

**Universidad Autónoma Metropolitana**



## **Casa abierta al tiempo**

**“Análisis de la actividad antiproliferativa de *Annona squamosa* L. y *Chrysophyllum cainito* L. sobre líneas celulares cancerosas”**

**Tesis**

Que para obtener el grado de

Maestro en Biología Experimental

Presenta:

**Biól. Exp. Omar Yarim Alcántar Ramírez**

**Codirectores:**

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

**Asesora:**

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Diciembre de 2018.

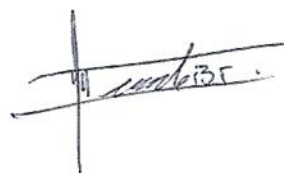
El programa de posgrado de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), registro 001481, en Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo consejo con clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 458213.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Análisis de la actividad antiproliferativa de *Annona squamosa* L. y *Chrysophyllum cainito* L. en líneas celulares cancerosas”, que presentó **Omar Yarim Alcántar Ramírez** el día 11 de diciembre de 2018.

**Presidente**

Dr. Gerardo Blancas Flores  
Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-I.



**Secretaria**

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano  
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.



**Vocal 1**

M. en C. Edgar del Carmen Sierra Palacios  
Programa de Productos Naturales, UACM Casa Libertad.



**Vocal 2**

M. en Biól. Exp. Roberto Carlos Lazzarini Lechuga  
Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-I.



## **Comité Tutorial**

Codirectores:

### **Dra. Laura Josefina Pérez Flores**

Laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.  
Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma  
Metropolitana, Iztapalapa.  
[ljpf@xanum.uam.mx](mailto:ljpf@xanum.uam.mx)  
Teléfono 015558046481

### **Dr. José Alberto Mendoza Espinoza**

Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Autónoma de la  
Ciudad de México, Campus Casa Libertad.  
[amendozaespinoza@gmail.com](mailto:amendozaespinoza@gmail.com)  
Teléfono: 5572277339

Asesora:

### **Dra. Mabel Clara Fragosos Serrano**

Departamento de Farmacia, Facultad de Química de la Universidad  
Nacional Autónoma de México.  
[mabelfragoso@unam.mx](mailto:mabelfragoso@unam.mx)  
Teléfono: 015541927422

## **Agradezco a:**

A la Dra. Laura Josefina Pérez Flores por dirigir mi trabajo, siempre tener comentarios objetivos, contagiar la amabilidad con la que siempre está dispuesta a trabajar y le agradezco también por abrirme las puertas de su laboratorio y a su equipo de trabajo.

Al Dr. José Alberto Mendoza Espinoza por aceptar dirigir este trabajo. Te agradezco infinitamente la confianza que has depositado en mí al grado de apoyar algunas de mis locas ideas, así como alimentar mi parte propositiva y también te voy a estar siempre agradecido por tu apoyo tanto académico como personal, sin duda alguna eres un ejemplo a seguir.

A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por aceptar asesorar este trabajo, ser tan paciente conmigo, también agradezco todo su apoyo y sus conocimientos en cultivo de células que fueron utilizados en este trabajo, por su confianza, por todas las charlas amenas y por hacerme sentir en familia en su equipo de trabajo.

A Verónica, Angélica, Roberto y Ulises “Nayarit”, Richard y David compañeros inseparables de la maestría con los que además de compartir salón he compartido muchos momentos divertidos, les agradezco haberlos encontrado y considerarlos mis amigos hoy y siempre.

Al Laboratorio de productos naturales de la UACM Casa Libertad y a todos los que allí laboran (Edgar, Bernarda, Conchita, Kelly, Jesica, Clara, Shindu), por permitirme

ser uno más de ustedes y también por haber encontrado un gran equipo y una familia.

### **Dedico especialmente este trabajo:**

A ti Mamá que eres un ejemplo de vida, que nunca has dejado de creer en mí en ningún momento, por siempre estar apoyándome y ser mi faro en la vida el pilar de esta tu familia.

A ti Papá por siempre ser un ejemplo de trabajo duro, siempre confiar en mí y enseñarme tantas cosas, siempre serás uno de los pilares de mi vida.

A ti hermano que siempre ha estado para apoyarme ser un amigo, compañero de vida y que espero que sea por muchos años más. Tú eres el pilar que completa a la familia.

A mi segunda familia los Rivero Duarte, que sin planearla se han convertido en una de las partes mas importantes de mi vida. A usted madre Fátima, Don Fer y mis Hermanos Fernando y Galilea les dedico también este trabajo porque siempre me han apoyado en todo.

A la memoria de mi abuelo Pascual Ramírez Trejo por haberme hecho elegir entre *“cargar el bote de mezcla o la mochila”* afortunadamente a tu lado tuve la dicha de aprender la primera y me impulsaste a la segunda, me enseñaste el valor que tiene ensuciarse las manos con trabajo duro y por eso siempre te estaré agradecido por eso.

## Resumen

Desde la antigüedad el ser humano ha conocido y utilizado las plantas para distintas actividades como la producción de medicinas debido a sus propiedades funcionales han sido parte de la medicina tradicional. Los avances en fitoquímica han permitido extraer compuestos de interés clínico, utilizados de manera específica contra enfermedades como el cáncer.

El cáncer es considerado un problema de salud pública y debido a la limitación de las terapias dirigidas a disminuir los efectos negativos de esta enfermedad y la búsqueda de nuevas sustancias en matrices poco estudiadas de los frutos es una alternativa interesante pues tiene un gran número de metabolitos con posible potencial farmacológico.

El saramuyo y el caimito han estado presentes en la medicina tradicional, utilizando diversas partes de la planta como las hojas, las semillas y las cáscaras que ayudan a combatir distintas enfermedades como la diabetes y el cáncer. El presente estudio tuvo como objetivo el evaluar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y caimito en líneas celulares cancerosas de MCF-7, MCF-7/Vin<sup>+</sup>, HCT-15, HCT-116 y HeLa. Los análisis fitoquímicos indican que los extractos metanólicos contienen una gran cantidad de compuestos fenólicos que han reportado actividad antiproliferativa. Los análisis de sulforodamina B (SRB) indican que los extractos de saramuyo exhiben actividad citotóxica (<20 µg/ml) frente a células HCT-116, HCT-15 y HeLa, mientras que una combinación 50:50 v/v de

extractos exhibe un efecto sinérgico en HCT-116 y MCF-7. Mediante el ensayo de CCK-8 se determinó que el extracto de saramuyo en concentración de 50 µg/ml exhibe un efecto antiproliferativo significativo ( $p=0.003$ ) en el grupo EXTRACTO respecto al NT a las 72 horas de exposición en líneas celular HeLa, mientras que una combinación 50:50 v/v en la misma concentración exhibe solo efecto antiproliferativo en el grupo EXTRACTO respecto al NT, desde las 48 horas ( $p=0.01$ ) hasta las 72 horas ( $p=0.002$ ) en la línea celular HCT-116.

En conclusión, los extractos metanólicos de saramuyo y caimito presentan metabolitos que han sido descritos como los principales causantes de la actividad antiproliferativa, además los estudios de SRB rebelan que los extractos poseen actividad citotóxica además de exhibir un efecto sinérgico en combinación 50:50 v/v. Se concluye también que los extractos de saramuyo muestra efecto antiproliferativo significativo en la línea celular HeLa a las 72 horas de exposición, mientras que la combinación 50:50 v/v muestra efecto antiproliferativo significativo en la línea celular HCT-116 desde las 48 horas de exposición.



## **Abstract**

Since ancient times the human being has known and used plants for different activities such as the production of medicines due to their functional properties have been part of traditional medicine. Advances in phytochemistry have allowed the extraction of compounds of clinical interest, specifically used against diseases such as cancer.

Cancer is considered a public health problem and due to the limitation of therapies aimed at reducing the negative effects of this disease and the search for new substances in poorly studied matrices of fruits is an interesting alternative because it has many metabolites with possible pharmacological potential.

The saramuyo and the caimito have been present in traditional medicine, using different parts of the plant such as leaves, seeds and peels that help to fight different diseases such as diabetes and cancer. The objective of the present study was to evaluate the antiproliferative effect of the methanolic extracts of saramuyo and caimito peels in cancer cell lines of MCF-7, MCF-7 / Vin<sup>+</sup>, HCT-15, HCT-116 and HeLa. Phytochemical analyzes indicate that methanolic extracts contain many phenolic compounds that have reported antiproliferative activity. Sulforhodamine B (SRB) analyzes indicate that saramuyo extracts exhibit cytotoxic activity (<20 µg/ml) against HCT-116, HCT-15 and HeLa cells, whereas a 50:50 v/v combination of extracts exhibits a synergistic effect on HCT-116 and MCF-7. Using CCK-8 assay, it was determined that the saramuyo extract at a concentration of 50 µg/ml exhibited a significant antiproliferative effect ( $p = 0.003$ ) in the EXTRACT group compared to the

NT at 72 hours of exposure in HeLa cell lines, whereas a combination 50:50 v / v in the same concentration exhibits only antiproliferative effect in the EXTRACT group with respect to NT, from 48 hours ( $p = 0.01$ ) to 72 hours ( $p = 0.002$ ) in the cell line HCT-116.

In conclusion, the methanolic extracts of saramuyo and caimito present metabolites that have been described as the main cause of the antiproliferative activity, in addition the SRB studies reveal that the extracts have cytotoxic activity in addition to exhibiting a synergistic effect in combination 50:50 v/v. It is also concluded that the saramuyo extracts show a significant antiproliferative effect in the HeLa cell line at 72 hours of exposure, while the 50:50 v/v combination shows a significant antiproliferative effect in the HCT-116 cell line from 48 hours after exposition.

# Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1 Las plantas y el ser humano</b> .....	1
<b>1.2. Cáncer</b> .....	2
<b>1.2.1. Diagnóstico</b> .....	3
<b>1.2.2. Tratamiento</b> .....	5
<b>1.3. Las plantas como fuentes de principios activos</b> .....	5
<b>2. Antecedentes</b> .....	7
<b>3. Justificación</b> .....	9
<b>4. Pregunta de investigación</b> .....	10
<b>5. Hipótesis</b> .....	10
<b>6. Objetivo General</b> .....	10
<b>6.1. Objetivos particulares</b> .....	11
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	11
<b>7.1. Obtención de cáscaras</b> .....	11
<b>7.2. Obtención de los extractos</b> .....	12
<b>7.3. Análisis fitoquímico</b> .....	12
<b>7.3.1 Análisis cualitativo.</b> .....	12
<b>7.3.1.1. Determinación de alcaloides</b> .....	12
<b>7.3.1.2. Determinación de taninos</b> .....	12
<b>7.3.1.3. Determinación de saponinas</b> .....	13
<b>7.3.1.4. Determinación de antraquinonas</b> .....	13
<b>7.3.1.5. Determinación de cumarinas</b> .....	13
<b>7.3.1.6. Determinación de azúcares reductores</b> .....	14
<b>7.3.2. Análisis cuantitativo.</b> .....	14
<b>7.3.2.1. Cuantificación de compuestos fenólicos</b> .....	14
<b>7.3.2.2. Cuantificación de flavonoides</b> .....	15
<b>7.3.2.3. Cuantificación de ácido cafeico, ácido gálico y ácido clorogénico.</b> .....	15
<b>7.3.2.4. Determinación y cuantificación de azúcares por HPLC-IR</b> .....	16
<b>7.3.2.5. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC</b> .....	17
<b>7.4. Ensayos farmacológicos</b> .....	17

7.4.1. Líneas Celulares .....	17
7.5. Análisis de la actividad citotóxica.....	18
7.5.1. Ensayo de sulforrodamida B (SRB).....	18
7.6. Ensayo de proliferación celular mediante WST-8 (CCK-8).....	19
7.6.1. Determinación del número celular.....	19
7.6.2. Ensayo de proliferación celular .....	20
8. Análisis estadístico.....	21
9. Resultados y discusión .....	21
9.1. Análisis fitoquímico .....	21
9.2. Ensayos farmacológicos .....	27
10. Conclusiones .....	39
11. Perspectivas.....	41
11. Referencias.....	42

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Análisis fitoquímico cualitativo de cáscaras de dos frutas tropicales.....	24
<b>Tabla 2.</b> Análisis fitoquímico cuantitativo de cáscaras de dos frutas tropicales. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Análisis de la actividad citotóxica de los extractos metanólicos de cáscaras de dos frutos tropicales. ....	28

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Dosis respuesta de líneas celulares a distintas concentraciones de los extractos de saramuyo y caimito.....	29
<b>Figura 2.</b> Dosis respuesta de distintas concentraciones de saramuyo y caimito en proporciones diferentes. ....	30
<b>Figura 3.</b> Proliferación de distintas líneas celulares a extractos disueltos en distintos vehiculos.....	32
<b>Figura 4.</b> Proliferación de la línea HCT-116 con extractos disueltos en distintos vehículos. .	34
<b>Figura 5.</b> Proliferación de la línea HeLa a distintos tiempos de exposición a los extractos. ..	35
<b>Figura 6.</b> Proliferación de la línea MCF-7 a distintos tiempos de exposición a los extractos.	37
<b>Figura 7.</b> Proliferación de la línea HCT-116 a distintos tiempos de exposición a los extractos. ....	38

## **1. Introducción**

### **1.1 Las plantas y el ser humano**

Desde la antigüedad el ser humano ha conocido y utilizado las plantas para distintas actividades como la producción de alimentos, vestido, refugio y medicinas por mencionar algunos usos. Las plantas gracias a sus propiedades funcionales son parte de la medicina tradicional. Esta actividad se basa en el uso de plantas que tienen la capacidad de disminuir, aliviar o curar enfermedades. El término de medicina tradicional ha evolucionado hasta ser reconocida por la Organización Mundial de la Salud y establece que la Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) incorpora la suma de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentales en las teorías, creencias y experiencias propias de las culturas y que se utilizan para mantener la salud, prevenir, diagnosticar y mejorar o tratar trastornos físicos y/o mentales (OMS, 2013). Las actividades relacionadas a la MTC y sus conocimientos han pasado de generación en generación transmitiéndose con el uso, preparación y extracción de los principios activos que estas plantas ofrecen (Balunas y Kinghorn, 2005).

