gov, USA**).

Con el antecedente de que derivados de las cumarinas como las furanocumarinas son utilizadas de manera clínica en el tratamiento de padecimientos como la psoriasis y linfoma cutáneo de células T presentando ventajas como una eliminación más rápida de estos padecimientos (**Babilaset al., 2010; Fayteret al., 2010**) así como reportes de **Hudson et al. (1991)** donde evaluaron la actividad antibiótica, antiviral y citotóxica de tiofenos en presencia y ausencia de luz UV-A y observan un comportamiento dependiente de la luz UV-A, reporte que coincide con el de **Marleset al. (1992)** donde potencializan la actividad antiviral y citotóxica de 15 derivados de bitiofenos con la exposición a luz UV y **Muzzoliet al. (2001)** que potencializa la actividad contra dermatofitos del 5-(4-hidroxi-1-butinil)2,2'-bitiofeno decidimos exponer a luz UV-A (315-400 nm) el material biológico después de ser tratados con las cumarinas y bitiofenos naturales y semi-sintetizados de acuerdo al método de **Wang et al. (2007)**.

De manera general en presencia de luz UV-A las cumarinas no presentaron actividad citotóxica o tóxica en las líneas celulares DU-145, Hep-G2, MCF-7, 3T3 y *A. salina* excepción de la 6,7-dimetoxi-3-cloro metilcumarina que presentó actividad citotóxica en DU-145 y la 7-metoxi cumarina que presentó toxicidad en *A. salina*.

La 6,7-dimetoxi-3-cloro metilcumarina que mostró una CL₅₀ de 1.14 µg/mL en presencia de luz UV-A es un candidato para continuar con pruebas en animales superior ya que el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos menciona que aquellos

IIQB

compuestos que presenten una $CL_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ en líneas celulares tumorales es posible que tengan una actividad citotóxica considerable en animales superiores (**DTP NCI/NIH**).

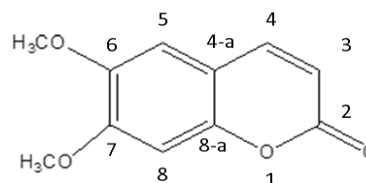
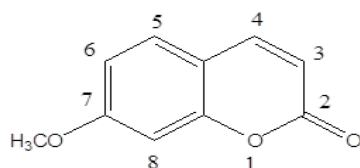
Los bitiofenos aislados de *T. lucida* en presencia de luz UV-A aumentaron de manera significativa su toxicidad en *A. salina* y su citotoxicidad en la línea celular Hep-G2 (cuadro 39), destacando el 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno ya que presentó una CL_{50} de $100 \mu\text{g/mL}$ en Hep-G2 y $9.54 \mu\text{g/mL}$ en *A. salina*. Este aumento de la actividad citotóxica en presencia de luz UV-A del 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno en la línea celular Hep-G2 coincide con el resultado reportado por **Wang et al. (2007)** en el que observan un aumento en la actividad citotóxica en presencia de luz UV-A de cuatro bitiofenos aislados de la raíz de *E. latifolius* en las líneas celulares A375-S2 y HeLa. Al igual que **Wang et al. (2007)** que mencionan que la estructura de los bitiofenos fue esencial para la activación mediante luz UV-A observamos que la saturación de la cadena lateral del bitiofeno inhibió la actividad citotóxica del 5-(but-3-en-1-inil)-5-metil-2,2'-bitiofeno en Hep-G2 y disminuyó su actividad tóxica en *A. salina*, por lo que sugerimos coincidiendo con **Wenrong et al. (2008)** que ha mayor grado de radicales funcionales y polimerización de la cadena lateral de los bitiofenos mayor es la citotoxicidad y el espectro citotóxico así como tóxico de los bitiofenos en ausencia y presencia de luz UV-A.

Con los resultados experimentales obtenidos realizamos un análisis estructura-actividad a partir de la 7-metoxi cumarina. De acuerdo a nuestros resultados observamos que la 7-metoxi cumarina presentó la mayor toxicidad en *A. salina* que la adición de otro radical- CH_3O en el sustituyente 2 reduce de manera significativa su toxicidad y se reduce aun más si se adiciona un radical- CH_2Cl en el sustituyente 2 o 3 sin causar diferencias si este $-\text{CH}_2\text{Cl}$ se adiciona en el sustituyente 1. Para la actividad citotóxica en DU-145 si se adiciona otro $-\text{CH}_3\text{O}$ a la 7-metoxi cumarina en el sustituyente 2 aumenta su actividad, esta actividad citotóxica aumentada en DU-145 ya no se altera al adicionar un $-\text{CH}_2\text{Cl}$ en los sustituyentes 1, 2 o 3, en contraste, en Hep-G2 este radical ($-\text{CH}_2\text{Cl}$) en el sustituyente 2 o 3 confiere actividad citotóxica. La adición a la 7-metoxi cumarina de un $-\text{CH}_3\text{O}$ o $-\text{CH}_2\text{Cl}$ en los sustituyentes 1, 2 o 3 (Fig. 47 (I)) inhibe de manera positiva la actividad citotóxica en la línea celular no tumoral 3T3. Como observamos en nuestros resultados los sustituyentes en las posiciones 1, 2 o 3 son importantes en el efecto producido por el compuesto, **Nguyen-**

