

# Citotoxicidad de Bixina, Rutina, Pinitol B y ácido ent-16-kauren-19-oico aislados de especies vegetales colombianas

Claudia Patricia Cordero\*, Roberto Pinzón\* y Fabio Ancizar Aristizábal\*<sup>1</sup>

## Resumen

Con el ánimo de contribuir al estudio de la actividad biológica de los compuestos aislados a partir de especies vegetales, por el Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, se evaluó el efecto citotóxico del ácido ent-16-kauren-19-oico, bixina, rutina y pinitol B, sobre cuatro líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos (HEp-2, MCF-7, MKN-45 y HT-29), empleando el método colorimétrico de reducción de MTT.

**Palabras clave:** Citotoxicidad – Anticáncer – Reducción de MTT – *in vitro*

## Summary

### Cytotoxicity of Bixine, Rutin, Pinitol B, and ent-16-kauren-19-oic acid isolated from Colombian plants

In order to test the biological activity of compounds derived from Colombian plants, isolated by the “Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos” at the Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, cytotoxic activity of ent-16-kauren-19-oic acid, bixin, rutin and pinitol B were tested against four human derived tumor cell lines (HEp-2, MCF-7, MKN-45 y HT-29), using the MTT reduction assay.

**Key words:** Cytotoxicity – MTT – Anticancer – *in vitro*

## Introducción

Los altos índices de mortalidad asociados al cáncer (6,2 millones de muertes en el 2000), las perspectivas de aumento de la incidencia de esta patología en un 50% en los próximos veinte años (1), los altos costos en la terapia y los efectos secundarios asociados a esta, hacen que la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento y de adyuvantes de tratamiento siga siendo un campo vigente dentro del quehacer investigativo farmacéutico.

El tamizaje para seleccionar compuestos interesantes con potencial actividad anticáncer se ha desarrollado en los últimos veinte años, en modelos *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos, por ser éste un modelo fácil de adoptar en diferentes laboratorios de farmacología, adaptable al manejo de altos volúmenes de muestras y suficientemente flexible para evaluar extractos vegetales y compuestos puros de diferente origen (2,3); esas características han impulsado su inclusión en la batería de

Recibido para evaluación: Octubre 7 de 2003  
Aceptado para publicación: Noviembre 30 de 2003

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 25479, Bogotá, Colombia.

\*<sup>1</sup> E-mail: faarizabal@unal.edu.co

pruebas de actividad biológica usadas para bioguiar el estudio fitoquímico de la flora colombiana, que realizan diversos grupos de investigación en el país, con el objetivo básico de conocer estos recursos, explorar sus potenciales usos y promover así su aprovechamiento sostenible.

Uno de estos grupos es el de Investigación en Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, que tiene una amplia trayectoria en el estudio fitoquímico y farmacológico de plantas medicinales colombianas, la cual ha llevado al aislamiento e identificación de compuestos de diferentes características químicas como Bixina, Rutina, Pinitol B y ácido ent-16-kauren-19-oico. Para generar información sobre la actividad biológica de estos compuestos, se decidió evaluar su citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares derivadas de tumores humanos, con el objeto de explorar su potencialidad como agentes útiles en tratamiento de cáncer.

## Metodología

**Cultivos celulares:** se emplearon cuatro líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos HEP-2 (carcinoma de laringe), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma colorrectal), y MKN-45 (adenocarcinoma gástrico) obtenidas todas, del banco de células del Laboratorio de Inmunología, del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, sede Bogotá. Las cuatro líneas celulares se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en frascos de cultivo celular de 75  $\text{cm}^2$ , a 37 °C, en atmósfera de aire con 5% de  $\text{CO}_2$  y 100% de humedad relativa.