Históricamente las terapias a base de plantas (fitoterapia) han utilizado productos como tinturas, compresas, polvos, decocciones, macerados o infusiones como métodos de extracción y formas de uso de los compuestos activos. Se estima que cerca del 80% de las personas en países en vías de desarrollo usan la medicina tradicional como fuente primaria de medicamentos (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Gracias a los avances en botánica, fitoquímica, farmacología y toxicología, el conocimiento tradicional puede ser verificado, revalorado y empleado de manera más eficiente al extraer compuestos de interés clínico, que pueden ser utilizados de manera específica contra enfermedades como es el cáncer.

## **1.2 Cáncer**

El cáncer se define como una hiperplasia patológica, en la que las células adquieren la capacidad autónoma de dividirse de manera aberrante e incontrolada, creando masas de tejido desordenado y que puede adquirir la capacidad de invadir y migrar hacia nuevos tejidos; comparten además diversas características en común: desregulación del ciclo celular e incapacidad de responder a señales de muerte programada (apoptosis) Adquiriendo así su inmortalización (Hanahan y Weinberg, 2000). Además, existen características que permiten identificar a una célula con un fenotipo canceroso de la que no lo es como: autosuficiencia de señales de crecimiento, la incapacidad de responder a señales antiproliferativas, la promoción de la angiogénesis, la desregulación en la obtención de energía, la evasión del sistema inmune, la promoción de un estado proinflamatorio y una gran inestabilidad genómica (Hanahan y Weinberg, 2011). La aparición de estas características juega un papel importante durante el inicio, la progresión y agresividad de los distintos tipos de cáncer y son de vital importancia en el desarrollo e implementación de terapias que ayuden a contrarrestar esta enfermedad.



A nivel mundial solo en 2012 se presentaron 14 millones de casos y 8.2 millones de defunciones en personas que padecieron cáncer. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que los cánceres más diagnosticados son de pulmón, hígado, estómago, mama, esófago, colon y recto, mientras que, por género los casos más diagnosticados para mujeres son: el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, en cambio para hombres son: el de próstata, pulmón, hígado, estómago, colon y recto (OMS, 2015).

A nivel nacional se observó en el 2014 que dos de cada diez hombres presentaron algún tipo de cáncer relacionado con órganos digestivos, mientras que en mujeres tres de cada diez presentaron cáncer de mama. Es de resaltar que durante este mismo año el cáncer de órganos digestivos fue causal de 33 muertes de cada 100 mil casos diagnosticados, en tanto que para las mujeres el cáncer de mama fue causa de muerte de 15.4 de cada 100 mil casos diagnosticados (INEGI, 2017).

Por lo anterior, este grupo de enfermedades por sus efectos negativos en en la salud, son blanco de investigación y creación de nuevos medicamentos dirigidos a ayudar a eliminar o disminuir los efectos negativos.

### **1.2.1 Diagnóstico**

El diagnóstico del cáncer se da en general como resultado de la presencia de alguno de los síntomas asociados a los distintos cánceres, como cambios en la piel, cambios en la forma de las mamas y cambios en la piel de las mismas, ronquera o tos persistente, cambios en la motilidad intestinal y/o problemas al defecar u orinar,

dificultad para aceptar y digerir alimentos, aumento o disminución de peso sin razón aparente, hemorragias, debilidad o fatiga a lo largo del día, entre otros síntomas (NCI, 2018). Con frecuencia el paciente puede confundir dichos síntomas como algo sin importancia; sin embargo, como se sabe el cáncer en etapas muy tempranas no produce ninguna dolencia o síntoma aparente, es por ello por lo que cuando se presenta uno o más de estos síntomas en general es porque el cáncer ha avanzado pudiendo incluso ser detectado en etapas muy tardías.

El diagnóstico en cualquiera de las etapas puede derivarse de la sospecha de cáncer por la exploración o estudios previos que siguieran su presencia, el médico a cargo puede ordenar estudios profundos por imagenología en el cual el objetivo es buscar posibles lesiones con sospecha cancerosa, el número posible de las mismas y las zonas. Estos estudios comprenden la tomografía computarizada (TC), la exploración nuclear mediante marcadores radioactivos, la ecografía, la resonancia magnética (RM), la tomografía por emisión de positrones (TEP) o bien por rayos X (NCI, 2018).

En cuanto se ha detectado una posible lesión o zona con sospecha de cáncer, el médico puede ordenar estudios de biopsia cuya finalidad es extraer una pequeña porción del tejido para posteriormente ser analizada en un laboratorio con técnicas de marcaje específico a marcadores tumorales (NCI, 2018). En todos los casos, ambas técnicas tanto las de imagenología como las biopsias son de vital importancia para el diagnóstico, estadificación y el tratamiento.

### **1.2.2 Tratamiento**

En la actualidad se cuentan con distintos métodos para combatir el cáncer, sin embargo, el tipo de tratamiento al que se tiene acceso depende en gran medida del tipo de cáncer, su localización y sobre todo la etapa de la enfermedad. Los tratamientos comprenden desde la cirugía con el fin de remover o extirpar el tumor canceroso, con el fin de curar o bien reducir la expansión de éste. La radioterapia que se basa en el uso de radioisótopos con la capacidad para destruir las células con una alta tasa proliferativa, entre ellas las cancerosas y terapias donde se utilizan compuestos citotóxicos que de igual manera causan la muerte de células con alta tasa replicativa (NCI, 2018).

En este contexto, el uso de quimioterapéuticos en combinación con cirugía sigue siendo la opción más utilizada para el tratamiento del cáncer. Los compuestos usados en quimioterapia pueden clasificarse en compuestos alquilantes como la ciclofosfamida que dañan directamente el ADN celular provocando la muerte de la misma, los compuestos que alteran directamente enzimas implicadas en la síntesis de DNA o RNA como el metotrexato, antibióticos antitumorales que interfieren en la síntesis de DNA y que además favorecen la formación de radicales libres en la célula como la doxorubicina y bloqueadores de marcadores de diferenciación que desencadenan la muerte por apoptosis como el rituximab (Chabner *et al.*, 2007).

### **1.3 Las plantas como fuentes de principios activos**

Existen diversas plantas de las cuales se han aislado compuestos de interés biológico o médico como analgésicos (morfina), antihipertensivos (reserpina) o bien

compuestos como la mangiferina aislada de *Mangifera indica*, que en diversos estudios ha presentado actividad antilipogénica (Jyotshna *et al.*, 2016), antiangiogénica y apoptótica (Núñez-Selles *et al.*, 2016).

Sin embargo, la lista de plantas que poseen metabolitos de interés crece diariamente y a pesar de que la investigación se ha centrado principalmente en hojas, raíces, flores o bien el conjunto de ellas, es importante dirigir la investigación a otros órganos vegetales como las frutas y sus distintas estructuras, tales como las cáscaras (epicarpios), de las cuales también se han aislado compuestos interesantes como las procianidinas (Li *et al.*, 2012) aisladas del pericarpo de *Litchi chinensis* Sonn que han demostrado tener propiedades antioxidantes (Maldonado *et al.*, 2005), así como actividad hipoglucemiante (Lu *et al.*, 2011); la galocatequina aislada de *Musa sp.* que es el compuesto antioxidante más abundante en la cáscara del fruto del plátano (Blasco-López y Gómez-Montaña, 2014).

Los primeros compuestos antineoplásicos aislados de plantas fueron los alcaloides de *Catharanthus roseus* en los que se encuentran la vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, que detienen el crecimiento de las células al impedir la formación de microtúbulos, lo que imposibilita la división celular y por tanto desencadena la muerte celular. Otros compuestos antineoplásicos fueron aislados de *Taxus brevifolia* de los que destaca el paclitaxel y docetaxel cuyo mecanismo de acción es unirse a la subunidad beta de la tubulina, estabilizando esta unión; como consecuencia, durante la división celular los microtúbulos no pueden separarse, lo que causa la muerte celular por apoptosis (Gurib-Fakim, 2006; Ramawat, Dass y Mathur, 2009) y en última instancia los compuestos como las epipodotoxinas

aisladas de *Podophyllum peltatum* como el tenipósido, etopósido y las camptotecinas aisladas de *Camptotheca acuminata* como la camptotecina, topotecan y rinotecan que inhiben la acción de la Topoisomerasa II desencadenando así una topología aberrante en el ADN, lo que a su vez desencadena la muerte de la célula en división (Johnson, 1968; Yang *et al.*, 1985; Malikov y Yunusov, 1997; Haaz *et al.*, 1998; Rosing *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2000 Newman y Cragg, 2007; Newman, 2008).

Frutas como el saramuyo (*Annona squamosa* L.) y el caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) son cultivadas y comercializadas al sur de México, principalmente en la península de Yucatán y además de consumirlas como fruta, también son parte de la medicina tradicional de la región (Alves *et al.*, 2008).

## **2. Antecedentes**

A nivel mundial el saramuyo y el caimito han estado presentes en la medicina tradicional, utilizando diversas partes de la planta como las hojas, las semillas y los propios frutos, que ayudan a combatir distintas enfermedades.

En 2012 Chen y colaboradores demostraron que los compuestos policétidos como las acetogeninas presentes en los extractos de semilla de saramuyo presentan actividad antitumoral significativa contra células MCF-7 y HepG2 comparadas contra otras como células HeLa y células de carcinoma pulmonar humano (A-549) (Chen *et al.*, 2012).

En 2014 Anzanelo-Meira y colaboradores demostraron por primera vez que el extracto crudo de la fracción metanólica de hojas de caimito presentan actividad anti

hipersensitiva y antiinflamatoria en un modelo murino. En este mismo año investigadores mexicanos reportaron la actividad antioxidante de las cáscaras de tres frutas tropicales en las que se incluyó el caimito y dos variedades de anacardo (*Anacardium occidentale*) (Moo-Huchin, *et al.*, 2014).

En 2015, Ibrahim, Hassan y Al-Adham estudiaron el efecto antiinflamatorio de los extractos acuosos de las hojas de saramuyo en un modelo animal de colitis ulcerosa inducida. Estos estudios reportaron que la administración oral de 300 mg/kg de extracto durante 4 semanas disminuye de manera significativa los efectos de la inducción de colitis mediante ácido acético, disminuyendo los niveles de malondialdehído (MDA) en el colon, aumentando los niveles de glutatión (GSH) así como de las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) comparados con el grupo testigo. En 2015, Li-Mei y colaboradores también reportaron actividad antihipertensiva de las fracciones acuosas y alcohólicas de la pulpa de caimito en modelos *in vivo* e *in vitro*.

En 2016. Chen y colaboradores demostraron que el aceite esencial de las semillas de *Annona squamosa* L. por administración oral, presentaba actividad antitumoral inhibiendo el crecimiento de células tumorales H<sub>22</sub> de ratón en un 53.54% y además disminuyendo de manera significativa la expresión de interleucina 6 (IL-6), la cinasa janus (JAK) y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 en su forma fosforilada (p-Stat3).

En 2017, Arana-Argáez y colaboradores reportan que los extractos metanólicos de hojas de caimito presentan efectos inmunosupresores inhibiendo

significativamente la fagocitosis, la producción de IL-6 y de TNF- $\alpha$ , asimismo presentaron actividad citotóxica en macrófagos aislados de ratones (Arana-Argáez *et al.*, 2017).

Chel-Guerrero y colaboradores evaluaron la actividad antitumoral de los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y caimito en tres líneas celulares cancerosas de cérvix (HeLa), carcinoma mamario (MCF-7) y carcinoma colorrectal (HCT-116); en dichos estudios se encontró mediante el ensayo de sulforodamina B que los extractos de saramuyo y caimito presentaron actividad citotóxica (CI<sub>50</sub>) solo en la línea celular de carcinoma colorrectal HCT-116 a concentraciones de 8.76 mg/ml y 14.01 mg/ml (Chel-Guerrero *et al.*, 2018)

### **3. Justificación**

El cáncer es considerado un problema de salud pública y debido a la limitación de las terapias dirigidas a disminuir los efectos de esta enfermedad, la búsqueda de nuevas moléculas que tengan propiedades antiproliferativas es un campo de estudio imprescindible.

Por otro lado, la búsqueda de nuevas sustancias en matrices poco estudiadas como son las cáscaras de los frutos es una alternativa fundamental, basada en el hecho de que la cáscara al ser un órgano de protección y defensa del fruto contiene un gran número de metabolitos con posible potencial farmacológico y que además pudieran ser usados en el combate del cáncer.

México cuenta con un gran número de especies frutales nativas y exóticas que presentan un interés potencial para la industria y la investigación farmacológica. De los frutos tropicales secundarios encontrados en México, principalmente en la península de Yucatán se encuentran el saramuyo (*Annona squamosa* L.) y el caimito (*Chrysophyllum cainito* L.). Las cáscaras de estas frutas en la actualidad son consideradas desperdicio ya que no son comestibles y representan aproximadamente el 30 - 60% del fruto, solo en 2015 se generaron cerca de 150 toneladas de cascara de las 384 toneladas cultivadas en Yucatán (SAGARPA, 2016), permitiendo que éstas puedan ser aprovechadas por los principios activos que aún contienen y que han sido documentados con potencial farmacológico, en diversos estudios recientes.

#### **4. Pregunta de investigación**

¿Los extractos metanólicos de las cáscaras de saramuyo y caimito presentarán actividad antiproliferativa sobre líneas celulares cancerosas?

#### **5. Hipótesis**

Si los extractos metanólicos de las cáscaras de saramuyo y caimito presentan actividad citotóxica entonces la viabilidad y proliferación celular se verán disminuidas.

#### **6. Objetivo General**

Determinar el efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) sobre líneas celulares de carcinoma mamario (MCF-7), carcinoma mamario resistente a



vinblastina (MCF-7/Vin<sup>+</sup>), carcinoma colorrectal (HCT-15 y HCT-116) y carcinoma cervicouterino (HeLa).