IIQB

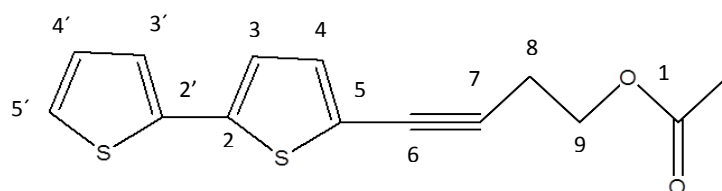
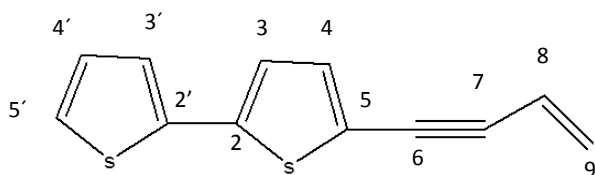
Haiet al. (2002) ya mencionan que la presencia de los radicales-CH₃O en los C-6 y C-7 de la 4-senecioiloximetil-6,7-dimetoxi cumarina son indispensables para la inhibición de la angiogénesis. Los radicales hidroxilos como sustituyentes en la 7,8-dihidroxi cumarina fueron los más importantes en la inducción de apoptosis en la línea celular U-937 (**Riveiroet al., 2007**). De igual manera **Bellutiet al. (2010)** observaron que el núcleo de la 7-metoxi cumarina fue indispensable para actividades como anti-inflamatorios y antibacterianos en un híbrido formado por cumarinas y resveratrol. En un estudio de la actividad anti-termita de derivados de cumarinas se observó que la presencia de -CH₃O ó -OH en los C-6 y C-7 de las cumarinas fue necesario para una actividad termicida, mientras que los mismos radicales en diferentes carbonos provocaron un efecto anti-alimentario y su ausencia provocó una pérdida del efecto termicida y anti-alimentario (**Adfaet al., 2010**). Para los bitiofenos el análisis estructura-actividad nos indicó que a mayor número de insaturaciones mayor es el grado de toxicidad en *A. salina* y que el espectro citotóxico es mayor en aquellos bitiofenos que presentan más sustituciones. Estos resultados son comparables y complementan lo ya mencionado y reportado por **Wenronget al. (2008)**.

Estos reportes de la actividad citotóxica y estructura-actividad junto con nuestros resultados nos indican la importancia de los sustituyentes en las cumarinas y bitiofenos naturales, semi-sintetizados y sintetizados así como el amplio potencial farmacológico específicamente citotóxico aun no estudiado de las cumarinas y bitiofenos.

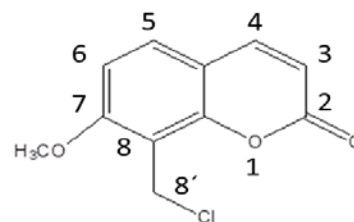
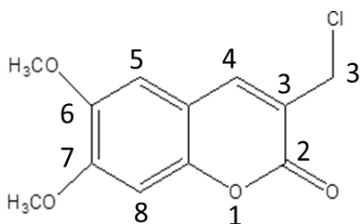
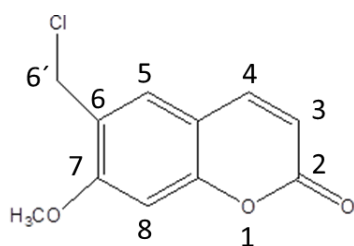


IIQB

A) 7-metoxi cumarina **B)** 6,7-dimetoxi cumarina



C) 5 - (But-3-en-1-ino) - (2,2')-bitiofeno **D)** 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofeno

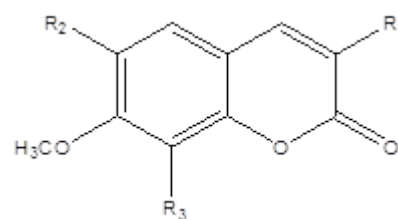
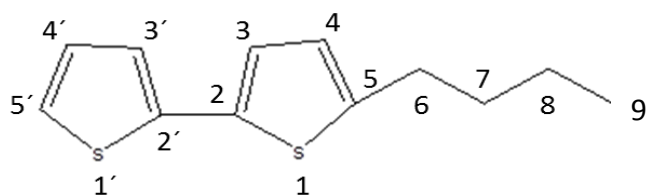


E) 7-metoxi-6-cloro

F) 7-metoxi-8-cloro

G) 6,7-dimetoxi-3-cloro

metilcumarinametilcumarinametilcumarina



H) 5-butil-2,2'- bitiofeno **I)** 7-metoxi cumarina y sustituyentes

Fig. 47. Estructura de las cumarinas y bitiofenos aislados (**A**, **B**, **C** y **D**) y semi-sintetizados (**E**, **F**, **G** y **H**). Sustituyentes en la 7-metoxi cumarina (**I**).

8. Conclusión

Las cumarinas y bitiofenos naturales de *T. lucida* Cav son citotóxicos en líneas celulares tumorales, tóxicos en *A. salina* y su actividad se altera al adicionar un radical cloruro de metilo en las cumarinas y al saturar la cadena lateral o en presencia de luz UV-A en los bitiofenos



