

SÍNTESIS DE UN BROMO-DERIVADO AISLADO DE *Casimiroa pubescens* CON ACTIVIDAD ANTICANCEROSA

Clave de registro del proyecto: CIN2012A10263

Escuela de procedencia: Centro Universitario México

Autor: Ricardo González Hernández

Asesores: Dr. Mariano Martínez Vázquez
Roberto de la Rosa Sierra

Área de conocimiento: Ciencias biológicas, químicas y de la salud

Disciplina: Ciencias de la salud

Tipo de Investigación: Experimental

Lugar: Instituto de Química, Ciudad Universitaria.

Fecha: 16 de octubre de 2012 a 11 de febrero de 2013

México, D.F. a 11 de febrero de 2013



RESUMEN

En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, provocando que instituciones del mundo entero busquen una solución. Los productos naturales ofrecen esa posible solución; y, para su estudio se ha propuesto la manipulación de ciertos tipos de cáncer en líneas celulares *in vitro*. A partir de extracto de hexano de la corteza de raíz de *Casimiroa pubescens* se logra obtener la molécula 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina, realizando después una reacción de bromación sobre ésta, se obtienen dos productos de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina, las cuales están en vías de purificación para ser analizadas las líneas celulares *in vitro*: U251 (cáncer de glía de sistema nervioso central), PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon) y SKLU-1 (cáncer de pulmón). A pesar de aún no tener resultados, se espera una respuesta favorable con estos bromo-derivados de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina, pues estudios previos en nuestro grupo de trabajo en el Instituto de Química de la UNAM afirman que las sustituciones de grupos altamente electronegativos en cumarinas hacen que su actividad aumente favorablemente.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, *Casimiroa pubescens*, cumarina, herniarina, bromación, líneas celulares.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the principal causes of death worldwide; due to this, several institutions around the world began searching a solution. Natural products could be the searched solution; and for its studies, cancer cell lines manipulation seems to be the best option. Using hexane extract from bark's *Casimiroa pubescens* roots, we obtained 3-(1'1'-dimethylallyl)-herniarin; then, making a bromination reaction we obtained two products from this molecule. Actually, both of the products are in purification processes for using them then, in cancer *in vitro* cell lines: U251 (central nervous system glia cancer), PC-3 (prostate cancer), HCT-15 (colon cancer) y SKLU-1 (lung cancer). Though we still do not have results, we trust it'll have positive ones, because previous studies in our group in Instituto de



Química at UNAM, show us substitutions in high electronegative groups in coumarines make its' activity increase positively.

KEY WORDS: Cancer, *Casimiroa pubescens*, coumarin, herniarin, bromination, cell lines.

INTRODUCCIÓN

a) Planteamiento del problema:

En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, provocando millones de defunciones anuales. Esto ocurre debido a que aún no hay una cura totalmente efectiva contra esta enfermedad. Una de las primeras formas para probar la actividad anti cancerígena de un nuevo un producto es el empleo de líneas celulares.

En nuestro grupo de trabajo nos hemos dado la tarea de buscar nuevas alternativas para contrarrestar al cáncer; uno de nuestros proyectos es el sintetizar a partir de metabolitos secundarios (cumarinas) nuevos productos los cuales tendrían una actividad mayor en este caso se realizó la sustitución de un grupo altamente electronegativo en la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina; por lo tanto se analizará la actividad de inhibición de crecimiento celular de algunos bromo-derivados de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina sobre las líneas *in vitro*: U251, PC-3, HCT-15 y SKLU-1.

b) Hipótesis:

Sabiendo que las sustituciones de grupos altamente electronegativos en una cumarina hacen que su actividad aumente favorablemente, al incorporar un Bromo dentro de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina presentará un aumento en su capacidad de inhibir el crecimiento celular.



C) Síntesis de marco teórico:

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células; éstas pueden ocasionar tumores, los cuales a su vez pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo. Los tumores pueden ser benignos o malignos; los segundos son conocidos también por tumores cancerosos.

Los tumores cancerosos son peligrosos porque las células afectadas infectan tejidos circundantes ocasionando la metástasis.

Existen diversos tratamientos para el cáncer, sin embargo son procesos peligrosos, dado que los tres tratamientos más usados (cirugía, radioterapia y quimioterapia) pueden afectar también a células sanas.