## **6.1. Objetivos particulares**

1. Análisis fitoquímico de los extractos metanólicos de saramuyo y caimito.
2. Determinar el efecto de distintas concentraciones y mezclas de extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y caimito en la viabilidad y proliferación celular.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Obtención de cáscaras**

Muestras de saramuyo (*Annona squamosa* L.) y caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) fueron adquiridas en mercados locales en Mérida, Yucatán, México., en 2014 e identificadas por la Taxónoma Susana Peralta de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y se corroboró su identificación mediante técnicas de biología molecular de acuerdo con lo descrito por Chel-Guerrero y colaboradores (Chel-Guerrero *et al.*, 2018). Los frutos fueron lavados, secados y las cáscaras se obtuvieron de manera manual para su posterior deshidratación en una liofilizadora Labconco Modelo 6 (Labconco, MO, USA) a 0.04 mBar y 5°C durante 48 horas. Posteriormente, las cáscaras secas se procesaron hasta obtener polvo y se almacenaron a -20°C en bolsas herméticas hasta su análisis de acuerdo con lo descrito por Can en 2016 (Can, 2016).

## **7.2. Obtención de los extractos**

La extracción de compuestos se realizó mediante maceración metanólica, 10 g de material liofilizado fueron pesados y homogenizados en 50 ml de metanol de grado HPLC, el macerado se mantuvo en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Los extractos se filtraron y evaporaron a 40°C en un evaporador rotativo (Büchi modelo R-3). Los extractos fueron almacenados a -20°C hasta su análisis.

## **7.3. Análisis fitoquímico**

### **7.3.1 Análisis cualitativo.**

#### **7.3.1.1. Determinación de alcaloides.**

1 ml de los extractos metanólicos de las cáscaras de ambas especies, fueron disueltas en 2 ml de una mezcla de ácido clorhídrico / agua (50:50 v/v) y posteriormente fueron filtrados y transferidos a tubos de ensayo. A continuación, se agregaron 5 gotas de reactivo de Mayer, el cual fue preparado con 1.3 g de cloruro mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ) en 60 ml de agua destilada y 5 g de yoduro de potasio (KI) y aforado a 100 ml. La aparición de un precipitado blanco lechoso indicó la presencia de alcaloides. Se usó cafeína como control positivo.

#### **7.3.1.2. Determinación de taninos**

Se pesaron 2 mg de los extractos y fueron disueltos en 10 ml de agua destilada. La solución fue dividida en tres tubos que se trataron con: a) una solución de gelatina 1% (p/v), b) una solución de gelatina-sal (1 g de gelatina y 10 g de NaCl

disueltos en 100 ml de agua destilada) y c) solución salina de NaCl 10% (p/v). La presencia de un precipitado blanco en los tubos a, b y la ausencia del precipitado blanco en el tubo c indica la presencia de taninos (Aarland *et al.*, 2015).

#### **7.3.1.3. Determinación de saponinas**

2 mg de los extractos obtenidos y fueron depositados en tubos con 10 ml de agua destilada y después incubados en baño de agua caliente a 80°C durante 30 min. Posterior a la incubación el tubo se retiró del baño y se dejó enfriar. Una vez frío se agito vigorosamente durante 15-20 min. La presencia y el nivel de saponinas fue evaluado midiendo la altura de la espuma formada (Aarland *et al.*, 2015).

#### **7.3.1.4. Determinación de antraquinonas**

0.1 ml de los extractos metanólicos de ambas especies fueron depositados en una placa de silica gel 60F<sub>250</sub> de 3 x 5 cm. Las placas fueron eluidas con una solución de cloroformo-metanol (95:5 v/v). La aparición de fluorescencia amarilla o roja bajo luz-UV indica la presencia de derivados antracénicos libres (Aarland *et al.*, 2015).

#### **7.3.1.5. Determinación de cumarinas**

2 mg de cada extracto que fueron disueltos en 10 ml de agua destilada y transferidos a tubos de ensayo cubiertos con papel filtro humedecido con una solución de hidróxido de sodio (1 mg en 15 ml de agua destilada). El tubo de prueba fue calentado hasta ebullición. Después de 5 minutos el papel filtro fue removido del

tubo, secado y expuesto a luz UV. La aparición de fluorescencia azul indica la presencia de cumarinas volátiles (Aarland *et al.*, 2015).

#### **7.3.1.6. Determinación de azúcares reductores**

La presencia de azúcares reductores fue determinada mediante la reacción de Fehling utilizando un Kit comercial (Golden Bell Reactivos<sup>MR</sup>, Código 43210 y 43200). 25 mg de extracto metanólico de ambas cáscaras fueron disueltos en 2 ml de agua destilada, se agregaron 2 ml de la solución Fehling A (solución de cobre) y 2 ml de la solución de Fehling B (solución alcalina), se agitó levemente y la mezcla se incubó en agua caliente a 90°C durante 10 min. La aparición de un precipitado color rojo ladrillo indica la presencia de azúcares reductores. Se usó glucosa y sacarosa como controles positivo y negativo respectivamente (Arley y Santa-Cruz, 2014).

### **732 . Análisis cuantitativo.**

#### **7.3.2.1. Cuantificación de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos totales fueron evaluados por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método descrito por Singleton y Rossi (1965). Se pesaron 2.5 mg de los extractos metanólicos de saramuyo y caimito y fueron diluidos en 5 ml en agua destilada, 200 µl de las muestras diluidas se transfirieron a tubos de ensayo, se adicionó 1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) y se dejó incubar 1 min. Después se adicionaron 0.8 ml de carbonato de sodio 7.5% (p/v) y se incubó durante 60 minutos más. Los contenidos de compuestos fenólicos fueron evaluados a 765 nm utilizando un espectrofotómetro (JENWAY 6705 UV/VIS). Se utilizó una

curva de ácido gálico como curva patrón y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **7.3.2.2. Cuantificación de flavonoides**

La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante la técnica de cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) conforme al método descrito por Chang y colaboradores (Chang *et al.*, 2002). Se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de extracto metanólico de las cáscaras de ambas especies y fueron transferidos a un tubo de ensayo, se adicionaron posteriormente 1500  $\mu\text{l}$  de metanol, 100  $\mu\text{l}$  de cloruro de aluminio 10% p/v, 100  $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 1M y 2800  $\mu\text{l}$  de agua destilada, una vez adicionados se agitaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. La cuantificación de flavonoides se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6705 UV/VIS). utilizando una curva de quercetina como curva patrón y las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **7.3.2.3. Cuantificación de ácido cafeico, ácido gálico y ácido clorogénico.**

La determinación de ácido cafeico, ácido gálico y ácido clorogénico se realizó de acuerdo con el método descrito por Pellati y colaboradores en 2011 con modificaciones propuestas por Aarland y colaboradores en 2014. La determinación se realizó mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) usando un equipo Agilent 1200 que consiste en un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático, un cuerpo termoestable para columna y un detector UV. Se utilizó una columna C18  $\mu\text{Bondapack}^{\text{TM}}$  (3.9 x 300 mm, con número de serie

W00671T018); la temperatura de la columna fue de 30°C. La fase móvil consistió en (A) ácido acético 0.1% (v/v) en H<sub>2</sub>O y (B) acetonitrilo. Se utilizó un gradiente de elución siguiendo las siguientes indicaciones: inicial de 0 a 10 min 85% (A) / 15% (B); de 10-20 min 70% (A)/ 30% (B) y de 20-35min 85% (A)/ 15% (B). El tiempo post-corrída fue de 3 min a un flujo de 1 ml/min. Se inyectó un volumen de 20 µl de la muestra. El rango de adquisición de DAD fue a 250-350 nm y el pico de integración se realizó a 320 nm.

#### **7.3.2.4. Determinación y cuantificación de azúcares por HPLC-IR**

La cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se realizó por medio de HPLC usando un equipo Agilent 1200 equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador, inyector automático y un cuerpo termoestable para columna y un detector de índice de refracción. Se utilizó una columna Hi-Plex Ca marca Agilent Technologies© (con número de serie 0006236070-136). El flujo de corrida fue de 0.6 ml/min a una temperatura de 80°C en corridas de 30 min con un tiempo post-corrída de 3 min al mismo flujo. La fase móvil consistió en agua grado HPLC.

Para la determinación se procedió a pesar 0.5 g de cáscaras liofilizadas de ambos frutos que fueron macerados en 15 ml de metanol grado HPLC durante 24 horas. Posteriormente, 2 ml de cada extracto se filtraron con filtros de Nylon de 0.2 µm y fueron transferidos a viales de inyección. Se inyectaron 20 µl de cada extracto al equipo. Se utilizaron diluciones de sacarosa, glucosa y fructosa como estándares (10 g/l – 0.1 µg/l), todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### **7.3.2.5. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC**

Para la determinación de ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico y tartárico): 1 mg de cada extracto liofilizado se disolvió en 1 ml de agua grado HPLC, enseguida se filtró a través de filtros de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies©). Se inyectaron en 20  $\mu\text{l}$  de los extractos filtrados y de los estándares de los ácidos en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (marca Agilent Technology modelo 1260, equipado con una bomba cuaternaria) y con un detector de longitud de onda múltiple. La columna utilizada fue una columna X-Terra MS C18, 5  $\mu\text{m}$  (4,6 x 250 mm), usando como fase móvil buffer de fosfato (50 mM, pH 2.8) en modo isocrático. El flujo se ajustó a 0.7 ml/min. Los resultados se registraron a 210 nm y se interpolaron en una curva estándar de ácido cítrico, málico, oxálico y tartárico, respectivamente. Los resultados se expresaron en mg de ácido/100 g de extracto de cáscara seca (Nour, Trandafir y Iónica, 2010; Aarland *et al.*, 2016).

## **7.4. Ensayos farmacológicos**

### **7.4.1. Líneas Celulares**

Las líneas celulares HCT-15 (carcinoma colorrectal), HeLa (carcinoma de cérvix), MCF-7 (carcinoma mamario) y MCF-7/ Vin<sup>+</sup> (Carcinoma mamario resistente a Vinblastina), se obtuvieron de la colección de cultivos de tipo americano del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI 1640, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y cultivado a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad.

## **7.5. Análisis de la actividad citotóxica**

### **7.5.1. Ensayo de sulforrodamida B (SRB).**

Las células fueron cosechadas cuando la confluencia se encontraba entre el 60 y 70%. Se sembraron 5,000 células/pozo en una caja de 96 pozos y fueron tratadas con 10 µl de distintas concentraciones de extractos los secos de saramuyo y caimito disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (0.2, 1, 5, 25, 50 y 100 µg/ml) y con una mezcla de ambos extractos a la misma concentración, pero en proporción de 50:50, 70:30 y 30:70 v/v de saramuyo y caimito, respectivamente. Una vez expuestas las células a estos tratamientos, se incubaron durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de exposición a los extractos se fijaron las células con 100 µl/pozo de ácido tricloroacético al 20% (p/v) y se incubaron a 4°C durante 30 min. Después de la fijación se adicionaron 100 µl de una solución de Sulforrodamida B – ácido acético (0.265 g en 500 ml de ácido acético 1% v/v) a cada pozo para el desarrollo de la coloración y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Después se decantó el colorante y se lavó cuatro veces la placa con ácido acético (1% v/v) y se dejó secar bajo flujo de campana. Posterior a la eliminación del colorante y secado de la placa, el colorante unido a las células se solubilizó con 200 µl/pozo de TRIS-base (10 mM pH 10), agitando la placa durante 20 min en un agitador de placas hasta que el colorante se disolvió por completo. La absorbancia de SRB se midió a 564 nm. Se utilizaron células tratadas con DMSO como control. A la par de los experimentos se realizó un control para determinar la densidad óptica al inicio del tratamiento (DO del día cero) para lo cual se sembraron 5,000 células de cada línea



celular cancerosa en seis pozos y sin ningún tratamiento, se dejaron incubar bajo condiciones de cultivo durante 30 min. Posterior a la incubación las células fueron fijadas y procesadas de la misma manera que las células tratadas con los extractos como se describió previamente.

El porcentaje de proliferación fue calculado por medio de la siguiente formula: porcentaje de crecimiento =  $DO_t - DO_{dc} / DO_c - DO_{dc} \times 100$ , donde:  $DO_t$  = densidad óptica del tratamiento;  $DO_{dc}$  = Densidad óptica del día cero;  $DO_c$  = Densidad óptica del control DMSO (Skehan *et al.*, 1990; Mendoza-Espinoza *et al.*, 2009; Campos-Lara y Mendoza-Espinoza, 2011).

## **7.6. Ensayo de proliferación celular mediante WST-8 (CCK-8).**

### **7.6.1. Determinación del número celular**

Las líneas celulares fueron sembradas y cosechadas al 70-80% de la confluencia, se contaron y se ajustó un stock de 80,000 células suspendidas en 80  $\mu$ l de medio de cultivo. En una placa de 96 pozos se sembraron 0; 2,500; 5,000; 10,000; 20,000 y 40,000 células de cada línea celular y se adicionaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo suplementado y se incubaron en las condiciones de cultivo descritas en el apartado de Líneas celulares durante 12 horas. Posteriormente el medio de cultivo suplementado fue retirado y remplazado por medio fresco sin suplementar, se adicionaron 10  $\mu$ l del reactivo CCK-8 y las células incubaron durante una hora más. Posterior a la exposición de las células al reactivo de CCK-8 la placa fue leída en un lector de placas a 450 nm.

Los datos de absorbancia y concentración fueron utilizados para realizar una regresión lineal que se utilizó posteriormente en la determinación del número celular de los grupos de tratamiento.