9. Bibliografía

1. Acosta de la Luz, L., Carballo, G.C., Ramos, R. **2012**. Control de calidad de drogas vegetales: lavado y desinfección de *Artemisia* annual. y *Tagetes lucida* Cav / Quality control of vegetable drugs: washing and disinfection of *Artemisia* annual and *Tagetes lucida* Cav. *Revista cubana de plantas medicinales*. 17(1): 101-107.
2. Amara, A.A., Masry, M.H., Bogdady, H.H. **2008**. Plant crude extracts could be the solution: extracts showing in vivo antitumorogenic activity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21(2): 159-71.
3. Adfa, M., Yoshimura, T., Komura, K., Koketsu, M. **2010**. Antitermite Activities of coumarin derivatives and Scopolin from *Protium javanicum* Burm. F. *Journal of Chemical Ecology*. 36: 720–726.
4. Abdala, L.R. **1999**. Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 27(7): 753-754.
5. Alzamora, L., Colona, E., Acero, M.N., Galán, M.A., Muñoz-Mingarro, D., Linares, F., Domínguez, M.T., Alvarez, E. **2007**. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Revista Peruana de Biología*. 13 (3): 219-221.
6. Amr, Abdel-Galil, E., Hegab, M. I., Ibrahim, A. A., Abdulla M. M. **2003**. Synthesis and reactions of some fused oxazinone, pyrimidinone, thiopyrimidinone and triazinone derivatives with a thiophene ring as analgesic, anticonvulsant and antiparkinsonian agents. *Manatschefte für Chemie*. 134: 1395-1409.
7. Agnès, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Castegnaro, M. **2004**. Genotoxic activity of thiophenes on liver human cell line (HepG2). *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 733-742.
8. Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S., Rastrelli, L. **2002**. An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 65: 1773-1776.
9. Argueta, V.A., Cano, A.L.M., Rodarte, M.E., Gallardo, M.C. **1994**. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Instituto Nacional Indigenista México, D.F.* 3: 1611.

10. Arriagada, R.A., Cid, R. A., García, R. L. **2004**. Retención de organoclorados en carbonos activados. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción.
11. Avendaño, M., Charris, J. **2009**. "Prelimiar evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivates in two cell lines and *Artemia salina*." *Journal Applied Toxicology*. 29: 36-41.
12. Baba, A., Mori, A., Yasuma, T., Unno, S., Makino, H., Sohda, T. **1999**. Studies on disease-modifying antirheumatic drugs. IV. Synthesis of novel thieno[2,3-b:5,4-c']dipyridine derivatives and their anti-inflammatory effect. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 47: 993-9.
13. Babilas, P., Schreml, S., Landthaler, M., Szeimies, R.M. **2010**. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*. 26: 118–132.
14. Baldwin, E.L., Osheroff, N. **2005**. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*. 5(4): 363-72.
15. Bakker, J., Gommers, F. J., Nieuwenhuis, I., Wynberg, H. **1979**. Photoactivation
16. of the nematicidal compound α -terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species). *The Journal of Biological Chemistry*. 254: 1841–1844.
17. Bertram, G., Katzung. **2003**. Farmacología Básica y Clínica. (Quimioterapia del Cáncer 55). *Editor Manual Moderno*. 9: 885-915.
18. Bellutia, F., Fontanab, G., Dal Boc, L., Carenic, N., Giommarellic, C., Zuninoc, F. **2010**. Design, synthesis and anticancer activities of stilbene-coumarin hybrid compounds: Identification of novel proapoptotic agents. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 18(10): 3543-50.
19. Bohlmann, F., Burkhardt, T., Zdero, C. **1973**. Naturally occurring acetylenes. *Academic Press, London New York*. 44: 261-323.
20. Brigit, A. S. **2011**. Docking studies of thiophene and superoxide dismutase. *Biomirror*. 2: 1-6.
21. Butler, M.S. **2005**. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*. 22: 162–195.

22. Butler, M.S. **2008**. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*. 25: 475–516.
23. Bustos-Obregon, E., Vargas, A. **2010**. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. *Biological Research*. 43: 357-362.
24. Caceres, A., Lopez, B., Gonzalez, S. Berger, I., Tada, M., Marki, J. **1998**. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. Screening of activity of bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 62: 195-202.
25. Calixto, J.B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A. **2000**. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research*. 14: 401-418.
26. Carballo, J.L., Hernández, Z.L., Pérez, P., García, M. D. **2002**. A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2(17): 1-5.
27. Castro D.S.L. **2006**. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia levis* empleando líneas celulares derivados de tumores humanos. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Javerina en la Facultad de Ciencias Biológicas Bogotá Colombia, 1-104.
28. Céspedes, C. L., Ávila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Múgica, J., and Salgado-Garciglia, R. **2006**. Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 3521-3527.
29. Champagne, D. E., Arnason, J. T., Philogène, B. J. R., Campbell, G., McLachlan, D. G. **1984**. Photosensitization and feeding deterrence of *Euxoa messoria* (Lepidoptera:Noctuoidea) by α -terthienyl, a naturally occurring thiophene from the Asteraceae. *Experientia*. 40: 577–578.
30. Ching-Te, Chang., Chen-Tao, Lee., Fueng-Lan, Lin. **1995**. Hydroxymethylpolythiophene derivatives. *United States Patent*. 71, 695.
31. Chobot, V., Buchta, V., Jahodárová, H., Pour, M., Opletal, L., Jahodář, L., Harant, P. **2003**. Antifungal activity of a thiophene polyine from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia*. 74:288–290.
32. Chobot, V., Vytlačilová, J., Kubicová, L., Opletal, L., Jahodář, L., Laakso, I., Vuorela, P. **2006**. Phototoxic activity of a thiophene polyacetylene from *Leuzea carthamoides*. *Fitoterapia*, 77: 194-198.