Se han utilizado plantas medicinales como tratamiento del cáncer desde tiempos remotos, a pesar de que se conocen varias plantas con actividad inhibidora del crecimiento y/o proliferación del cáncer, nadie ha trabajado en esta área con *Casimiroa pubescens*.

Los metabolitos aislados y caracterizados de especies comprendidas en el género *Casimiroa* han sido, en su mayoría, flavonoides y cumarinas; aunque en el caso concreto de *C. pubescens* se han encontrado además alcaloides y compuestos de estructura novedosa como pubesamidas.

En este proyecto se está trabajando una cumarina, la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina, que se sabe que posee actividad de inhibición celular, tomando como base estos resultados y otros de otro proyecto de nuestro grupo de trabajo, especulamos sobre los resultados, confiando que se obtendrán los resultados esperados con la reacción sobre la cumarina.



OBJETIVOS

Objetivo general:

- Sintetizar y evaluar algún bromo-derivado de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina aislada de *Casimiroa pubescens* sobre líneas celulares *in vitro*.

Objetivos específicos:

- Obtener extractos de hexano de corteza de raíz de *Casimiroa pubescens*
- Aislar 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina a partir de los extractos
- Purificar la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina
- Sintetizar el bromo-derivado a partir de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina
- Elucidar la estructura del bromo-derivado de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina
- Evaluar su posible actividad sobre líneas celulares *in vitro*.

MARCO TEÓRICO

1) Cáncer

a) Generalidades

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante



cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (OMS, 2013).

El cáncer se origina en células normales. Normalmente, el cuerpo forma células nuevas a medida que se necesitan para reemplazar a las células envejecidas que mueren. Algunas veces, este proceso no resulta ser el esperado. Crecen células nuevas que no son necesarias y las células envejecidas no mueren cuando deberían. Estas células adicionales pueden formar una masa llamada tumor. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos no son cáncer, pues estos no crecen de manera descontrolada, mientras que los malignos sí lo son. Las células de los tumores malignos pueden invadir los tejidos cercanos. También pueden desprenderse y diseminarse a otras partes del cuerpo, a lo cual se le llama metástasis.

Existen muchos tipos de cáncer, éstos pueden aparecer en casi cualquier órgano o tejido.

a) Causas

Benceno y otros químicos, consumo excesivo de alcohol, toxinas ambientales, exposición excesiva a la luz solar (debido a los rayos ultravioleta), problemas genéticos, obesidad, radiación, etc. Sin embargo, la causa de muchos cánceres sigue siendo desconocida (MedLine Plus, 2013).

b) Tipos

c)

Como ya ha sido mencionado anteriormente, el cáncer puede aparecer en prácticamente cualquier parte del cuerpo, como son: Cáncer cerebral, cervical, de riñón, leucemia, de hígado, de piel, de próstata, de tiroides, entre otros.

Las zonas más comunes donde puede aparecer el cáncer son: en la próstata, pulmón, mama, colon y cérvix, este último ligado al Virus del Papiloma Humano (VPH). (MedLine Plus, 2013).

d) Síntomas



Los síntomas del cáncer dependen del tipo y localización, aunque hay síntomas generalizados, como son: escalofríos, fatiga, fiebre, inapetencia, malestar general y pérdida de peso; de igual forma hay algunos tipos de cáncer que son asintomáticos y otros en el que los síntomas aparecen en una etapa avanzada de cáncer. (MedLine Plus, 2013).

e) Tratamiento

d.1) Radioterapia

Su objetivo es matar las células cancerosas y disminuir el tamaño de los tumores. Los médicos procuran proteger las células normales limitando la dosis de radiación y repartiendo el tratamiento con el transcurso del tiempo. Cuando utilizan máquinas de radiación, protegen la mayor parte posible de su cuerpo.

La radiación como tratamiento para el cáncer se aplica desde una fuente externa, con unas máquinas especiales o internamente, a través de sustancias radioactivas que un médico coloca en su cuerpo. Algunas veces la radiación se combina con otros tratamientos, como la cirugía o la quimioterapia. (MedLine, 2013)

d.2) Quimioterapia

La quimioterapia es un tratamiento con fármacos que puede destruir células cancerosas o detener su multiplicación. Sin embargo, también puede dañar células sanas, lo que produce efectos secundarios.