### **7.6.2. Ensayo de proliferación celular**

Para determinar el efecto de la exposición de las células cancerosas a los extractos metanólicos de saramuyo y caimito sobre la proliferación celular, las células fueron cosechadas al 70-80 % de confluencia. En cajas de 96 pozos fueron sembradas 5,000 células/pozo de cada línea celular (HeLa, MCF-7, HCT-116), formando los siguientes tres grupos: NT (No tratado), NT+ Metanol y EXTRACTO. Una vez sembradas las células se adicionaron 100 µl de medio de cultivo suplementado. Las células fueron incubadas por 12 horas bajo condiciones iniciales de cultivo como se describe en el apartado de líneas celulares, a fin de que se adhirieran a la placa de cultivo.

Pasadas 12 horas de incubación, el medio suplementado fue retirado y reemplazado por un volumen igual de medio fresco sin suplementar y se incubaron durante 4 horas más.

Posteriormente el medio se sustituyó nuevamente por medio fresco suplementado y las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos: grupo NT que consistió en células que no fueron tratadas, un grupo NT+ Metanol que consistió en células expuestas a 10 µl de una concentración igual del vehículo donde se disolvieron los extractos (metanol 1% v/v) y un grupo EXTRACTO que consistió en células expuestas a 10 µl de una concentración de 50 µg/ml de extracto de saramuyo

para la línea celular HeLa y una mezcla 50:50 v/v de extractos de saramuyo y caimito para las líneas celulares HCT-116 y MCF-7.

Una vez transcurrido el tiempo de exposición a los extractos, se procedió a realizar el ensayo CCK-8 para lo cual el medio de cultivo fue retirado de la placa y sustituido por 100  $\mu$ l de medio fresco sin suplementar y además 10  $\mu$ l del reactivo CCK-8. La placa se incubó una hora más y cumplido el tiempo de exposición al reactivo CCK-8, la placa fue leída en un lector de placas a 450 nm.

El número de células fue calculado mediante una regresión lineal. Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado en tres eventos experimentalmente independientes.

## **8. Análisis estadístico**

Los resultados son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar. El promedio de los valores de  $CI_{50}$  fueron determinados por medio de una regresión no lineal para experimentos individuales. Se utilizó una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Tukey para comparaciones múltiples, considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo, se utilizó el software GrapPad Prism versión 6 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA., USA).

## **9. Resultados y discusión**

### **9.1. Análisis fitoquímico**

En el análisis cualitativo de los extractos (Tabla 1), se determinó que los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo presentan una presencia abundante

de compuestos antracénicos libres, al igual que de azúcares reductores y presentan saponinas de manera moderada; sin embargo, derivado de los mismos no se detectó la presencia de taninos, cumarinas ni alcaloides. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Chel-Guerrero y colaboradores en 2018. Moo-Huchin y colaboradores en 2015, reportaron que los compuestos fenólicos también se encuentran en el caimito morado que es una variedad del caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) utilizada en este trabajo.

El extracto metanólico de caimito presentó una cantidad alta de azúcares reductores, moderada de antraquinonas y los compuestos de los que se determinó poco contenido fueron las saponinas y los alcaloides. Al igual que el saramuyo, el caimito no presento taninos ni cumarinas. Es de destacar que los compuestos como antraquinonas que están presentes en ambos extractos metanólicos, son de importancia medica por sus propiedades como laxantes y anticoagulantes., Sin embargo, en recientes estudios se ha demostrado que las antraquinonas también pueden tener actividad anticancerígena al compararse con cisplatino en células hipóxicas de carcinoma de cérvix (HeLa), y de adenocarcinoma alveolar (A549) (Zeng *et al.*, 2015). Asimismo, pueden ser usados en foto quimioterapia como agentes sensibilizadores a las células cancerosas a morir por apoptosis (Rumie *et al.*, 2014). Lo anterior podría ser un indicador de que los extractos pudieran tener posibles efectos farmacológicos como antiproliferativos.

Se sabe también que la presencia de metabolitos como los reportados en la Tabla 1, se da de manera heterogénea en distintos tejidos vegetales que comprenden desde las hojas, tallos, corteza, semillas e incluso la pulpa y cáscara de

los propios frutos (Bystrom, *et al.*, 2008; Moo-Huchin *et al.*, 2015). En general los compuestos detectados en los extractos metanólicos de las cáscaras de saramuyo y caimito han sido descritos con potencial antioxidante, citotóxico y antiinflamatorios principalmente (Díaz y Rossini, 2012; Baky *et al.*, 2016). Es por ello por lo que son necesarios estudios más profundos dirigidos a evaluar principalmente la actividad citotóxica de los extractos.

Determinamos que los extractos metanólicos presentaron menos de una parte por millón de ácido cafeico. Los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo también revelaron que contienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos ( $1453.33 \pm 36.56$  mg EAG/ g ES) comparada con el extracto metanólico de cáscara de caimito ( $533.66 \pm 12.11$  mg EAG/ g ES) (Tabla 2), estos resultados son comparables por los reportados en 2018 por Chel Guerrero y colaboradores donde también se reportó que los extractos metanólico de saramuyo contenían una mayor cantidad de compuestos fenólicos totales comparados con el extracto de caimito (Chel-Guerrero *et al.*, 2018) y también por los reportado por Ribeiro da Silva y colaboradores en 2014, donde se determinó que distintas frutas tropicales y que incluían al saramuyo y al caimito presentaban una gran cantidad de compuestos fenólicos tanto en pulpa como en la combinación de la pulpa y la cáscara (Ribeiro da Silva *et al.*, 2014). Esto refuerza la idea de la utilización del metanol como el disolvente más eficaz para la extracción de una gran cantidad de compuestos con actividad biológica de las cáscaras de frutos (Bagattoli *et al.*, 2016; Moure *et al.*, 2001).

**Tabla 1.** Análisis fitoquímico cualitativo de cáscaras de dos frutas tropicales.

Tipo de compuesto	Material biológico <sup>a</sup>	
	saramuyo ( <i>Annona squamosa</i> L.)	caimito ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.)
Alcaloides	-	+
Antraquinonas	+++	++
Azúcares reductores	+++	+++
Cumarinas	-	-
Saponinas	++	+
Taninos	-	-

<sup>a</sup> Extracto metanólico de cáscaras de saramuyo y caimito. Parámetros cualitativos: (-) No detectado; (+) Poco presente; (++) Moderadamente presente; (+++) Presente de manera abundante.

De la misma manera se sabe que compuestos fenólicos como el ácido gálico, cuando se aplica en líneas celulares de leucemia ha demostrado inhibir la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa (que cataliza la formación de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos), resultando en la detención del crecimiento de estas células (Madlener *et al*, 2007). Estos aportes soportan la idea de que los extractos metanólicos de saramuyo y caimito pudieran tener efectos farmacológicos enfocados principalmente en actividad antiproliferativa.

De la cuantificación de azúcares se pudo determinar que los extractos de cáscaras de saramuyo contienen  $3.2 \pm 0.98$  g de azúcar por cada 100 gramos de cáscara liofilizada; esta cantidad es la suma de las azúcares cuantificados que fueron  $1.93 \pm 0.16$  g/100 g,  $1.27 \pm 0.18$  g/100 g de glucosa y fructosa respectivamente, mientras que para los extractos de caimito la suma de los azúcares cuantificados fue de  $3.9 \pm 1.13$  g por cada 100 g de cáscara liofilizada, de la misma manera se

obtuvieron las cantidades de glucosa ( $2.11 \pm 0.69$  g/100 g) y fructosa (1.79 g /100 g), para cáscaras de saramuyo y caimito no se detectó la presencia de sacarosa.

**Tabla 2.** Análisis fitoquímico cuantitativo de cáscaras de dos frutas tropicales.

Tipo de compuesto	Material biológico <sup>§</sup>	
	saramuyo ( <i>Annona squamosa</i> L.)	caimito ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.)
Ácido cafeico	<1	<1
Ácido clorogénico	Nd	Nd
Fenoles totales <sup>B</sup>	1453.33 ± 36.53	533.66 ± 12.11
Flavonoides totales <sup>C</sup>	Nd	8.3 ± 0.18
Ácidos orgánicos <sup>D</sup>		
Ácido cítrico	0.001 ± 0.00	0.0008 ± 0.00
Ácido málico	0.002 ± 0.00	0.001 ± 0.00
Ácido oxálico	27.52 ± 0.26	-
Ácido tartárico	3.63 ± 0.78	9.27 ± 0.34
Azúcares totales <sup>E</sup>	3.2 ± 0.98	3.9 ± 1.13
Sacarosa	-	-
Glucosa	1.93 ± 0.16	2.11 ± 0.69
Fructosa	1.27 ± 0.18	1.79 ± 0.64

<sup>§</sup>Extractos metanólicos de cáscaras saramuyo y caimito. <sup>A</sup> Ácido cafeico y Ácido clorogénico reportados en partes por millón (ppm). <sup>B</sup> Compuestos fenólicos totales en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto metanólico seco (mg EAG/ g EMS). <sup>C</sup> Flavonoides totales en mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto metanólico seco (mg EQ/ g EMS). <sup>D</sup> Ácidos orgánicos en gramos de compuesto (ác. cítrico, málico, tartárico y oxálico) por 100 gramos de cáscara liofilizada (g/100 g CL). <sup>E</sup> Azúcares totales como la suma del contenido de sacarosa, glucosa, fructosa, expresadas en g de azúcar por 100 g de cáscara liofilizada (g / 100 g CL). <sup>E</sup> Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en g de compuesto por 100g de cáscara liofilizada. Nd = No determinado; (-) = no detectado en la muestra.

Estos resultados difieren de los encontrados por Chel-Guerrero y colaboradores en 2018, que reportan un total de  $0.19 \pm 0.00$  g/100 g de azúcares en la cáscara liofilizada de saramuyo y  $0.15 \pm 0.00$  g/100 g de azúcar para caimito, mientras que para saramuyo determinaron  $0.09 \pm 0.00$  y  $0.10 \pm 0.00$  g/100 g de glucosa y fructosa respectivamente y para caimito determinaron que había  $0.07 \pm$

0.00 g/100 g y  $0.08 \pm 0.00$  g/100 g de glucosa y fructosa respectivamente. De la misma manera que Chel-Guerrero y cols. en 2018, en ninguna de las dos cáscaras de frutas no se logró determinar la presencia de sacarosa (Chel-Guerrero *et al.*, 2018).

De la determinación de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico y ácido tartárico) se determinó que la cáscara liofilizada de saramuyo contiene  $0.001 \pm 0.00$  g de ácido cítrico,  $0.002 \pm 0.00$  g de ácido málico,  $3.63 \pm 0.78$  g de ácido tartárico y una cantidad considerable de ácido oxálico por cada 100 gramos de cascara liofilizada ( $27.52 \pm 0.26$  g/100 g CL). La cascara liofilizada de caimito presento una cantidad menor de ácido cítrico ( $0.0008 \pm 0.00$  g/100 g CL), ácido málico ( $0.001 \pm 0.00$  g/100g CL) y ácido tartárico ( $9.27 \pm 0.34$  g/100g CL), respecto a la cáscara de saramuyo, sin embargo, no se detectó la presencia de ácido oxálico. Estudios recientes revelan que los extractos metanólicos del hongo *Cordyceps militaris* L. muestran actividad antioxidante, antifúngica y antitumoral frente a líneas celulares cancerosas, estos extractos presentan compuestos como ácidos grasos,  $\beta$ -glucanos y ácidos orgánicos de los cuales se encuentran el ácido cítrico, ácido fumárico y ácido oxálico (Reis *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo ayudan a establecer un perfil fitoquímico más completo de las cáscaras de estos dos frutos ya que en la literatura aún no se encuentran descritos los parámetros fitoquímicos de éstas.



## 9.2. Ensayos farmacológicos

Derivado de los ensayos farmacológicos mediante sulforodamina B y después de la exposición a los extractos se determinó la concentración a la cual la inhibición de la proliferación era del 50% ( $CI_{50}$ ). Se determinó que el extracto de saramuyo posee un  $CI_{50}$  de  $19.65 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$  en la línea celular HCT-15;  $20.84 \pm 1.18 \mu\text{g/ml}$  para la línea celular HeLa y de  $18.37 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$  para la línea celular HCT-116, y que una combinación de ambos extractos metanólicos a una proporción de 50:50 v/v presento  $CI_{50}$  de  $19.44 \pm 1.41 \mu\text{g/ml}$  para la línea celular HCT-15, de  $17.36 \pm 1.28 \mu\text{g/ml}$  para la línea celular MCF-7 y de  $12.04 \pm 1.13 \mu\text{g/ml}$  para la línea celular HCT-116 (Tabla 3).

El Instituto Nacional del Cáncer (NCI por sus siglas en inglés) considera que para que un compuesto puro sea considerado como citotóxico debe presentar un  $CI_{50}$  menor a  $4 \mu\text{g/ml}$ , mientras que para extractos crudos el  $CI_{50}$  de éstos debe estar por debajo de  $20 \mu\text{g/ml}$  (Geran *et al.*, 1972). Sin embargo, otros autores establecen que el criterio de actividad citotóxica dada por el  $CI_{50}$  debe estar por debajo de  $30 \mu\text{g/ml}$  (Suffnes *et al.*, 1980), en tanto que Estrada y colaboradores consideran que debe estar por debajo de  $100 \mu\text{g/ml}$  (Estrada *et al.*, 2013). Nuestros datos muestran que los extractos de saramuyo presentan actividad citotóxica diferencial ante células de carcinoma de (HCT-15 y HCT-116) y células de carcinoma de cérvix (HeLa), mientras que una combinación de ambos extractos en una relación de 50:50 v/v presentaron actividad citotóxica menor a  $20 \mu\text{g/ml}$  ante células de carcinoma de colon (HCT-15 y HCT-116) y de carcinoma de mama (MCF-7), es importante

destacar que la línea celular HCT-116 presenta efectos sinérgicos ya que fue más sensible a la combinación de extractos que en presencia de uno solo.