33. Ciofalo, M., Petruso, S., Schillaci, D. **1996**. Quantitative assay of photoinduced antibiotic activities of naturally-occurring 2,2':5',2''-terthiophenes. *Planta Medica*. 62: 374–375.
34. Cordell, G.A., Farnsworth, N.R., Beecher, C.W., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M. **2006**, IDR Instituto de Desarrollo S.G.C.I., Campus Universitario s/n, 02071 Albacete, España.
35. Damián-Badillo, L.M., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Muñoz, R.E., Martínez-Pacheco M.M. **2008**. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*. 1: 27-33.
36. Daniels, F. **1965**. A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *The Journal of Investigative Dermatology*. 44: 259–263.
37. Denis, J.N., Greene, A.E., Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Mangatal L., Potier P. **1988**. A Highly Efficient, Practical Approach to Natural Taxol. *American Chemical Society*. 110: 5917-5919.
38. DiCosmo, F., Towers, G. H. N., Lam, J. **1982**. Photoinduced fungicidal activity elicited by naturally occurring thiophene derivatives. *Pesticide Science*. 13: 589-594.
39. Diedrich, F., Stang, P. J. **2006**. Metal Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Wiley-VCH: Weinheim*. 387–421.
40. Doré, K., Dubus, S., H. H. Lévesque, I., Brunette, M., Corbeil, G., Boissinot, M., Boivin, G., Bergeron, M. G., Boudreau, D., Leclerc, M. **2004**. Fluorescent polymeric transducer for the rapid, simple and specific detection of nucleic acids at the zeptomole level. *Journal of the American Chemical Society*. 126: 4240-4244.
41. Downum, K. R., Rosenthal, G. A., Towers, G. H. N. **1984**. Phototoxicity of the allelochemical, alpha-terthienyl, to larvae of *Manduca sexta* (L.) (Sphingidae). *Pesticide Biochemistry Physiology*. 22: 104–109.
42. Eicher, T., Hauptmann, S., Speicher, A. **2003**. Five-Membered Heterocycle. *In The Chemistry of Heterocycles*.
43. Fayter, D., Corbett, M., Heirs, M., Fox, D., Eastwood, A. **2010**. A systematic review of photodynamic therapy in the treatment of pre-cancerous skin conditions, Barrett's oesophagus and cancers of the biliary tract, brain, head and neck, lung, oesophagus and skin. *Health Technology Assessment*. 14: 1–288.

44. Florez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A., **2000**. Farmacología humana (Quimioterapia antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos, fijadores a la tubulina, inhibidores de topoisomerasas). *Masson*. 3: 1019-1037.
45. Fokialakis, N., Weste, L. A., Osbrink, L. K., Nadejda, G., Amelia, B., Alexios, L., Skaltsounis, A. R., Charles, L. C. **2006**. Antifeedant and toxicity effects of thiophenes from four *Echinops* species against the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Pest Manag Sci* 62: 832–838.
46. García, S.E. **2008**. Escrutinio de la actividad microbicida de *Eupatorium spp.* Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
47. Geran, R.I., Greenberg, M., McDonald., Abbot, B.J. **1972**. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*. 33-117.
48. Gommers, F. J., Geerlings, J. W. C. **1973**. Lethal effect of near ultraviolet light on *Pratylenchus penetrans* from roots of *Tagetes*. *Nemetologica*, 19: 389–393.
49. Grote, W., Weinmann, I. **1973**. Examination of the active substances coumarin and rutin in a teratogenic trial with rabbits. *Arzneimittel Forschung*. 23: 1319–1320.
50. Guadarrama, C.G., Alarcón, A.F., Lezama, V.R., Vázquez, P.G., Bonilla, J.H. **2008**. “Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. the forced swimming tests. *Journal of Ethnopharmacology*. 120: 277-281.
51. Gunassekaran, G.R., Priya, D.K., Gayathri, R., Sakthisekaran, D. **2011**. *In vitro* and *in vivo* studies on antitumor effects of gossypol on human stomach adenocarcinoma (AGS) cell line and MNNG induced experimental gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (4):661-6.
52. Guo, Z., Chen, Y., Wu, D., Zhu. Y., Strulher, R., Saunders, J., Xie, Q., Chen, C. **2003**. Synthesis and structure-activity relationships of thieno[2,3-d]pyrimidine-2,4-dione derivatives as potent GnRH receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 13, 3617.
53. Guo, X., Goessl, E., Jin, G., Elaina, S.R., Duguid, C., Cassidy, J., Wang, W., O’Brien, V. **2008**. Cell cycle perturbation and acquired 5-Fluorouracil chemoresistance. *Anticancer Research*. 28: 9-14.