Es posible que durante la quimioterapia no haya efectos secundarios o que se presenten sólo algunos. Los tipos de efectos secundarios que hagan aparición dependerán del tipo y la dosis de la quimioterapia que reciba el paciente. Los efectos secundarios varían, pero los más comunes son



nauseas, vómitos, cansancio, dolor y caída del cabello. Las células sanas suelen recuperarse después de la quimioterapia, de modo que la mayoría de los efectos secundarios desaparecen.

El curso del tratamiento dependerá del tipo de cáncer, de los fármacos usados en la quimioterapia, de las metas del tratamiento y de la respuesta del organismo. El tratamiento puede ser de ingesta diaria, semanal o mensual. Es recomendable que haya pausas o descansos entre el tratamiento para que el cuerpo tenga la oportunidad de producir nuevas células sanas. Tal vez deba tomar medicinas por vía oral, en inyecciones o de forma intravenosa. (MedLine, 2013)

d.3) Cirugía

Ésta consiste en la extirpación del tumor maligno. Al hacerlo, se dañan también los tejidos circundantes, por lo que es aplicable cuando el tumor maligno se encuentra en una zona de fácil acceso para que no haya efectos secundarios debido a tejidos benignos extirpados. (MedLine, 2013)

f) Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS); se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030, debido en su mayoría, al crecimiento demográfico. En las estimaciones se han tenido en cuenta las ligeras reducciones previstas de la mortalidad por algunos tipos de cáncer en países con grandes recursos.

En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países en vías de desarrollo, además de los países de ingresos medianos, por ejemplo en América del Sur y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer se registran ya en países en desarrollo.

El cáncer de pulmón mata a un mayor número de gente que cualquier otro tipo de cáncer, y se prevé un aumento de esta tendencia hasta 2030 a menos que se intensifiquen mucho las actividades



de control mundial del tabaquismo. Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en desarrollo.

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo comunes, a saber: un modo de vida poco sano (consumo de tabaco y alcohol, dieta inadecuada, falta de actividad física) y exposición a carcinógenos (por ejemplo amianto) en el entorno laboral o en el medio ambiente (por ejemplo por contaminación del aire en locales cerrados), radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) y algunas infecciones (por ejemplo hepatitis B o infección por virus del papiloma humano). (OMS, 2013)

2) Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento del cáncer

Existen varias plantas que demuestran una potente actividad ya sea como estimulantes del sistema inmunológico o como inhibidoras del crecimiento celular. A continuación expondré las tres más usadas como tratamiento alternativo del cáncer:

a) *Uncaria tomentosa*:

Es la planta más utilizada. Se trata de una liana trepadora de la familia de las rubiáceas que se reproduce espontáneamente en las selvas peruanas, a una altitud comprendida entre los 300 y 1000 metros sobre el nivel del mar. Popularmente se la conoce como "Garabato amarillo" o "Samento" en lengua asháninca.

Los pobladores de las zonas en donde crece esta planta la han utilizado tradicionalmente, en uso interno (cocimiento prolongado en agua o licor) para curar los riñones, como anticonceptivo, para acelerar la recuperación post-parto, como antiinflamatorio y para resolver "tumores" (cualquier neoplasia). En uso externo, además, se utiliza para acelerar la curación de heridas de diversos tipos. Los principales componentes encontrados en *Uncaria tomentosa* son: Alcaloides



oxidólicos, glicósidos del ácido quinóico, triterpenos polihidroxiados, acetil-derivados de esteroides y polifenoles. (Aquino et al, 1991)

b) *Ineisnae calea*:

Crece en Ixmiquilpan y San Luís Potosí, en México. La planta desarrolla una actividad muy semejante a *Uncaria tomentosa*, reforzando el sistema inmunológico y oponiéndose al desarrollo de metástasis. El crecimiento de los tumores se ralentiza de una manera evidente bebiendo diariamente el cocimiento de la planta. (Aquino et al, 1991)

c) *Tabebuia impetiginosa*:

El Pau d'Arco o Lapacho es un árbol de América del Sur y del Caribe, de grandes dimensiones y con grandes flores de color púrpura. Los indígenas de estas zonas han proclamado múltiples virtudes medicinales de este árbol y, tradicionalmente, se ha utilizado su corteza interna para el tratamiento de diversas enfermedades.