**Tabla 3.** Análisis de la Actividad citotóxica de extractos metanólicos de cáscaras de dos frutos tropicales.

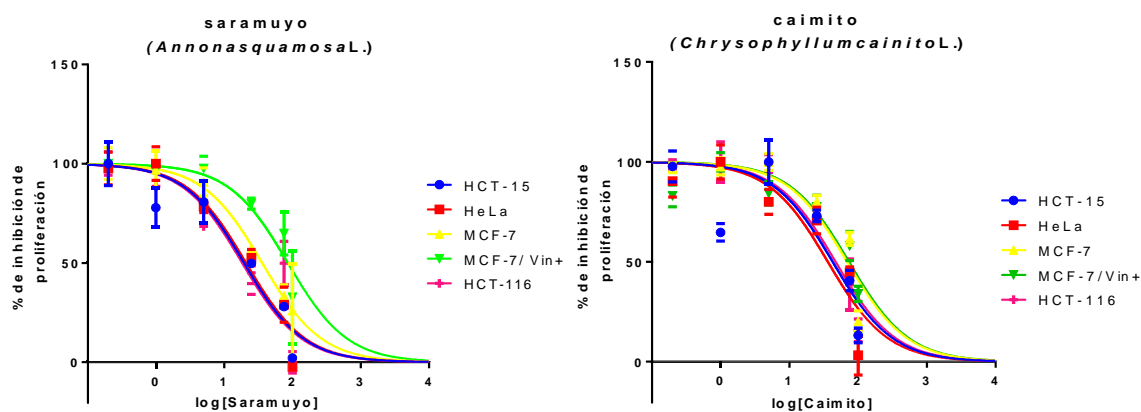
<i>Actividad citotóxica</i>	Material bilógico <sup>a</sup>				
	saramuyo	caimito	saramuyo/ caimito (50:50 v/v)	saramuyo/ caimito (70:30 v/v)	saramuyo/ caimito (30:70 v/v)
HCT-15	19.65±1.20	42.81±1.29	19.44±1.41	25.54±0.1	26.09±0.17
HeLa	20.84±1.18	36.35±1.23	38.26±1.18	12.81±0.05	12.53±0.05
MCF-7	36.06±1.15	69.46±1.18	17.36±1.28	25.16±0.06	30.69±0.08
MCF-7/Vin <sup>+</sup>	86.01±1.30	73.52±1.16	41.79±1.43	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
HCT-116	18.37±1.29	47.40±1.17	12.04±1.13	12.04±1.13	12.25±0.04

<sup>a</sup>Extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y caimito. Actividad citotóxica cuantificada en µg/ml y expresada como la concentración a la que la mitad de las células sembradas muere (CI<sub>50</sub>). *n.d* = no determinado.

Si bien ninguna de las células tuvo un CI<sub>50</sub> menor a 20 µg/ml con la exposición del extracto de caimito también es de notar que estos CI<sub>50</sub> se encuentran por debajo de 100 µg/ml como lo establecen Estrada y colaboradores (2013), lo que sugiere que estos extractos podrían ser considerados con potencial citotóxico.

Respecto a las mezclas de saramuyo y caimito en proporciones 70:30 v/v, se pudo determinar que solo se presenta actividad citotóxica en la línea celular HeLa y HCT-116 con un CI<sub>50</sub> de 12.81 ± 0.05 y 12.04 ± 1.13 µg/ml, respectivamente, mientras que las líneas celulares HCT-15 y MCF-7 presentan un CI<sub>50</sub> mayor a 20 µg/ml, por lo cual no se consideran con efecto citotóxico de acuerdo con lo establecido por Geran y colaboradores (1972). Respecto a la combinación 30:70 v/v se pudo determinar que de la misma manera que en la mezcla 70:30 v/v, solo las

líneas celulares de HeLa y HCT-116 presentaron un  $CI_{50}$  menor a 20  $\mu\text{g/ml}$  con valores de  $12.53 \pm 0.05$  y  $12.25 \pm 0.04$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, mientras que las que las líneas celulares HCT-15 y MCF-7 presentan un  $CI_{50}$  mayor a 20  $\mu\text{g/ml}$ .



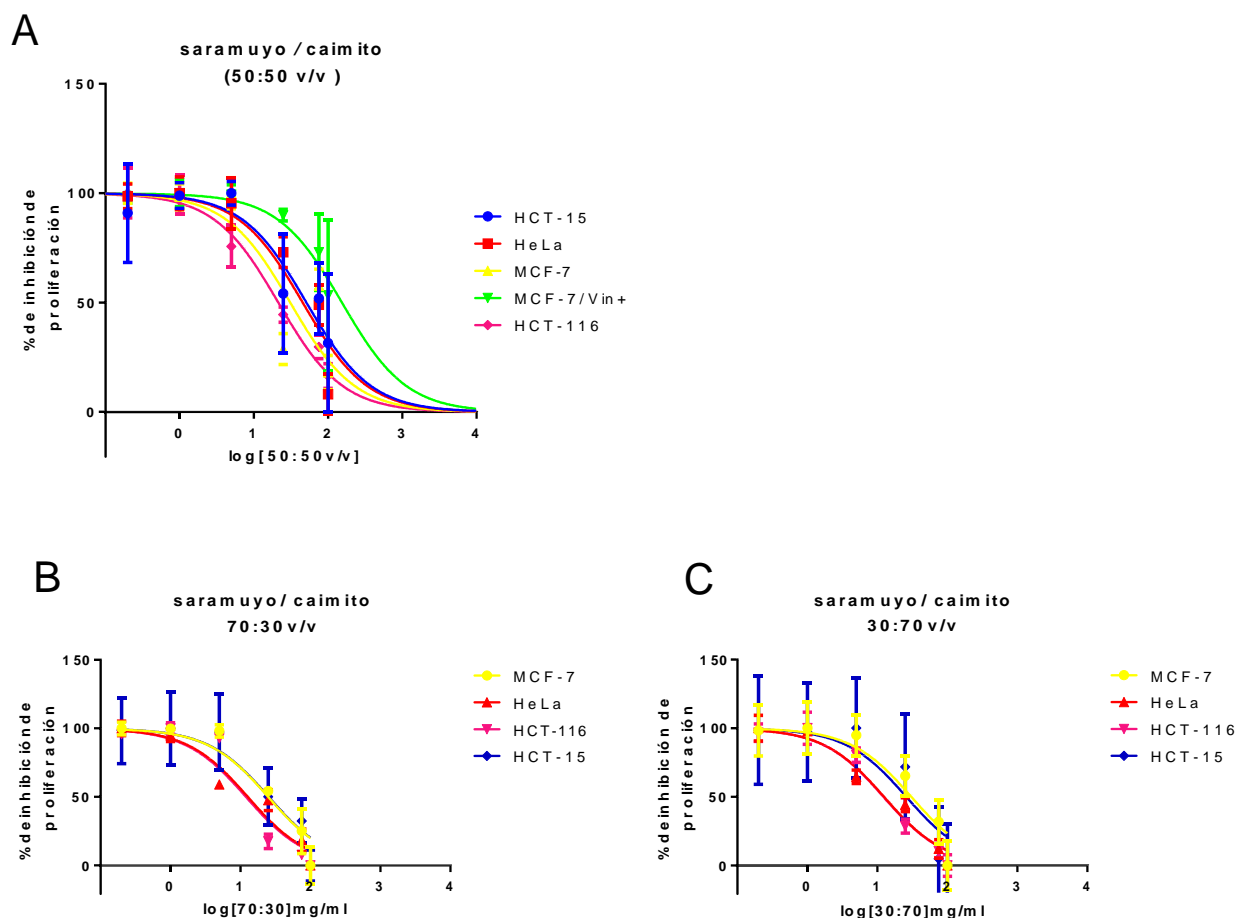
**Figura 1.** Dosis respuesta de líneas celulares a distintas concentraciones de saramuyo y caimito (100, 75, 25, 5, 1, 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ). Las dosis se representan como el logaritmo de la concentración utilizada en el análisis de la actividad citotóxica mediante SRB ( $n=3$ ).

En ninguna de las dos combinaciones anteriores se determinó el  $CI_{50}$  de la línea celular MCF-7/Vin<sup>+</sup> por no mostrar efecto citotóxico en la mezcla 50:50 v/v ni en presencia de los extractos por separado. Tomando en cuenta las mezclas 70:30 y 30:70 v/v de saramuyo y caimito y los resultados de la mezcla 50:50 v/v se puede inferir que esta última mezcla posee el mayor potencial citotóxico comparadas con los resultados obtenidos con las mezclas 70:30 y 30:70 v/v, además de reforzar la idea de que la combinación de los extractos tiene un efecto sinérgico.

### 9.3 Ensayo de proliferación celular por WST-8 (CCK-8).

Con el fin de evaluar el potencial antiproliferativo de los extractos metanólicos, así como el posible efecto sinérgico de los mismos en una combinación 50:50 v/v,

con base en los resultados obtenidos de la actividad citotóxica (Tabla 3), se realizó el ensayo WST-8 (CCK-8), se decidió no continuar la experimentación con las líneas MCF-7/Vin<sup>+</sup> por no haber respondido satisfactoriamente a los extractos individuales

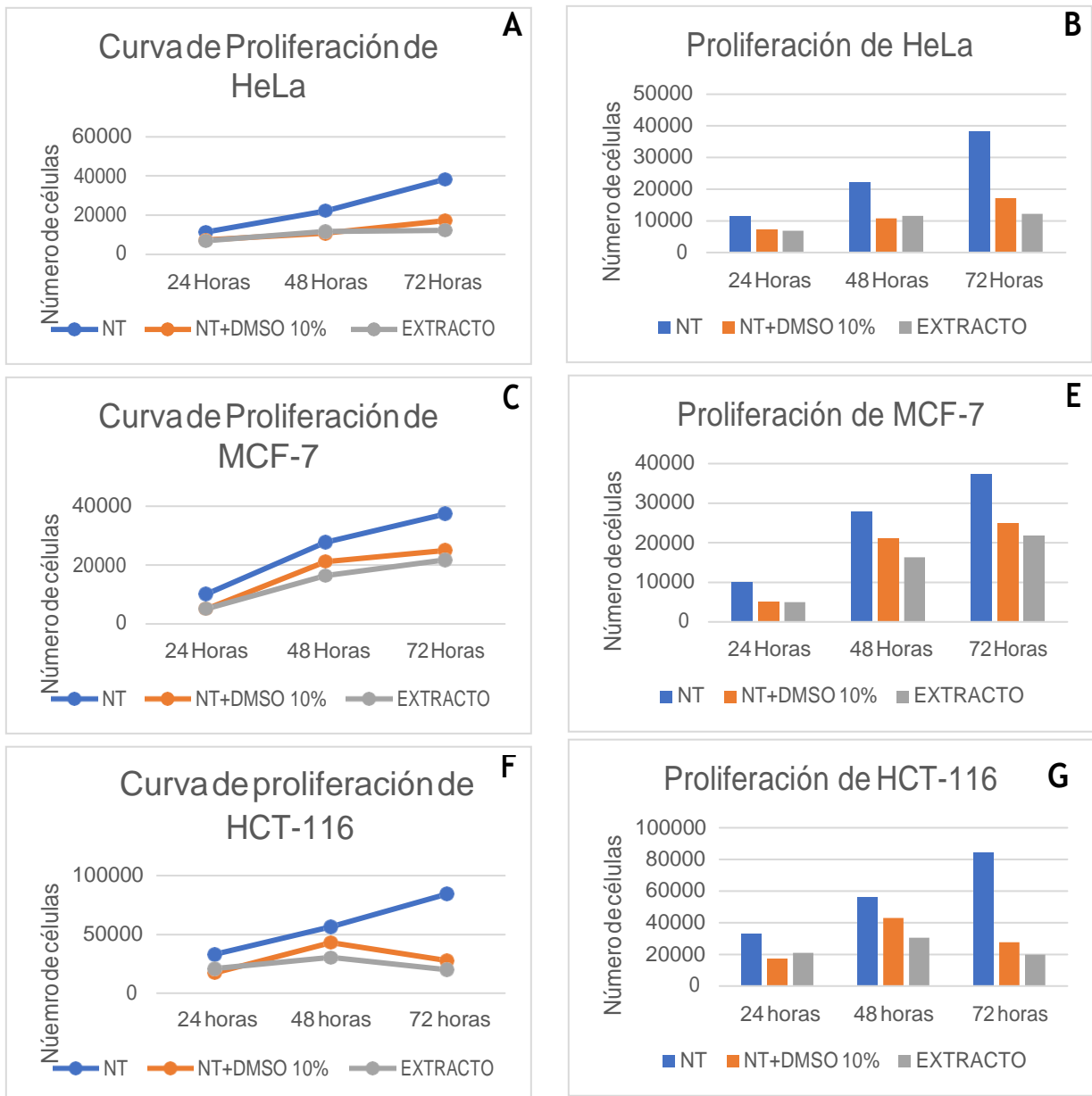


**Figura 2.** Dosis respuesta de distintas concentraciones de saramuyo y caimito en proporciones diferentes. A) Una mezcla 50:50 v/v de saramuyo y caimito probadas en cinco líneas celulares cancerosas distintas; B) Una mezcla en proporción de 70:30 v/v de saramuyo y caimito y C) Una mezcla en proporción 30:70 v/v de saramuyo y caimito probadas en cuatro líneas celulares (HCT-15, HCT-116, HeLa y MCF-7) Las dosis se representan como el logaritmo de la concentración utilizada en el análisis de la actividad citotóxica mediante SRB ( $n=3$ ).

ni a la mezcla 50:50 v/v de saramuyo y caimito, tampoco con la línea celular HCT-15, ya que si bien esta línea celular presento un  $CI_{50}$  menor a 20  $\mu\text{g/ml}$  con el extracto de saramuyo y con la combinación 50:50 v/v de ambos extractos; este  $CI_{50}$  fue mayor comparado con la línea celular HCT-116 que es también una línea de carcinoma colorrectal, por lo cual se decidió mantener las líneas MCF-7, HeLa y HCT-116 para los futuros experimentos.