54. Henrique, H. Moresco, H.H., Queiroz, S. G., Moacir, G., Pizzolatti, I., Brighente. **2012**. Chemical constituents and evaluation of the toxic and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(2): 319-324.
55. Hill, D.C. **1998**. Advanced screening technology and informatics for natural products drug discovery. In A. L. Harvey. *Advances in Drug Discovery Techniques*. 25–37.
56. Hing, S.C., Kim-Hung, L., Hin, C.C., Gambari, R., Chun, M.W.Y., Siu, R.M.W., Yin, G.M. C., Yi, F.L. **2008**. The preparation and *in vitro* antiproliferative activity of phthalimide based ketones on MDAMB-231 and SKHep-1 human carcinoma cell lines. *Journal Article*. 44(6): 2736-40.
57. Horn, D.H.S., Lamberton, J. A. **1963**. The nematocidal principles of *Tagetes* roots. *Australian Journal of Chemistry*. 16(3): 475-479.
58. Hoult, J.R.S., Payá, M. **1996**. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology*. 27: 713-722.
59. Howard D., Hartough, Pitman, N. J., Alvin I. Kosak. **1949**. Acylation of thiophene. United States Patent Office, Patented 2,492,692.
60. Hudson, J. B., Harris. L., Teeple, A., Towers, G. H. **1993**. The anti-HIV activity of the phytochemical alpha-terthienyl. *Antiviral Research*. 20: 33-43.
61. Ibáñez, V.L. **2007**. Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa. *Revista de la Academia Peruana de Salud*. 14(1): 90-95.
62. Ito, C., Itoigawa, M., Furukawa, H., Rao, K.S., Enjo, F., Bu, P., Takayasu, J., Tokuda, H., Nishino, H. **1998**. Xanthonas as inhibitors of Epstein-Barr virus activation. *Cancer Letters*. 132: 113-117.
63. Jarak, I., Kralj, M., Piantanida, I., Suman, L., Zinic, M., Pavelic, K., Karminski-Zamola, G. **2006**. Novel cyano- and amidino-substituted derivatives of thieno[2,3-b]- and thien-o[3,2-b]thiophene-2-carboxanilides and thieno[30,20:4,5]thieno- and thieno[20,30:4,5]thieno[2,3-c]quinolones: Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding, and antitumor evaluation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 14: 2859–2868.

64. Jeong-yeh, Y., Jeung-hyun, K., Young-gil, S., Kang-beom, K., Ju-hyung, L., Hee-sook, S., Byunghyun, P., Eun-chung, J., Jin-woo, P. **2006**. Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 27(11): 1467–1473.
65. Jin, T.K., Yeon, S.L., Rana, P.S., Agarwal, R., Sool, D.Y. **2009**. Anti-tumor activity of oxypeucedanin from *Ostericum koreanum* against human prostate carcinoma DU145 cells. *Acta Oncologica*. 48: 895-900.
66. Jordan, M.A., Thrower, D., Wilson L. **1991**. Mechanism of inhibition of cell proliferation by vinca alkaloids. *Cancer research*. 51: 2212-2222.
67. Kagan, J., Gabriel, R., Reed, S. A. **1980**. Alpha-terthienyl, a nonphotodynamic phototoxic compound. *Photochemistry and Photobiology*. 31: 465–469.
68. Kagan, J., Hassan, M., Grynspan, F. **1984**. The inactivation of acetyl cholinesterase by α -terthienyl and UV light: Studies in vitro and in the larvae of mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem Biophys Acta*. 802: 442–447.
69. Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., Crisci, J. **2007**. Panorama de la familia Astereaceae (=Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42 (1-2): 113-129.
70. Kim, D. S., Ashendal, C. L., Zhou, Q., Chang, C. T., Lee, E. S., Chang, C. J. **1998**. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. 8: 2695– 2698.
71. Koopmans, M. P., Damate, J. S., Lewan, M. D., De Leeuw, J. W. **1995**. Thermal stability of thiophene biomarkers as studied by hydrous pyrolysis. *Organic Geochemistry*. 23: 583-596.
72. Kofinas, C., Chinou, I., Loukis, A., Harvala, C., Roussakis, C., Maillard, M., Hostettmann, K. **1998**. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma line. *Planta Medica*. 64:174.
73. Kostova, I. **2005**. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents Anti-Cancer Agents. *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents*. 5: 29-46.
74. Laferriere, J., Weber, C.W., Kohlhepp, E. **1991**. Mineral composition of some traditional Mexican teas. *Human Ecology*. 41: 277-282.

75. Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J., Yang, C.S. **2005**. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 284–291.
76. Laza, L.D., Rodríguez, L.I., Sardiña, C. G. **2003**. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 8 (3): 1-11.
77. Leblanc, M., Russo, J., Kudelka, A., Smith, J. **2002**. An *in vitro* study of inhibitory activity of Gossypol, a cottonseed extract, in human carcinoma cell lines. *Pharmacological Research*. 46; 551-555.
78. Lele, S.S., Savant, N.G., Sethna, S., **1960**. Chloromethylation of coumarin derivatives. Contribution from the Frick Chemical Laboratory, Princeton University.
79. Lima, B., Agüero, M.B., Zygodlo, J., Tapia, A., Solís, C., Arias, A.R., Yaluff, G., Zacchino, S., Feresin, G.E., Schmeda-Hirschmann, G. **2009**. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*. (54): 1.
80. Linares, E., Bye, R., Flores, B. **1999**. Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
81. Lifeng, H., Orr, G.A., Horwitz, S.B. **2001**. Novel molecules that interact with microtubules and have functional activity similar to Taxol. *Drug Discovery Today*. 6 (22): 1153-1163.
82. Loa, J., Chow, P., Zhang, K. **2009**. Studies of structure–activity relationship on plant polyphenol-induced suppression of human liver cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 63: 1007–1016.
83. Lozano, J.M., Tarazona, R., Peña, J., Saint, B.G., Fischer, A. **2001**. Citotoxicidad. *Current Opinion in Immunology*. 13: 549-554.
84. Manuele, M.G., Ferraro, G., Barreiro, A.M.L., López, P., Cremaschi, G., Anesini, C. **2006**. Comparative immunomodulatory effect of scopoletin on tumoral and normal lymphocytes. *Life Sciences*. 79(21): 2043-2048.
85. Maresca, A., Supuran, C.T. **2012**. Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20(15): 4511-4514.