Aunque su uso más común ha sido para el tratamiento de infecciones micóticas (especialmente las causadas por *Candida* y dermatofitos -tiña, pie de atleta,...-), el Pau d'Arco también se ha utilizado en infecciones bacterianas y víricas del sistema respiratorio (gripes, resfriados,...), del sistema urinario (infecciones de orina), así como para problemas gastrointestinales, en el tratamiento del dolor, la psoriasis, la cicatrización de úlceras y heridas e incluso contra el cáncer.

Los componentes activos responsables de las propiedades terapéuticas son unos derivados de las quinonas (un tipo de sustancias con propiedades anti-oxidantes), denominados lapachol, lapachona e isolapachona. A este grupo se le conoce conjuntamente como naftoquinonas; estas se encuentran en la corteza del árbol. (Guiraud et al, 1994)

3) *Casimiroa pubescens*

a) Género *Casimiroa*



El género *Casimiroa* fue establecido en México por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza en 1825. Dicho género está conformado por diez especies:

- *C. tetrameria*
- *C. pringlei*
- *C. watsoni*
- *C. edulis*
- *C. pubescens*
- *C. sapota*
- *C. emarginata*
- *C. microcarpa*
- *C. calderoniae*
- *C. greggii*
-

Los individuos de estas especies son árboles o arbustos originarios de México y Centroamérica y habitan en climas cálidos. Las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *C. edulis* y varias formas de *C. sapota*; la primera debido a su valor comercial y a las propiedades medicinales que se le atribuyen, es la especie del género más estudiada. (Martínez, 1951)

b) Antecedentes del género *Casimiroa*

El historiador y naturalista Francisco Hernández recogen su obra *Historia de plantas de Nueva España*, escrita a partir de 1790, una descripción precisa de un zapote medicinal y sobre todo el uso que se le daba a estas plantas: “ Del *cochizápotl* o *Tzapotl* somnífero. La corteza del árbol es seca y un poco dulce con cierto amargo; las hojas machacadas y aplicadas a los pezones de las nodrizas curan las cámaras (diarrea) de los infantes; los huesos quemados y hechos polvo curan úlceras pútridas, quemando y consumiendo por completo la carne viciada, limpiando la úlcera creando carne nueva



y produciendo la cicatrización con rapidez admirable-, los frutos comidos concilian el sueño de donde les viene el nombre." (Martinez, 1951)

Los metabolitos aislados y caracterizados de especies comprendidas en el género *Casimiroa* han sido, en su mayoría, flavonoides y cumarinas; aunque en el caso concreto de *C. pubescens* se han encontrado además alcaloides y compuestos de estructura novedosa como pubesamidas A, B y C. (Magos et al, 1999)

4) Cumarinas

Se llama *metabolitos secundarios de las plantas* a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

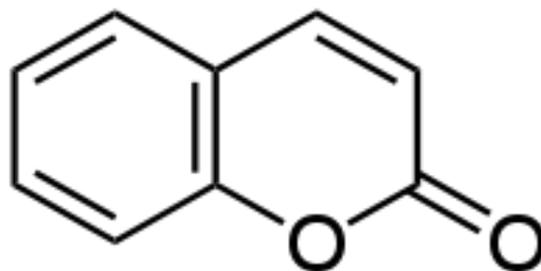
Las cumarinas son probablemente los metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corismato. En miembros de la familia *Rutaceae* se han encontrado aproximadamente 200 cumarinas y las evidencias experimentales han demostrado que éstas se sintetizan por las mismas rutas biosintéticas observadas en otras familias de plantas, donde la umbeliferona se considera intermediario común para la biosíntesis de cumarinas lineales y angulares. (Martinez et al, 2003)

La cumarina es un compuesto químico cuyo nombre según la IUPAC es 2H-cromen-2-ona. A este esqueleto se le pueden adicionar diferentes residuos formando la familia de las cumarinas. Las cumarinas se consideran un grupo de metabolitos secundarios de las plantas.