La actividad antiproliferativa en un inicio fue medida con los grupos NT, NT+DMSO 10% v/v, en las tres líneas celulares seleccionadas. Las líneas celulares HCT-116 y MCF-7 fueron expuestas a 10  $\mu\text{l}$  de una combinación 50:50 v/v de una concentración 25  $\mu\text{g/ml}$  de ambos extractos, mientras que la línea HeLa fue expuesta a 10  $\mu\text{l}$  de extracto de saramuyo a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 3).

Con base en los resultados del análisis de la proliferación con el vehículo DMSO 10% v/v se logró determinar que la concentración de DMSO administrada al grupo NT+DMSO 10% v/v de las tres líneas celulares causó una disminución en el número celular transcurridas 48 horas, sin embargo, esta disminución fue siempre cercana a las de los grupos EXTRACTO teniendo como consecuencia que no se observase diferencias significativas entre los grupos NT+DMSO 10% v/v y EXTRACTO de las tres líneas celulares. Transcurridas las 72 horas de la exposición tampoco se observaron diferencias entre los grupos NT+DMSO 10% v/v y EXTRACTO, lo que indicaría que el vehículo por si solo es capaz de provocar la muerte de las células.

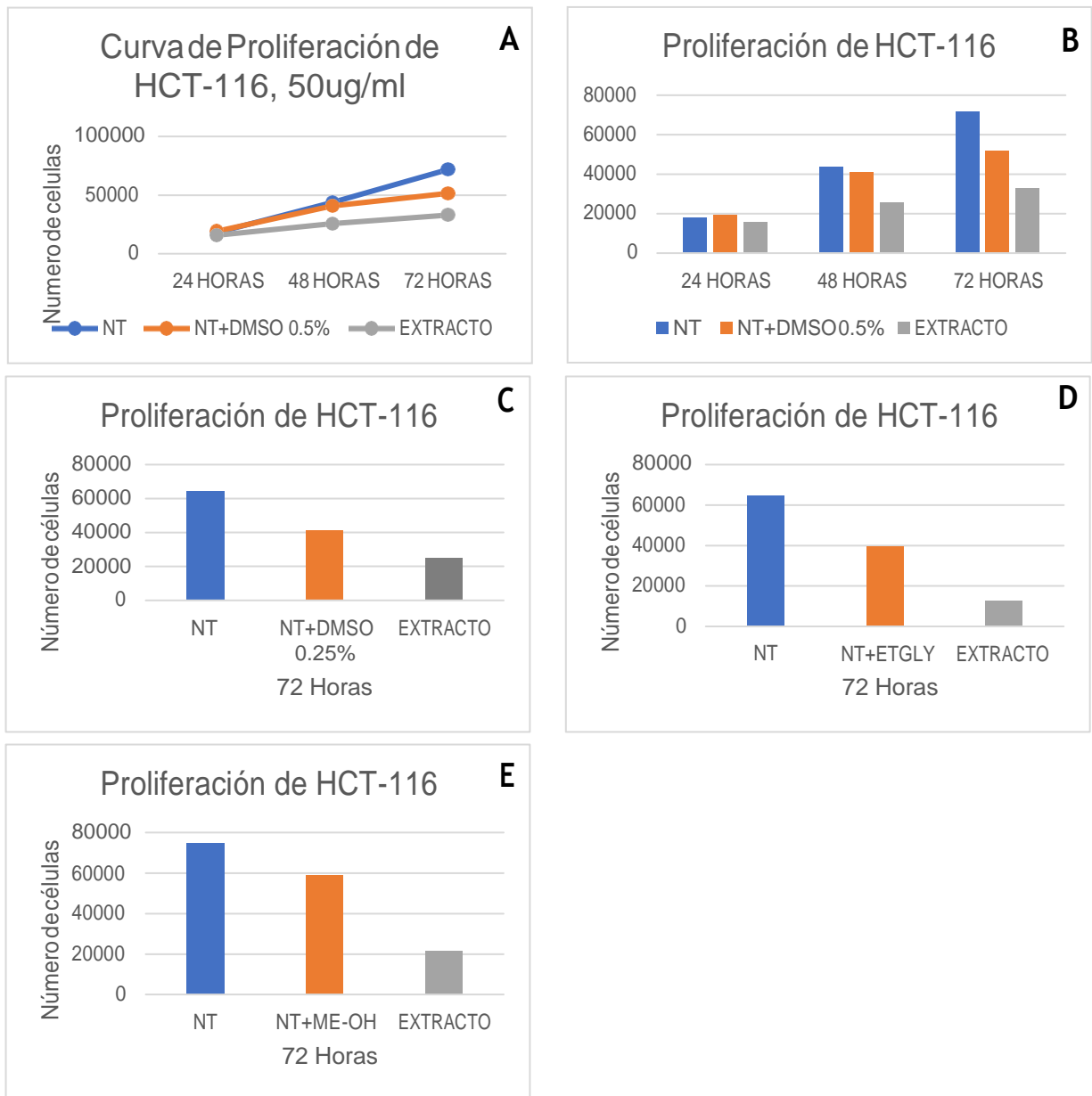


**Figura 3.** Proliferación de distintas líneas celulares a extractos disueltos en distintos vehículos. Respuesta de HeLa a la exposición a 25 µg/ml de extracto de saramuyo utilizando como vehículo DMSO 10 % (A y B) y las respuestas de MCF-7 (C y E) y HCT-116 (F y G) expuestas a 25 µg/ml de una combinación 50/50 v/v de extractos de saramuyo y caimito utilizando DMSO 10% como vehículo ( $n=1$ ).

Considerando los resultados anteriores y con la idea de encontrar la concentración óptima de vehículo para disolver los extractos, se decidió en primer lugar aumentar la concentración de extracto de 25 µg/ml a 50 µg/ml y pasar de una concentración de DMSO de 10% v/v a una de 0.5% v/v con el fin de observar si en este vehículo se podía observar algún efecto del EXTRACTO (Figura 4 A y B). Al analizar los resultados de los experimentos con una concentración menor de DMSO (0.5% v/v) y una concentración mayor de extracto (50 µg/ml) se observa que el vehículo seguía teniendo un efecto antiproliferativo que no permitía observar el efecto del extracto (distinción entre el grupo NT+DMSO 0.5% v/v y el grupo EXTRACTO) por lo que se decidió disminuir más la concentración de DMSO.

Se usó como vehículo DMSO al 0.25% v/v, manteniendo la misma concentración de extracto 50 µg/ml (50:50 v/v) y se estudió en solo la línea celular HCT-116 a las 72 horas de exposición para encontrar el vehículo óptimo para la experimentación (Figura 4C).

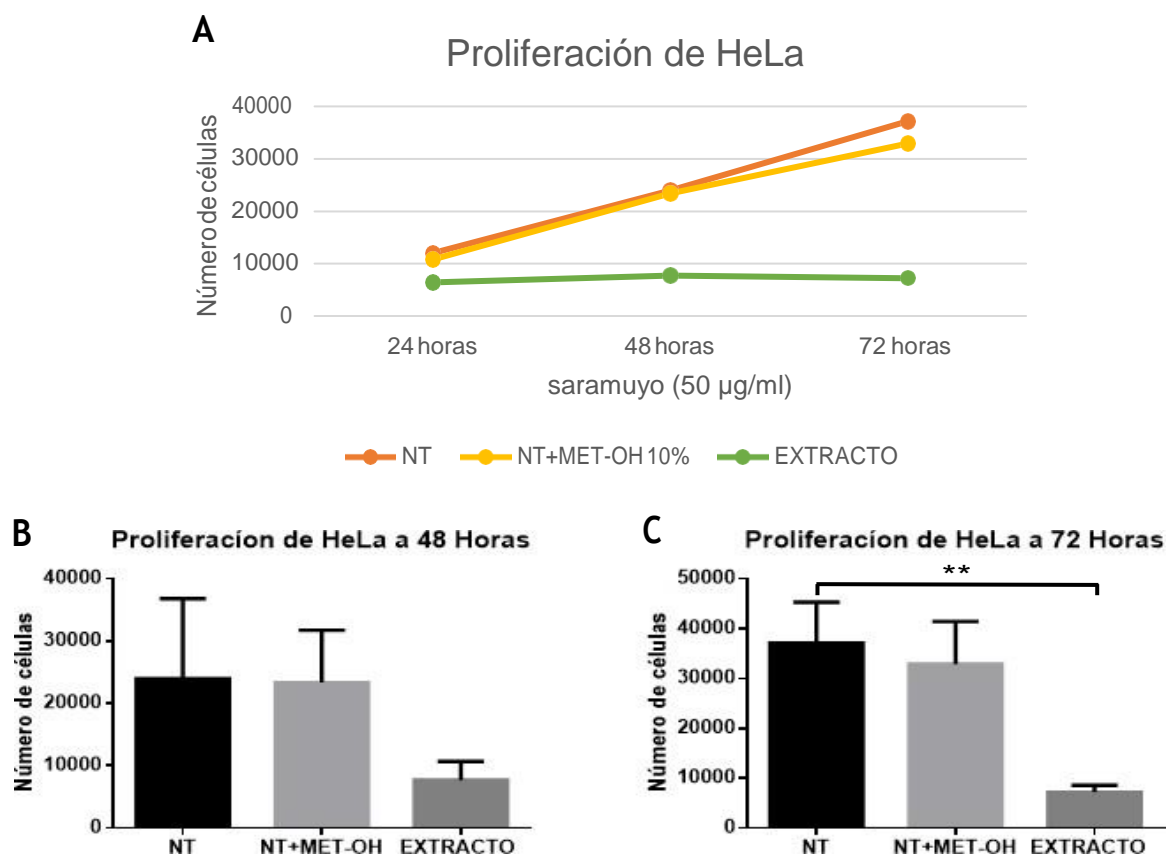
La disminución de la concentración de DMSO en 0.25% v/v sigue exhibiendo el mismo comportamiento de los anteriores experimentos (Figura 4C) sugiriendo con esto que el vehículo utilizado por su efecto no es la mejor opción para disolver los extractos metanólicos que estudiamos, por lo que se probamos nuevos vehículos como etilenglicol y metanol. Observamos que el etilenglicol (10% v/v) presentó un comportamiento similar al DMSO (Figura 4D), mientras que el metanol (10% v/v) no mostró ser tóxico, por lo que decidimos utilizarlo como vehículo de los extractos (Figura 4E).



**Figura 4.** Proliferación de HCT-116 con extractos disueltos en distintos vehículos. La línea celular HCT-116 fue expuesta a: DMSO 0.5% (A y B); DMSO 0.25% (C); etilenglicol 10% (D) y Metanol 10%, durante inicialmente a 24, 48 y 72 horas (A y B), y posteriormente solo 72 horas con el fin de encontrar un vehículo óptimo para disolver los extractos (C, D, E) ( $n=1$ ).



Por lo anterior, se decidió realizar los siguientes experimentos con las tres líneas celulares HCT-116, HeLa y MCF-7, utilizando el metanol 10% v/v como vehículo para aplicar los extractos.



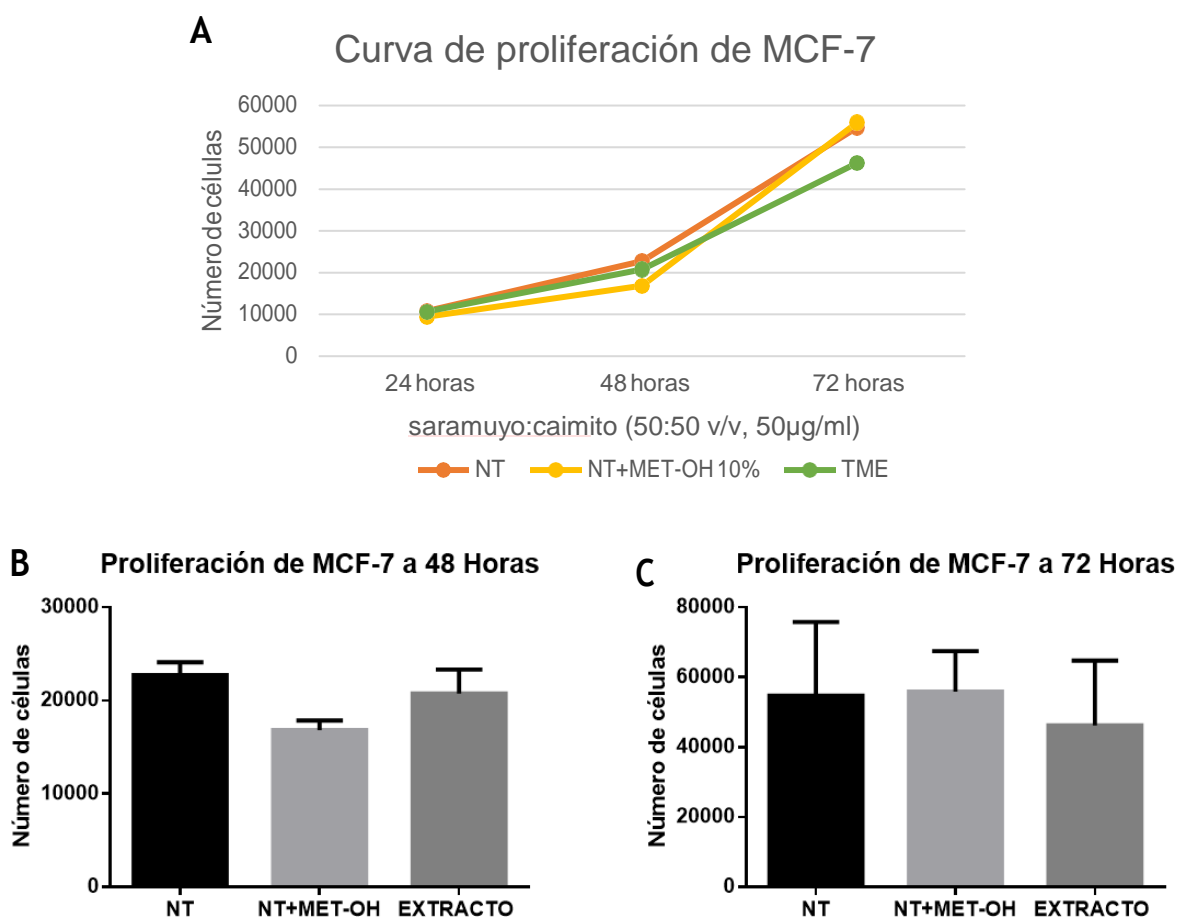
**Figura 5.** Proliferación de la línea HeLa a distintos tiempos de exposición a los extractos. La línea celular fue expuesta a lo largo de 72 horas a 10  $\mu$ l de extracto de saramuyo (50  $\mu$ g/ml). Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ), el número celular fue calculado mediante regresión lineal ( $r^2=0.99$ ).