86. Marles, R. J., Hudson, J. B., Graham, E. A., Soucy-Breau, C., Morand, P., Compadre, R. L., Compadre, C. M., Towers, G. H. N., Arnason, J. T. **1992**. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes. *Photochemistry and Photobiology*, 56: 479–487.
87. Marotti, I., Marotti, M., Piccaglia, R., Nastri, A., Grandi, S., Dinelli, G. **2010**. Thiophene occurrence in different *Tagetes species*: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(7): 1210–1217.
88. Marshall, M.E., Mohler, J.L., Edmonds, K., Williams, B., Butler, K., Ryles, M., Weiss, L., Urban, D., Beuschen, A., Markiewicz, M. **1994**. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 120: 39.
89. Martínez, C., Yáñez, J., Rodríguez, J., Canteras, M., Alcaraz, M., Vicente, V. **2001**. Inhibición del crecimiento de la línea de melanoma murino B16F10 por diferentes compuestos polifenólicos. *Revista Española de Patología*. 34 (4): 317-324.
90. Martínez, H.I., Quintero, R.G., Márquez, M.L, González, L.J. A., Álvarez, R. A., Zarragoitia, A. **2006** Determinación de la citotoxicidad de extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el método de la *Artemia salina*. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 25 (3): 429-31.
91. Mayer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. **1982**. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
92. Mayora, A., Arvelo, F. **2011**. Cáncer de próstata y apoptosis. *Investigación Clínica*. 52(4): 376-396.
93. Mejia-Barajas, J.A., Del Rio, R.E.N.T., Martinez-Muñoz, R.E., Alberto Flores-Garcia, A., Martinez-Pacheco, M.M. **2012**. Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24 (2): 142-147.
94. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. **2000**. The Effects of plant Xavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52:673–751.
95. Mishra, R. K. K., Jha, S. K., Isha, T. **2011**. Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review. *Pharmaceutical Chemical*. 3: 38-54.

96. Monks, N.R., Ferraz, A., Bordignon, S., Machado, K.R., Lima, M.F.S., Rocha, A.B., Schwartzmann, G. **2002**. *In vitro* cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharmaceutical Biology*. 40 (7): 494–500.
97. Monroig, M.O. **2007**. Diseño y optimización de liposomas para su uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España. 1-289.
98. Morallo-Rejesus, B., Decena, A. **1982**. The activity, isolation, purification and identification of the insecticidal principles from *Tagetes*. *Philippine Journal of Crop Science*. 7: 31-36.
99. Mori, A., Miyakawa, Y., Ohashi, E., Haga, T., Maegawa, T. and Sajiki, H. **2006**. Pd/C-Catalyzed Chemoselective Hydrogenation in the Presence of Diphenylsulfide. *Journal of Chemical Information*. (37):47.
100. Muñoz, A., Cardenas, C.Y., Bottia, E.J., Patiño, J.G., Díaz, O.L., Kouznetsov, V.V., Martínez, J.R., Stashenko, E. **2007**. Capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS+ por los aceites esenciales de especies aromáticas con alto contenido de trans - anetol y estragol. *Scientia et Technica*. 33: 117-120.
101. Murakami, A., Nakamura, Y., Tanaka, T., Kawabata, K., Takahashi, D., Koshimizu, K., Ohigashi, H. **2000**. Suppression by citrus auraptene of phorbol ester- and endotoxin-induced inflammatory responses: role of attenuation of leukocyte activation. *Carcinogenesis*. 21: 1843-1850.
102. Murray, R.D.H., Méndez, J., Brown, S.A. **1982**. The natural coumarins occurrence. *Chemistry and Biochemistry. Nachrichten*. BOOK.
103. Muzzoli, M., Sacchetti, G. **2001**. Biological Activity of Four Thiophene Compounds in Resting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Pharmaceutical Biology*. 39(1): 40-42.
104. Neher, R.T. 1996. The ethnobotany of *Tagetes*. *Economic Botany*. 306-307.
105. Nguyen-Hai, N., Yong, K., Young-Jae, Y., Dong-Ho, H., Hwan-Mook, K., Byung-Zun, A. **2002**. Preliminary Structure–Antiangiogenic Activity Relationships of 4 Seneciolyloxymethyl-6,7-dimethoxycoumarin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 12: 2345–2348.
106. Nivsarkar. M., Kumar. G. P., Laloraya, M. **1991**. Super-oxide dismutase in the anal gills of the mosquito larvae of *Aedes aegypti*: its inhibition by [alpha]-terthienyl. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 16: 249-255.