**Valoraciones de citotoxicidad:** se realizaron empleando el método de reducción del MTT introducido por Mossman (4) y adaptado en el laboratorio (5). Las células con 90% de confluencia

fueron tripsinizadas, contadas en cámara de Neubauer y transferidas a placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano, las densidades celulares (células/pozo) fueron 7500 para HEP-2, 10000 para MKN-45, 15000 para MCF-7 y 20000 para HT-29. Después de un período de preincubación de 24h las células fueron tratadas por 48h con el compuesto de prueba, adicionado en cinco diluciones seriadas (concentración máxima 100  $\mu\text{M}$ ). El medio que contenía la sustancia de tratamiento fue retirado, se lavó cada pozo con 100  $\mu\text{L}$  de PBS (buffer de fosatos – salina) y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de solución de MTT en MEM fresco sin suplementar (concentración final 0,25  $\text{mg}/\text{mL}$ ), se incubó a 37°C por 4h, al cabo de este tiempo se retiró el medio y los cristales de formazán se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido), se agitó la placa por 5 minutos y se leyó la absorbancia a 570nm en el lector de placas BIORAD 550. Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativos a las células control no tratadas. Se obtuvieron curvas logaritmo de concentración vs. porcentaje de supervivencia y se calcularon las concentraciones letales 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) empleando una transformación a Probitos de la respuesta (porcentaje de supervivencia), empleando el programa POLO PC. La valoración de todos los compuestos se realizó empleando tres pozos con cada concentración evaluada, y se repitió en semanas diferentes, mínimo dos veces, para confirmar el resultado.

**Tratamientos:** los compuestos estudiados fueron: bixina (monometil ester del ácido 6,6'-Diprop- $\psi$ ,  $\psi$ -carotenodioico, p.m. 394.5), aislada de frutos maduros de *Bixa orellana* (6), pinitol B (1 $\alpha$ -metoxi-2 $\beta$ , 3 $\alpha$ , 4 $\alpha$ , 5 $\beta$ , 6 $\beta$ -ciclohexanopentol, p.m. 194) obtenido de *Gliricidia sepium* (7), rutina (3-[[6-O-(6-Deoxy- $\alpha$ -L-manopiranosilb-D-glucopiranosil]oxi]-2-(3,4-dihidroxifeil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopirran-4-ona, p.m. 610) aislada de *Struthanthus subtilis* K (8); y ácido ent-16-kauren-19-oico (p.m. 313), aislado de

raíces de *Smallantus riparius* (9). Los compuestos se evaluaron en concentraciones de 5 a 100  $\mu\text{M}$ , empleando como patrón positivo de actividad citotóxica una solución de Doxorubicina HCl (Pharmacia & Uphjon), en concentraciones 0,1 a 10  $\mu\text{M}$  y se verificó que el vehículo empleado para disolver los compuestos DMSO en MEM (concentración máxima 0,5% de DMSO) no presentara efecto citotóxico.

## Resultados y Discusión

Sobre las cuatro líneas celulares empleadas, se observó efecto citotóxico del control positivo, evidenciado como un descenso en la supervivencia celular, proporcional al aumento de la concentración de Doxorubicina HCl, indicativo de la adecuada sensibilidad a agentes xenobióticos que presentaban las células, que permitió calcular las concentraciones letales 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) para este agente sobre las cuatro líneas celulares (Tabla 1). Por otro lado, el vehículo empleado para la disolución de los compuestos (DMSO en MEM) no mostró actividad citotóxica, excluyendo la interferencia de este en los resultados.

Al tratar las células con los compuestos en estudio no se presentó una reducción de la supervivencia celular con el aumento de la concentración, por tanto se considera que estos no presentan actividad citotóxica en concentraciones iguales o menores a 100  $\mu\text{M}$ , sobre las líneas celulares empleadas. En las Figuras 1 a 4 se presenta el comportamiento de los cuatro compuestos estudiados sobre las cuatro líneas celulares, así como del control positivo de actividad (Doxorubicina HCl) y del vehículo (DMSO).

La selección de los compuestos estudiados no estuvo basada en información etnomédica sobre las especies vegetales de las que fueron aislados, ni en el fraccionamiento bioguiado de éstas; la valoración de su citotoxicidad obedeció al interés de generar información sobre

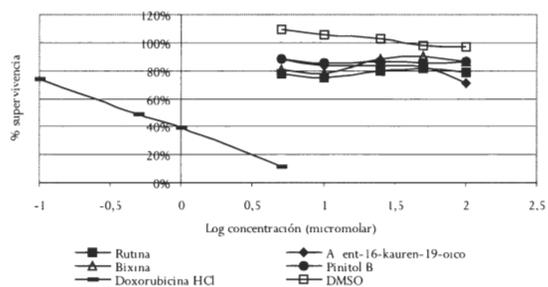
sustancias disponibles, previamente aisladas por el Grupo de Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Farmacia.