Encontramos que en línea celular HeLa (Figura 5) una vez transcurridas 24 horas de exposición al extracto metanólico de saramuyo (grupo EXTRACTO) la proliferación de la línea celular disminuye respecto a los grupos NT y NT-MET-OH 10% v/v, pasando de 5,000 a 6,424 células, comparado con el grupo NT que pasó de

5,000 células iniciales a 11,995 células a las 24 horas, esto se traduce en un 46.4% de inhibición de proliferación, sin embargo no se observa diferencia significativa entre el grupo EXTRACTO respecto al grupo NT. Una vez transcurridas 48 horas de exposición, este efecto de inhibición de la proliferación se hace más evidente en el grupo EXTRACTO ya que la proliferación apenas sufrió cambios pasando de 6,424 a 7,715 células, mientras que el grupo NT pasó de las 5,000 células iniciales a 23,945 células traducido en el 67.7% de inhibición de la proliferación. A las 72 horas el efecto antiproliferativo se hace significativo ( $p=0.003$ ), ya que mientras los grupos NT y NT+MET-OH 10% siguen proliferando, el grupo EXTRACTO ya no prolifera e incluso comienza a disminuir su número celular de las 7,715 células existentes a las 48 horas a solo 7,220 células al final del tiempo de exposición (Figura 5. B y C) esta reducción del número celular se traduce en, reflejado en un 80.5% de inhibición de la proliferación. Es claro entonces que el efecto antiproliferativo del extracto metanólico de saramuyo se vuelve de suma importancia y su investigación se hace más relevante a fin de encontrar el mecanismo de acción de este.

De la misma manera se determinó que la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 a las 48 horas de iniciada la exposición con una mezcla 50:50 v/v de extractos metanólicos de saramuyo y caimito (50  $\mu\text{g/ml}$ ) se comportó distinto a las líneas celulares HeLa y HCT-116. Una vez transcurridas 48 horas de exposición a los extractos se observa que los tres grupos continúan proliferando de manera muy parecida, siendo el grupo NT+MET-OH 10% el que proliferó menos con cerca de 18,000 células, comparadas con las aproximadamente 20,000 células de los grupos NT y EXTRACTO reflejado solo en un 8.6% de inhibición de la proliferación. Sin

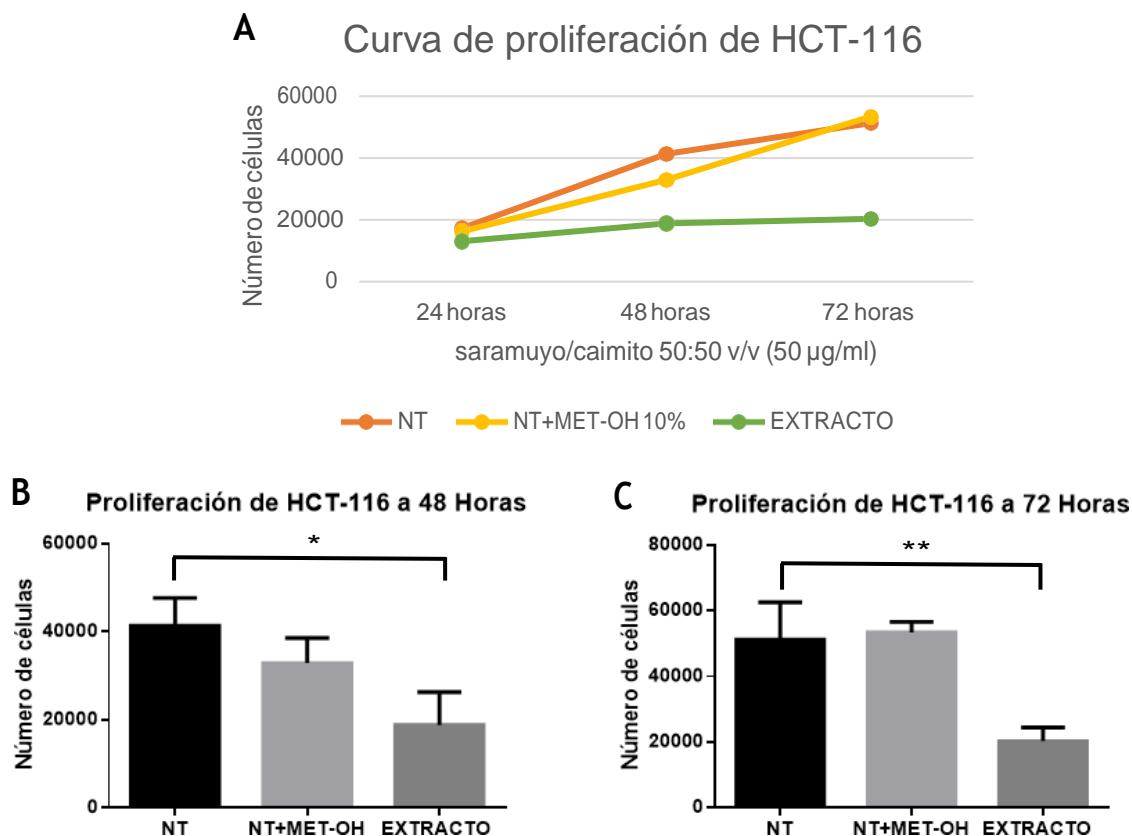
embargo, una vez transcurridas las 72 horas de exposición, el número de células en grupo EXTRACTO apenas se duplico (46,211 células) mientras que en los grupos NT y NT+MET-10% el número de células incrementó a aproximadamente 58,000 que se traduce en un 15.5% de inhibición de la proliferación. Si bien el grupo EXTRACTO a las 72 horas fue el que menor número de células tuvo respecto a los grupos NT y NT+MET 10% esta diferencia en el número de células no fue suficiente para



**Figura 6.** Proliferación de la línea MCF-7 a distintos tiempos de exposición a los extractos. Se muestra la curva de proliferación (**A**) de la línea celular MCF-7 a distintos tiempos de exposición a 10 µl de una mezcla 50:50 v/v de extractos de saramuyo y caimito (50 µg/ml). (**B** y **C**) Se muestran las gráficas de proliferación. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar ( $n=3$ ), el número celular fue calculado mediante regresión lineal ( $r^2 = 0.99$ ).

encontrar diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.7$ ) (Figura 6), lo que podría ser resultado de los múltiples mecanismos de resistencia y la alta variabilidad genética que exhibe naturalmente la línea celular MCF-7 (Nugoli *et al*, 2003).

Respecto a la línea celular HTC-116 observamos que el efecto antiproliferativo en el grupo EXTRACTO es significativo desde las 48 horas de exposición a una mezcla 50:50 v/v de los extractos metanólicos de saramuyo y caimito respecto al grupo NT. El grupo EXTRACTO revelo que de las 5,000 células presentes al inicio



**Figura 7.** Proliferación de la línea celular HCT-116 a distintos tiempos de exposición a los extractos. (A) Se muestra la curva de proliferación de la línea celular HCT-116 a distintos tiempos de exposición a 10  $\mu$ l de una mezcla 50:50 v/v de extractos metanólicos de saramuyo y caimito (50  $\mu$ g/ml). (B y C) Se muestran las gráficas de proliferación. Los resultados son mostrados como la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ), el número celular fue calculado mediante regresión lineal ( $r^2=0.99$ ).

del experimento el número incrementó a cerca de 18,800 células pasadas estas 48 horas, mientras que el grupo NT pasó del mismo número inicial a cerca de 41000 (Figura 7A) que se traduce en un 54.3% de inhibición de proliferación. Observamos que, a pesar del tiempo corto de exposición de 48 horas, el efecto antiproliferativo de la mezcla de extractos es significativo ( $p=0.01$ ) (Figura 7B). Por otro lado, una vez transcurrido el tiempo de exposición de 72 horas se puede comprobar que el efecto antiproliferativo continúa ya que mientras que el Grupo NT continúa proliferando, el grupo EXTRACTO apenas incrementa su número de 18,840 a 20,279 células reflejado en un 68.9% de inhibición de la proliferación, que además este efecto antiproliferativo de la mezcla de extractos en mezcla 50:50 v/v sigue siendo significativo ( $p=0.002$ ) (Figura 7C).

Los resultados anteriores apoyan la idea de que, si bien los extractos por si solos pueden ser un buen reservorio de compuestos con potencial antiproliferativo, también lo pueden ser en combinación mediante mecanismos de sinergia que sería interesante abordar en futuras investigaciones.

## **10. Conclusiones**

El análisis de los extractos mediante técnicas de evaluación fitoquímica, así como la utilización de técnicas de estudios citotóxicos dirigidos al estudio de estos productos naturales con potencial actividad farmacológica, nos permiten concluir que los extractos metanólicos de cáscaras de *Annona squamosa* L., *Chrysophyllum cainito* L. así como la combinación de los mismos, exhiben un potencial

farmacológico significativo sobre la proliferación celular, fundamentado en los siguientes resultados obtenidos en esta investigación:

1. Los análisis cualitativos de los extractos metanólicos de cáscaras de *Annona squamosa* L. y *Chrysophyllum cainito* L. revelan la presencia de metabolitos como compuestos antracénicos que por sus propiedades farmacológicas reportadas podrían ser fuente de metabolitos bioactivos en la lucha contra el cáncer.

2. Los análisis fitoquímicos cualitativos de los extractos metanólicos de cáscaras de saramuyo y caimito revelaron una gran cantidad de compuestos fenólicos, que han sido reportados como compuestos con potencial actividad antiinflamatoria y antitumoral (Carocho y Ferreira, 2013).

3. Los análisis cuantitativos de contenido de ácidos orgánicos revelaron que el ácido oxálico está presente en mayor cantidad ( $27.52 \pm 0,26$  g/100 g CL) en el extracto de saramuyo, mientras que no se logró detectar su presencia en el extracto de caimito. Solo el ácido tartárico se presentó en cantidades mayores en el extracto de caimito respecto a el extracto metanólico de saramuyo. Los ácidos cítrico y málico se presentaron en cantidades bajas en ambos extractos.

4. En los ensayos de sulforodamina B (SRB) se observó que los extractos de saramuyo presentaron actividad citotóxica prometedora en células de cáncer de colon HCT-15, HCT116 y en células de carcinoma cervicouterino HeLa.

5. La combinación en proporción de 50:50 v/v de extractos metanólicos de saramuyo y caimito presentan actividad citotóxica en células de cáncer de colon HCT-116, HCT-15 y en la línea celular de carcinoma mamario MCF-7.

6. Las combinaciones 70:30 y 30:70 v/v de los extractos metanólicos de saramuyo y caimito mostraron efecto citotóxico en la línea celular HeLa de carcinoma cervicouterino y en la línea celular HCT-116 de carcinoma de colon.

7. El mejor vehículo para los extractos a las células fue el metanol en concentración del 10% v/v.

8. El extracto metanólico de saramuyo en concentración de 50 µg/ml presenta efecto antiproliferativo significativo ( $p=0.003$ ) a las 72 horas de exposición en la línea celular de carcinoma cervicouterino HeLa mediante el ensayo antiproliferativo de WST-8 (CCK-8).

9. La combinación de extractos metanólicos de saramuyo y caimito en proporción 50:50 v/v y concentración de 50 µg/ml presenta efecto antiproliferativo significativo transcurridas 24 horas de exposición ( $p=0.01$ ) y este es significativo ( $p=0.002$ ) transcurridas 72 horas de exposición a la mezcla de extractos en la línea celular HCT-116 de carcinoma de colon.

10. La combinación de extractos metanólicos de saramuyo y caimito en proporción 50:50 v/v y concentración 50 µg/ml no presenta efecto antiproliferativo ( $p=0.7$ ) en la línea celular MCF-7 de carcinoma mamario.

## **11. Perspectivas**

Encontrar los metabolitos responsables de la actividad antiproliferativa de los extractos metanólicos de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Chrysophyllum cainito* L. (caimito), así como los posibles mecanismos de acción de estos.

Estudios para establecer el mecanismo de acción del efecto antiproliferativo de los extractos metanólicos de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Chrysophyllum cainito* L. (caimito) en combinación exhiben un efecto sinérgico antiproliferativo.

Investigar los efectos de los extractos metanólicos de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Chrysophyllum cainito* L. (caimito) durante las distintas etapas del ciclo celular.

Investigar si los extractos metanólicos de *Annona squamosa* L. (saramuyo) y *Chrysophyllum cainito* L. (caimito) causan muerte celular en líneas celular transformadas.

## 11. Referencias

- Aarland, R. C., Rivera-Cabrera, F., Pérez-Flores, L. J., Díaz de León-Sánchez, F. & Mendoza-Espinoza, J. A. (2014). Relevance of chemical Standardization and Innocuousness in the Process of Development of Herbal Medicines: A Review. *Asian J Plant Sci*; 13(1): 1-7.
- Aarland, R. C., Peralta-Gómez, S., Sánchez-Morales, C., Parra-Bustamante, F., Villa-Hernández, J. M., Diaz de León-Sánchez, F., Pérez-Flores, L. J., Rivera-Cabrera, F., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2015). A pharmacological and phytochemical study of medicinal plants used in Mexico folk medicine. *Ind J Trad Know*, 14(4): 550-557
- Arana-Argáez, V. E., Chan-Zapata, I., Canul-Canche, J., Fernández-Martín, K., Martín-Quintal, Z., Torres-Romero, J. C., Coral-Martínez, T. I., Lara-Riegos, J.