107. Nivsarkar, M., Cherian, B., Padh, H. **2001**. Alpha-terthienyl: A plant-derived new generation insecticide. *Current Science*, 81: 6-25.
108. Olivero, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-Colorado, B., Stashenko, E. **2010**. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(4): 568-574.
109. Ortiz, S.D. **1989**. Elucidación del principio activo antiespasmódico en el extracto n- hexano de pericón (*Tagetes lucida* Cav.). *Revista Científica Fac. C.C.Q.Q.* 306-307.
110. Pan, R., Dai, Y., Yang, J., Li, Y., Yao, X., Xia, Y. **2009**. Anti-angiogenic potential of scopoletin is associated with the inhibition of ERK1/2 activation. *Drug Development Research*. 70: 214–219.
111. Parodi, J.F., Fischer, N.H. **1988**. Benzofuran and bithiophenes from root cultures of *Tagetes patula*. *Journal of Natural Products*. 51(3): 594-595.
112. Philogene, B. J. R., Arnason, J. T., Berg, C. W., Duval, F., Morand, P. **1986**. Efficacy of the plant phototoxin alpha-terthienyl against *Aedes intrudens* and effects of nontarget organisms. *Journal of Chemical Ecology*. 12: 893–898.
113. Pinedo, H.M., Peters, G.F. **1988**. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *Journal of Clinical Oncology*. 6: 1653-1664.
114. Pinthus, J.H., Bogaards, A., Weersink, R., Wilson, B.C., Trachtenberg, J. **2006** Photodynamic therapy for urological malignancies: Past to current approaches. *Journal of Urology*. 175: 1201–1207.
115. Ratna, A.S., Mawardi, R., Hazar B.M., Ismail, M., Aspollah, S., Taufiq-Yap, Y. H., Gwendoline, E., Cheng, L., Abdul, M.A. **2009**. Cytotoxic activity of coumarins from *Micromelum minutum*. *Pharmaceutical Biology*. 47(2): 182-185.
116. Riveiro, M.E., Moglioni, A., Vazquez, R., Gomez, N., Facorro, G., Piehl, L., Shayo, C., Davio, C. **2008**. Structural insights into hydroxycoumarin-induced apoptosis in U-937 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16(5): 2665-75.
117. Romagnoli, C., Bruni, R., Adreotti, E., Rai, M.K., Vicentini, C. B., Mares, D. **2005**. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of *capitula* from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*. 225: 57-65.

118. Rost, C., Karg, S., Riess, W., Loi, M. A., Murgia, M., Muccini, M. **2004**. Ambipolar light-emitting organic field-effect transistor. *Applied Physics Letters*. 85: 1613-1615.
119. Saklani, A., Kutty, S.K. **2008**. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 13 (3/4): 161-171.
120. Scholz, G., Pohl, I., Genschow, E., Klemm, M., Spielmann, H. **1999**. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: correlation to *in vivo* teratogenicity. *Cells Tissues Organs*. 165: 3-4.
121. Seon, I.J., Young-Jun, K., Hyoung, J.K., Jeong-Chi, L, Hong-Yong, K., Youn-Chul, K., Young-gab, Y., Hyeon-Hee, Y., Yong-Ouk, Y. 2005. Scoparone inhibits PMA-induced IL-8 and MCP-1 production through suppression of NF- κ B activation in U937 cells. *Life Sciences*. 78(25): 2937-2943.
122. Shah, A., Naliapara, Y., Sureja, D., Motohashi, N., Kurihara, T., Kawase, M., Satoh, K., Sakagami, H., Molnar. **1998**. Biological activity of 6,12-dihydro-1-benzopyrano[3,4-b][1,4]benzothiazin-6-ones. *Journal of Anticancer Research*. 18: 6163.
123. Sharma, A., Goel, H. C. **1994**. Some naturally occurring phytophototoxins for mosquito control. *Indian Journal Experimental Biology*. 32: 745-751.
124. Sullivan, J.L.G., Prado, H.G., Aguilar, D.C., Molina, J.A.G., Mandoki, J.J., Medina, F.M. **2000**. Efecto en el ciclo celular de líneas de adenocarcinoma pulmonar por cumarina y 7-hidroxycumarina. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 192-197.
125. Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J.P., Tammela, P., Marjamaki, K., Pasternack, M., Tornquist, K., Vuorela, H. **2001**. Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca²⁺ fluxes in rat pituitary GH(4)C(1) cells. *European Journal of Pharmacology*. 2: 125-133.
126. Singh, D. K., Lippman, S. M. **1998**. Cancer chemoprevention. Part 1: retinoids and carotenoids and other classic antioxidants. *Oncology-Basel*. 12: 1643-1658.
127. Siitfeld, R., **1982**. Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grown under various conditions. *Planta*. 156: 536-540.
128. Singh, R.P., Agarwal, R. **2006**. Natural flavonoids targeting deregulated cell cycle progression in cancer cells. *Current Drugs Targets*. 7: 345-354.

129. Esteves-Souza, A., Sarmento, S.T.M., Fernandes, A.C.C., Carvalho, M., Braz-Filho, R., Echevarria, A. **2002** Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma and human K562 leukaemia of alkaloides and flavonoid from two *Solanum* Species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 13 (6): 838-842.
130. Surabhi, Dayal., Mayanka, V.K. **2010**. Comparative evaluation of NBUBV phototherapy and PUVA photochemotherapy in chronic plaque psoriasis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 76(5): 533-537.
131. Sütfeld, R. **1982**. Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grown under various conditions. *Planta*. 156: 536-540.
132. Tanaka, T., Sugiura, H., Inaba, R., Nishikawa, A., Murakami, A., Koshimizu K., Ohigashi H. **1999**. Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice. *Carcinogenesis*. 20(8): 1471-1476.
133. Teru, H. T., Roberto, N. C., Ueda-Nakamura, T., Prado, B. D. F., Palazzo, J. C., Vataru, C. N. **2011**. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. *Molecules*. 16: 3469-3478.
134. Thomasset, S.C., Berry, D.P., Garcea, G., Marczylo, T., Steward, W.P., Gescher, A.J. **2007**. Dietary polyphenolic phytochemicals promising cancer chemopreventive agents in humans. A review of their clinical properties. *International Journal of Cancer*. 120: 451–458.
135. Thornes, R. D., Daly, L., Lynch, G., Breslin, B., Browne, H., Browne, H. Y., Corrigan, T., Daly, P., Edwards, G., Gaffney, E. **1994**. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 12:32.
136. Timothy, J., Haig., Terry, J., Haig, A.N., Seal, J.E., Pratley, M.A., Hanwen, W. **2009**. Lavender as a Source of Novel Plant Compounds for the Development of a Natural Herbicide. *Journal of Chemistry Ecology*. 35: 1129–1136.
137. Topp, E., Millar, S., Bork, H., Welsh, M. **1998**. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 149-154.

138. Uchiyama, T., Hara, S., Makino, M., Fujimoto, Y. **2002**. Seco-Adianane-type triterpenoids from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). *Phytochemistry*. 60: 761.
139. Valderrama, J., Fournet, A., Valderrama, C., Bastias, S., Asludillo, C., De Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G. **1999**. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of thiophene ring-containing quinones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 47: 1221.
140. Varó, I., Amat, F., Navarro, J., Barreda, M., Serrano, R., Hernández, F. **2003**. Exposure of *Artemia* spp (crustacea) cysts to the organophosphorous pesticide chlorpyrifos. Efficacy of the chorion as barrier. Centro de Investigación en Ciencias y Tecnología Aplicada.
141. Vega-Ávila, E., Espejo-Serna, A., Alarcón-Aguilar, F., Velasco-Lezama, R. **2009**. Cytotoxic Activity of Four Mexican Medicinal Plants. *Proceedings of the Western Pharmacology*. 52: 78-82.
142. Villareal, Q.J.A., Valdés R.J., Villaseñor R.J.L. **1996**. Coprología de las Asteráceas de Coahuila, México. *Acta Botánica Mexicana*. 36: 29-42.
143. Villareal, Q.J.A. **2003**. Tribu Tageteae. *Rzedowski, J. & G. C.de Rzedowski*. 113: 85.
144. Villavecencio, N.M.A., Pérez, E.B.E., Mendoza, P.E. **2008**. Citotoxicidad en células Hela de extractos de tres especies de plantas medicinales de Hidalgo, México. *Polibotánica*. 26: 137-147.
145. Vriezema, D. M., Hoogboom, J., Velonia, K., Takazawa, K., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Rowan, A. E., Nolte, R. J. **2003**. Vesicles and Polymerized Vesicles from Thiophene-Containing Rod-Coil Block Copolymers. *Angewandte Chemie International*. 42: 772-776.
146. Walker, S.L., Young, A.R. **2007**. An action spectrum (290-320 nm) for TNFalpha protein in human skin *in vivo* suggests that basal-layer epidermal DNA is the chromophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104: 19051–19054.
147. Wang, Y., Xian, L., Lin-Hao, L., Da-Li, M., Zhan-Lin, L., Ning, L. **2007**. Two new thiophenes from *Echinops latifolius* and their phototoxic activities. *Planta Medica*. 73: 796-698.

148. Watanabe, J., Shinmoto, H., Tsushida, T. **2005**. Coumarin and Flavone derivatives from Estragon and Thyme as inhibitors of chemical mediators release from RBL-2H3 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 69(1): 1-6.
149. Wenrong, J., Qiang, S., Chengtao, H., Yiyu, C., Zhongjun, M., Haibin, Q. **2008**. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. *Phytomedicine*, 15: 768-774.
150. Yamamoto, E., Wat, C. K., MacRae, W. D., Towers, G. H. N., Chan, C. F. Q. **1979**. Photoinactivation of human erythrocyte enzymes by alpha-terthienyl and phenyl heptatriene, naturally occurring compounds in Asteracea. *FEBS Letters*. 107: 134-136.
151. Yi-ming, M., Yu-bo, Z., Chuan-ming, X., Dong-mei, C., Jia, L. **2012**. Novel microtubule-targeted agent 6-chloro-4-(methoxyphenyl) coumarin induces G2-M arrest and apoptosis in HeLa cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33: 407-417.
152. Yim, D., Rana, P., Singh, C., Agarwal, S., Lee, H., Chi., Rajesh, A. **2005**. A Novel Anticancer Agent, Decursin, Induces G1 Arrest and Apoptosis in Human Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Research*. 65: (3).
153. Young-Cheol, Y., Mi-Youn, L., Hoi-Seon, L. **2003**. Emodin Isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) Seed Shows Larvicidal Activity against Three Mosquito Species. *Chonju*. 561-756.
154. Yung-Husan, C., Fang-Rong, C., Chin-Chung, W., Ming-Hon, Y., Chih-Chuang, L., Hui-Chi, Huang, Yao-Haur, K., Yang-Chang, W. **2006**. New cytotoxic 6-Oxygenated 8,9-dihydrofurocoumarins, Hedyotiscone A-C, from *Hedyotis biflora*. *Planta Medica*. 72: 75-78.
155. Yugarani, T., Tan, BK., Teh, M., Das, NP. **1992**. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids*. 27: 181-186.
156. <http://www.entheology.org/.../279-tagetes-lucida.jpg>.
<http://www.entheology.org/edoto/anmviewer.asp?a=279>
157. Global Cancer Facts & Figures **2007**. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/index>
158. Hechos y cifras del cáncer Mundial **2007**. <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/index>
159. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) **2008**. <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=inegi&c=2173&pred=1> 4 de Abril 2009

160. Organización Mundial de la Salud (OMS) **2009**. Nota preventiva No 297 febrero del 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> 1 de abril de 2009

161. The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Method (NICEATM). In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. In Vitro Cytotoxicity Test Methods BRD). Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM **2006**). http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_brd.htm. 20 de septiembre **2009**.

162. United States Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/>