En plantas, se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en general en frutos y flores. Su rol en las plantas parece ser de defensa, dándole propiedades de rechazo a la alimentación (en inglés antifeedant), antimicrobiana, captadora de radiación UV e inhibidora de la germinación. La propiedad de rechazo a la



alimentación que poseen las cumarinas puede ser correlacionada con el efecto que provoca como alimento en los animales.



Fórmula estructural de una acumarina

METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN

Experimental

1. Se maceró con hexano la corteza de las raíces de *Casimiroa pubescens* durante tres días, posteriormente se filtra y se concentra a presión reducida por medio de un rotaevaporador, obteniendo el extracto de hexano.
2. Este extracto se analizó cualitativamente separándolo por medio de una cromatografía en capa fina (CCP) para observar la presencia de la cumarina 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina.
3. Se aisló la cumarina mediante una cromatografía en columna abierta, la cual se empacó con Sílice (MN-Kieselgel G), se comenzó la elución con hexano aumentando la polaridad con mezclas con acetato de etilo (AcOEt), hasta alcanzar un 100 % de AcOEt posteriormente se siguió el mismo proceso hasta alcanzar un 100% de metanol (MeOH)
4. La 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina se identificó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos reportados previamente por nuestro grupo de trabajo dentro del Instituto de Química de la UNAM.

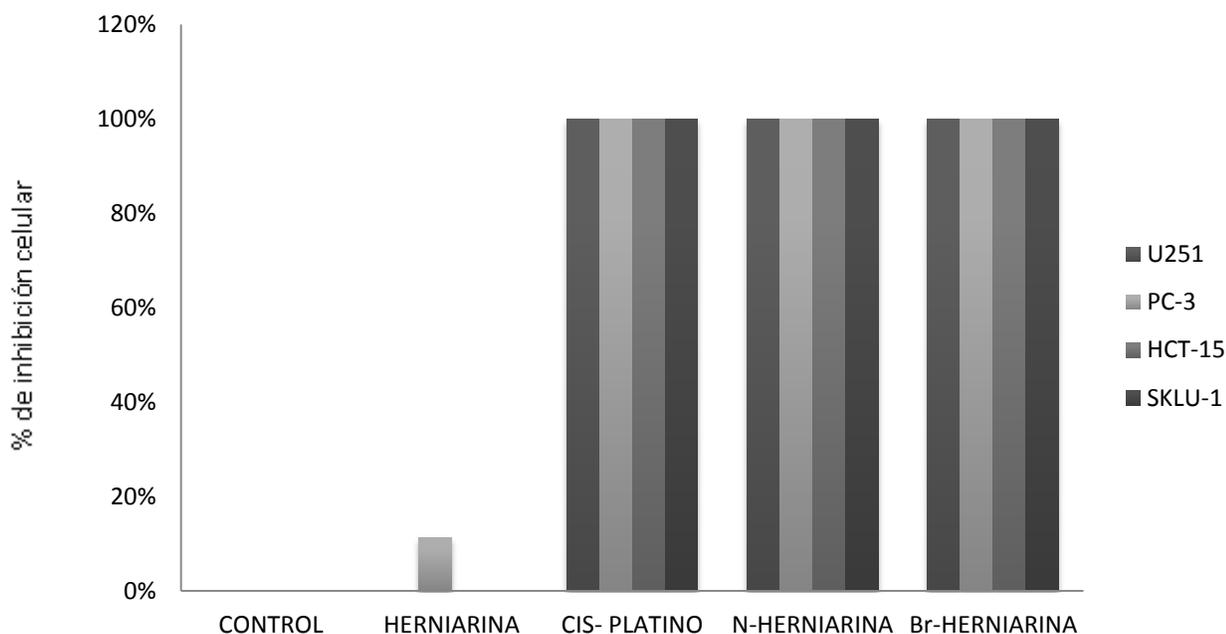


Físicamente la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina forma cristales blanquecinos translúcidos rectangulares con un punto de fusión de 119°C-120°C, con un peso molecular de 244 g/mol.

5. La 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina se purificó mediante cristalizaciones sucesivas con disolventes orgánicos.
6. Se procedió a realizar una bromación, utilizando ácido bromhídrico, a 80 °C durante 12 horas con agitación constante.
7. Se comparó mediante una CCP el producto de reacción con la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina, en la cual se observaron dos productos de la reacción de bromación.
8. Estos productos están en vías de purificación y elucidación; sin embargo por su bajo rendimiento obtenido, aun se están buscando las mejores condiciones para obtener un rendimiento útil.
9. A partir estos resultados se procederá a probar estos productos sobre las líneas celulares *in vitro*: U251 (cáncer de glía de sistema nervioso central), PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon) y SKLU (cáncer de pulmón).



RESULTADOS



Las barras de los bromo-derivados de la herniarina son especulaciones que nos atrevemos a hacer con base en los resultados obtenidos anteriormente con el producto en proceso de patente (N-HERNIARINA).

Como se puede apreciar en la gráfica, ya obtuvimos un resultado positivo en la N-HERNIARINA aumentando los valores porcentuales de actividad sobre las líneas celulares *in vitro*: U251, PC-3, HCT-15 y SKLU-1 de 0% a 100%, 11.3% a 100%, 0% a 100% y 0% a 100% respectivamente. Además de mostrar (N-HERNIARINA) actividad en otras líneas celulares que son: K562 y MCF-7 con un 76.36% y 100% respectivamente.



Se obtuvieron 500mg de la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina con una pureza del 98%.

Hasta el momento hemos logrado aislar 10mg del producto de reacción, rescatando completamente la 3-(1'1'-dimetilalil)-herniarina residual tras la reacción.

CONCLUSIONES

Hasta el momento *C. edulis* era la única planta estudiada desde el punto de vista farmacológico, por lo tanto es un estudio útil el que se hace a esta planta. Los metabolitos secundarios aislados de *C. pubescens* están siendo estudiados y, hasta el momento, se han encontrado productos interesantes en ella. De las cumarinas aisladas es posible obtener productos "mejorados", con esto refiriéndome a productos con actividad bastante alta, tras una reacción de halogenación a la molécula. Con este proyecto quisimos hacer en mi grupo de trabajo una bromación, pues ésta no se había hecho anteriormente.

Actualmente el proyecto aún no ha sido terminado; sin embargo, sabemos que habrá resultados positivos al finalizarlo en base a resultados obtenidos con otros proyectos dentro del mismo laboratorio.

APORTACIONES

El estudio del género *Casimiroa* ha arrojado hasta el momento resultados favorables en cuanto a propiedades (metabolitos secundarios) aislados de las especies en este género comprendidas. Diversas aplicaciones han sido comprobadas; y, con este proyecto, se aumenta en uno la lista de beneficios obtenidos con este género.





NUEVAS PROPUESTAS

Mi proyecto no contiene implícita o explícitamente alguna propuesta, sin embargo me gustaría proponer más apoyo a la ciencia, pues existen bastantes proyectos útiles que no se llevan a cabo especialmente por la carencia de apoyo financiero.



REFERENCIAS

1. Antigua farmacia San Miguel, Naturopatía, Lda. María Antonia Cerrado Alberca, 2013 de http://www.antiguafarmaciasanmiguel.com/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=157
2. Aquino, R.; De Feo, V.; De Simone, F.; Pizza, C. Y Cirino, G.: Plant metabolites, new compounds, and antiinflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Products*. 54. 453-459. 1991.
3. Bronikowska J. et al, The Coumarin Psoralidin Enhances Anticancer Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), *Molecules* 2012, 17: 6449-6464.
4. Guiraud P, Steiman R, Campos-Takaki GM, et al. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. *Planta Med* 1994;60:373-74.
5. Magos, G.A., Vidrio, H., Reynolds, W.F., Enriquez, R.G., 1999. Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 35-44.
6. Martínez, M., 1951. Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología de México* 22, 25-81.
7. MedLine Plus, Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU., 2013 en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/cancer.html>
8. Moscow JA, Cowan KH. Biology of cancer, Goldman L, Schafer AI, eds. Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011: chap 183, 185.
9. Organización Mundial de la Salud (OMS) 2013 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
10. Rizvi, S.H., Kapil, R.S., Shoeb, A., 1985. Alkaloids and coumarins of *Casimiroa edulis*. *Journal of Natural Products* 48, 146.
11. García A., González N., Márquez C., Martínez M., Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Revista de la Sociedad Química de México*, vol 47, núm 2, 2003, pp. 151-154.