Los resultados obtenidos indican que el modelo es útil para diferenciar compuestos citotóxicos (como la Doxorubicina HCl), de los no citotóxicos, representados aquí por los compuestos estudiados, mostrando su relevancia como prueba de tamizaje preliminar.

**Tabla 1.** Citotoxicidad de Doxorubicina HCl sobre las cuatro líneas celulares.

Línea celular	$\text{CL}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
HT-29	$0.709 \pm 0.155$
HEp-2	$0.339 \pm 0.097$
MCF-7	$0.199 \pm 0.024$
MKN-45	$0.226 \pm 0.028$

$\text{CL}_{50}$  es el promedio de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 1.** Citotoxicidad sobre línea celular HT-29.

## Agradecimientos

Al profesor Jairo Calle por el suministro de los compuestos aquí evaluados. Este trabajo contó con financiación de Colciencias a través del proyecto "Evaluación de actividad anticáncer y anti-HIV en extractos de productos naturales",

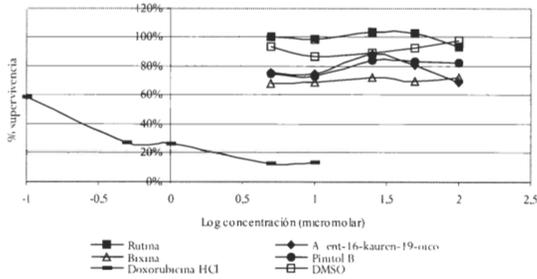


Figura 2. Citotoxicidad sobre línea celular HEP-2.

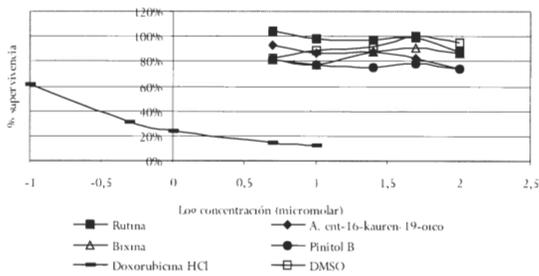


Figura 3. Citotoxicidad sobre línea celular MCF-7.

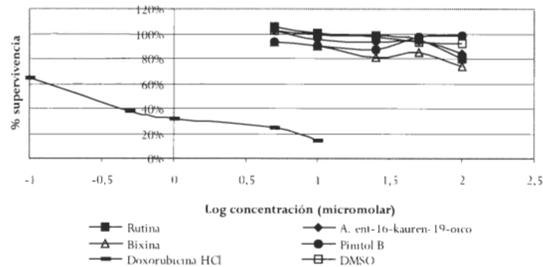


Figura 4. Citotoxicidad sobre línea celular MKN-45.

número 1101-05-10067. Al Grupo de Productos Naturales Bioactivos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por la colaboración en el desarrollo de estos estudios. Al Instituto de Cancerología sede Bogotá D.C., por la donación de las líneas celulares.

## Bibliografía

1. WHO. [Http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/](http://www.who.int/mediacentre/releases/2003/pr27/en/), septiembre (2003).
2. M. M. Lieberman, G. M. L. Patterson y R. E. Moore, In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity, *Cancer Letters*, **173**, 21 (2001).
3. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan et al., Feasibility of a High-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cells lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, **83**, 757 (1991).
4. T. Mossman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunolog. Methods*, **65**, 55 (1983).
5. C. Cordero y F. Aristizábal, Evaluación preliminar *in vitro* de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Rev. Col. Biotecnol.*, **4**, 100 (2002).
6. J. Calle, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, comunicación personal, 2003.
7. J. Calle, A. Rivera y P. Joseph-Nathan, Pinitol from the Leaves of *Gliricidia sepium*. *Planta Medica*, **3**, 303 (1987).
8. D.B. Duarte y O.J. García, "Estudio Fitoquímico de la Especie *Struthanthus subtilis* Kujt", Tesis de grado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, 2002, p 45.
9. J. Calle, A. Rivera, J. Herrera, J. Gutierrez-Luis y P. Joseph-Nathan, Aislamiento de los ácidos ent-16-kauren-19-oico y 18-angeloiloxi-ent-16-kauren-19-oico de las raíces de *Smallantus riparius*. *Rev. Col. Quím.*, **17**, 27(1988).