- C., & Ramírez-Camacho, M. A. (2017). Immunosuppressive effects of methanolic extract of *Chrysophyllum cainito* leaves on macrophage functions. *Afr J Tradit, Complement Altern Med*; 14(1): 179-186.
- Arley, R., & Santa-Cruz, M. Práctica de laboratorio No. 1. Reconocimiento de carbohidratos.(2014).[http://www.academia.edu/6891511/PRACTICA\\_DE\\_LABORATORIO\\_No\\_1\\_carbohidratos/](http://www.academia.edu/6891511/PRACTICA_DE_LABORATORIO_No_1_carbohidratos/) Consultado 27/11/2017
  - Alves, R. E., Brito, E. A., Rufino, M. S. M., & Sampaio, C. G. (2008). Antioxidant activity measurement in tropical fruits: A case study with Acerola. *Acta Hort*; 773: 299-305.
  - Anzanelo-Meira, N., Carlos-Klein, L., Rocha-W, L., Martin-Quintal, Z., Delle-Monache, F., Cechine-Filho, V. & Meira-Quintão, N. L. (2014). Anti-inflammatory and anti-hypersensitive effects of the crude extract, fractions and triterpenes obtained from *Chrysophyllum cainito* leaves in mice. *J Ethnopharmacol*; 151(2): 975-983.
  - Bagattoli, P. C. D., Cipriani, D. C., Mariano, L. N. B., Correa, M., Wagner, T. M., Noldin, V. F., Filho, V. C. & Niero, R. (2016). Phytochemical, antioxidant and anticancer activities of extracts of seven fruits found in the southern brazilian flora. *Indian J Pharm Sci*; 78(1):34-40.

- Baky, M. H., Kamal, A. M., Elgindi, M. R. & Haggag, E. G. (2016). A Review on Phenolic Compounds from Family Sapotaceae. *J Pharmacogn Phytochem*; 5(2):280-287.
- Balunas, M.J., & Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*; 78(5): 431-441.
- Blasco-López, G. & Gómez-Montaña, FJ. (2014). Propiedades funcionales del Plátano (*Musa sp*). *Rev Méd Univ Ver*, 14: 22 – 26.
- Bystrom, L. M., Lewis, B. A., Brown, D. L., Rodriguez, E. & Obendorf, R. L. (2008). Characterisation of phenolics by LC-UV/Vis, LC-MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. Montgomery fruits. *Food Chem*; 111(4):1017-1024.
- Caroch, M. & Ferreira, I. C. F. R. (2013). The Role of Phenolic Compounds in the Fight Against Cancer – a review. *Anticancer Agents Med Chem*; 13(8): 1236-1258.
- Campos-Lara M. & Mendoza-Espinoza, J. A., (2011). Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin, and effect of fluvastatin in the Hela cell cycle. *Afr J Pharm Pharmacol*; 5(2):189–193.
- Can, C. A. (2016). Evaluación de extractos de cáscaras de frutas tropicales en la oxidación de aceite de calabaza (*Cucurbita spp*). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán.

- Chabner, B. A., Amrein, P. C., Druker, B. J., Michaelson, M. D., Mitsiades, C. S., Goss, P. E., Ryan, D. P., Ramachandra, S., Richardson, P. G., Supko, J. G. & Wilson, W. H. (2007) Quimioterapia de enfermedades neoplásicas: Fármacos antineoplásicos. En: *Goodman & Gilman's: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 11ª Ed., (Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, eds.), *Mcgraw-Hill interamericana editores*, Bogotá, 2007, pp. 1315-1404.
- Chang C., Yang M., Wen H. & Chern J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*; 10(3): 178 - 182
- Chen, Y., Chen, J., Wang, Y., Xu, S., & Li, X. (2012). Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. *Food Chem*; 135(3): 960–966.
- Chen, Y., Chen, Y., Shi, Y., Ma, C., Wang, X., Li, Y., Miao, Y., Chen, J., Li, X. (2016). Antitumor activity of *Annona squamosa* seed oil. *J Ethnopharmacol*; 193: 362-367.
- Chel-Guerrero, L.D., Sauri-Duch, E., Fragoso-Serrano, M.C., Pérez-Flores, L.J., Gómez-Olivares, J.L., Salinas-Arreortua, N., Sierra-Palacios, E.C, Mendoza-Espinoza J.A. (2018). Phytochemical Profile, Toxicity, and Pharmacological Potential of Peels from Four Species of Tropical Fruits. *J Med Food*; 21(7):734 – 743.

- Díaz, M. & Rossini, C. (2012). Bioactive natural products from Sapindaceae deterrent and toxic metabolites against insects. En: *Insecticides-Pest Engineering*, (Perven, F. ed.) In Tech, Croacia; pp 288-308.
- Estrada N., López J., Márquez D., Martínez A., Márquez M. 2013. Evaluación citotóxica de fracciones de esponjas marinas del Caribe Colombiano. *Rev. Fac. de Cienc; Sede Medellín*, 2(1): 35-51.
- Geran, R. I., Greenberg, N. H., McDonald. M. M., Shumacher, A. M. & Abbot, B. J. (1972). Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Rep*; 3: 1-103.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*; 27(1): 1-93.
- Haaz, M. C., Rivory, L., Riche, C., Vernillet, L. & Robert, J. (1998). Metabolism of irinotecan (CPT-11) by human hepatic microsomes: participation of cytochrome P-450 3A and drug interactions. *Cancer Res*; 58(3): 468-472.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*; 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: the next generation. *Cell*; 144(5): 646-674.

- Ibrahim, R.Y. M., Hassan, I. A., Al-Adham, E.K. (2015). The anti-ulcerative colitis effects of *Annona squamosa* Linn. leaf aqueous extract in experimental animal model. *Inter J Clin Exp Med*; 8(11): 21861-21870.
- Instituto Nacional de Geografía y Estadística. “Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)”. Recuperado de [http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017\\_Nal.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf)
- Johnson, I. S. (1968): Historical background of Vinca alkaloid research and areas of future interest. *Cancer Chemother Rep*; 52(4):455-461.
- Jyotshna, K. P., Khare, P. & Shanker, K. (2016). Mangiferin: A review of sources and interventions for biological activities. *Biofactors*; 42(5): 492-503.
- Li, S., Xiao, J., Chen, L., Hu, C., Chen, P., Xie, B. & Sun, Z. (2012). Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. *Food Chem*; 135: 31-38.
- Li-Mei, M., XUE-Wen, Q., Ji-Heng, H., Hai-Feng, L., Qing-Hua & Pei-Li, B. (2015). *In vitro*, *ex vivo* and *in vivo* anti-hypertensive activity of *Chrysophyllum cainito* L. extract. *Internat J Clin Exp Med*; 8: 17912-17921.
- Lu, Z., Jia, Q., Wang, R., Wu, X., Wu, Y., Huang, C., & Li, Y. (2011). Hypoglycemic activities of A-and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different cinnamon barks. *Phytomedicine*; 18(4): 298–302.

- Madlener, S., Illmer, C., Horvath, Z., Saiko, P., Losert, A., Herbacek, I., Grusch, M., Elford, H. L., Krupitza, G., Bernhaus, A., Fritz-Szekeres, M. & Szekeres, T. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases un human HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett*; 245(1-2): 156-162.
- Maldonado, P D., Rivero-Cruz, I., Mata, R., & Pedraza-Chaverry, J. (2005). Antioxidant activity of A-and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from *Geranium niveum* (Geraiaceae). *J Agric Food Chem*; 53(6): 1996-2001.
- Malikov, V. M. & Yunusov, S. Y. (1997). Vinca alkaloids. *Chem Nat Compounds*;13(5):497-512.
- Mendoza-Espinoza JA, López-Vallejo F, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R, Cerda-García-Rojas CM. 2009. Structural reassignment, absolute configuration, and conformation of hypurticin, a highly flexible polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. *J Nat Prod*; 72(4):700–708.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*; 72(2):145-171.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada- León, R. J., Cuevas-Glory, L. C., Estrada-Mota, I. A., Ortiz Vázquez, E., Betancur-Ancona, D. & Sauri-Duch, E. (2014). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem*; 166: 17-22.

- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., Betancur-Ancona, D. & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem*; 166:17-22.
- National Institute of Cancer. (2018). Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol> el 04/12 /2018
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod*; 70(3):461-477.
- Newman, D. J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery. *J Med Chem*; 51(9):2589-2599.
- Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2010). HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Not Bot Horti Agrobot*; 38(1): 44 - 48.
- Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., Nguyen, C., Birnbaum, D., Douzery, E. J. P., Cohen, P. & Theillet, C. (2003). Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BMC Cancer*, 12: 1-12.
- Nuñez-Selles, A., Daglia, M. & Rastrelli, L. (2016). The portential role of mangiferin in cancer treatment through its immunomodulatory, anti-angiogenic, apoptotic, and gene regulatory effects. *BioFactors*; 42(5): 475-491.

- Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2014- 2023. Ginebra, OMS. ISBN 978 92 4 350609 8
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Cáncer. Nota descriptiva N° 297. Recuperado el 1 de febrero de 2017, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Pellati, F., Epifano, F., Contaldo, N., Orlandini, G., Cavicchi, L., Genovese, S., Bertelli, D., Benvenuti, S., Curini, M, Bertaccini, A., & Bellardi, M. G. (2011). Chromatographic methods for metabolite profiling of virus and phytoplasma infected plants of *Echinacea purpurea*. *J Agricult Food Chem*; 59(19): 10425-10434.
- Ramawat, K.G., Dass, S., Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicine plants. Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine. Berlin, Germany: *Springer*, Chapter 2, pp.7-32.
- Reis, F. S., Barros, L., Calhelha, R. C., Ćirić, A., Van-Griensven, L. J. L. D., Soković, M. & Ferrerira, I. C. F. R. (2013). The methanolic extract of *Cordyceps militaris* L. Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food Chem Toxicol*; 62: 91-98.



- Ribeiro da Silva, L. M., Teixeira de Figueredo, E. A., Pontes-Silva Ricardo, N. M., Pinto-Vieira, I. G., Wilane de Figueiredo, R., Montenegro-Brasil, I. & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chem*; 143: 398-404.
- Rosing, H., Zomeren, D. M. V., Doyle, E., Bult, A. & Beijnen, J. H. (1998). O-glucuronidation, a newly identified metabolic pathway for topotecan and N-desmethyl topotecan. *Anticancer Drugs*; 9(7): 587-592.
- Rumie-Vittar, N B., Comini, L., Fernandez, I M., Agostini, E., Nuñez-Montoya, S., Cabrera, J L. & Rivarola, V A. (2014). Photochemotherapy using natural anthraquinones: Rubiadin and Soranjidiol sensitize human cancer cell to die by apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*; 11(2):182-92.
- Santos, A., Zanetta, S., Cresteil, T., Deroussent, A., Pein, F., Raymond, E., Vernillet, L., Risse, M. L., Boige, V., Gouyette, A. & Vassal, G. (2000). Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Clin Cancer Res*; 6(5):2012-2020.
- Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2016). Rescata INIFAP-SAGARPA variedades del fruto saramuyo, por su alto potencial productivo, nutritivo y comercial. Recuperado de: <http://www.sagarpa.gob.mx/Deegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2016/julio/Documents/2016BS320.pdf> el día 13 de Julio de 2017.

- Schlaepfer, L., y Mendoza-Espinoza, J.A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev Mex Cien Farm*; 41(4): 18-27.
- Singleton, V. L., & Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*; 16(3): 144-158.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R... (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*; 82(13):1107–1112.
- Yang, L., Rowe, T. C. & Liu, L. F. (1985). Identification of DNA topoisomerase II as an intracellular target of antitumor epipodophyllotoxins in simian virus 40-infected monkey cells. *Cancer Res*; 45(11 Pt 2): 5872-5876.
- Zeng, L., Chen, Y., Huang, H., Wang, J., Zhao, D., Ji, L. & Chao, H. (2015). Cyclometalated Ruthenium (II) Anthraquinone Complexes Exhibit Strong Anticancer Activity in Hypoxic Tumor Cells. *Chem Eur J*; 21 (43): 15308 – 15319.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00200

Matrícula: 2163801912

Análisis de la actividad antiproliferativa de *Annona squamosa* L. y *Chrysophyllum cainito* L. sobre líneas celulares cancerosas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 11 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO BLANCAS FLORES  
MTRO. EDGAR DEL CARMEN SIERRA PALACIOS  
MTRO. ROBERTO CARLOS LAZZARINI LECHUGA  
DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

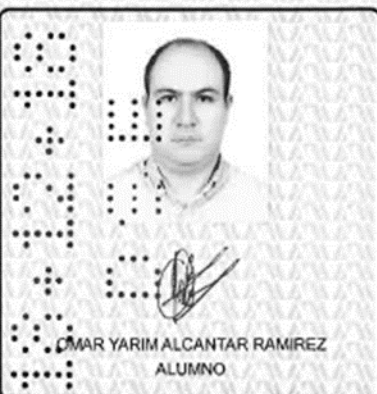
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: OMAR YARIM ALCANTAR RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



OMAR YARIM ALCANTAR RAMIREZ  
ALUMNO



REVISÓ  
DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA  
SECRETARIO GENERAL



DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE



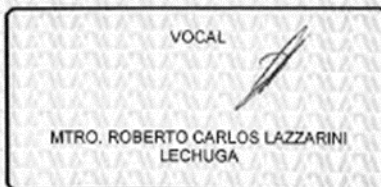
PRESIDENTE

DR. GERARDO BLANCAS FLORES



VOCAL

MTRO. EDGAR DEL CARMEN SIERRA  
PALACIOS



VOCAL

MTRO. ROBERTO CARLOS LAZZARINI  
LECHUGA



SECRETARIA

DRA. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO