

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



IDENTIFICACION, CUANTIFICACION Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
CITOTOXICA DE LOS GLICOSIDOS CARDIOTONICOS PROCEDENTES DE
LOS FRUTOS, SEMILLAS Y FLORES DE *Calotropis procera*
(MATACOYOTE) DE LA FAMILIA DE LAS ASCLEPIADACEAE.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JORGE DENIS MARTINEZ BONILLA

MIRIAM JEANNETTE ROMERO AREVALO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

AGOSTO DE 2011

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL

Lic. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Coordinación General

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Aprovechamiento de Recursos Naturales

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

Asesora de Área de Análisis de Alimentos, Microbiológico.

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

Docentes Directores

Dr. Marvin José Núñez Rivas

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no habría sido posible sin la valiosa ayuda de mis Docentes Directores Marvin Núñez y Morena Martínez. A ambos mis sinceros agradecimientos no solo por la confianza que nos brindaron durante este trabajo, sino que también por su paciencia y comprensión. MSc. Amy Moran, Licda. Odette Rauda y Licda. Rina Toledo, Asesoras de área, quienes nos brindaron su apoyo a lo largo de la investigación y nos corrigieron de manera objetiva y desinteresada.

Dra. Laila Moujir y Lic. Manuel Rodríguez de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España, por su invaluable aporte a esta Tesis, por su apoyo desinteresado al realizar la actividad biológica a nuestras muestras, muchísimas gracias. A Q.F.B. Gamaliel González León Director de Proquifa, quien nos brindó el material para la realización de la cuantificación de los Glicósidos Cardiotónicos y de igual forma Licda. Mayra de Vela, Licda. Reyna Jovel.

Por último, la realización de esta Tesis tampoco hubiera sido posible sin el constante apoyo de mi compañera de Tesis, mis hermanos, la fortaleza que me da mi Padre, y mi Madre que desde lo más alto me da la fuerza para seguir adelante.

A todos ellos Gracias.

Jorge Denis Martínez Bonilla.

DEDICATORIA

A mi Madre, que no alcanzo a ver los resultados de sus esfuerzos pues partió tempranamente; por su paciencia, comprensión y en especial sus cuidados los que me llevaron hasta donde estoy ahora.

A mi Padre, que siempre ha sido ejemplo de fortaleza y empeño para mí.
Gracias por estar siempre conmigo.

A mis hermanos que siempre me han apoyado.

Jorge Denis Martínez Bonilla.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que me fuera posible alcanzar este triunfo.

A mis Padres por todo su esfuerzo y dedicación, GRACIAS.

A mis Docentes Directores, Dr. Marvin Núñez, por brindarme su amistad, su invaluable orientación, consejos y sugerencias y ser el promotor de la realización de esta tesis. Lic. Morena Martínez que con su asesoría y apoyo contribuyo a mejorar y dar forma a esta investigación.

A las Asesoras de área, Lic. Rina Toledo, Lic. Amy Moran y Lic. Odette Rauda, que siempre nos hicieron aportes y sugerencias para la mejora de la tesis.

Dra. Laila Mujir y Lic. Manuel Rodríguez, por regalarnos su valioso tiempo, créanme que no tengo palabras para agradecerse los.

QFB. Gamaliel González, Director de PROQUIFA, por su desinteresado apoyo al desarrollo de la investigación.

Familia Romero Hernández, Tío Leo, Tía Milagro, Evi y David, sin su apoyo en un momento muy importante de mi vida este logro no sería posible.

A mi Compañero de tesis, gracias por embarcarte conmigo en esta odisea.

Y a todos los que no alcanzo a mencionar, porque me harían falta cientos de páginas que colocar.

Miriam Jeannette Romero Arévalo.

DEDICATORIA

A mi Madre, Miriam Esther de Romero por su cariño, apoyo y dedicación para ayudarme a ser un persona mejor; por todo su esfuerzo para que yo alcanzara este logro.

A mi padre Edgardo Romero, por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado.

A mis hermanas, Adri y Ale y mi hermano Andrés por ser mi apoyo y motivación para seguir adelante, porque siempre han creído en mí y a lo largo de la carrera siempre han estado conmigo.

Miriam Jeannette Romero Arévalo.

INDICE

Página N°

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 Introducción

xxii

CAPITULO II

2.0 Objetivos

25

CAPITULO III

3.0 Marco teórico

27

3.1 Generalidades sobre Glicósidos Cardiotónicos.

27

3.2 Generalidades de *Calotropis procera*

32

3.2.1 Información botánica

32

3.2.2 Historia

32

3.2.3 Origen y distribución

34

3.2.4 Descripción botánica

35

3.2.5 Hábitat

36

3.2.6 Composición química	37
3.2.7 Usos etnobotánicos	39
3.2.8 Toxicidad	39
3.3 Generalidades del cáncer.	40
3.3.1 Actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos	47
3.4 Generalidades sobre métodos para determinar la citotoxicidad	56
3.5 Generalidades de métodos de extracción, fraccionamiento y separación de productos naturales.	61
3.5.1 Métodos extractivos a partir de la droga.	62
3.5.2 Generalidades de cromatografía.	72
3.5.2.1 Cromatografía en capa fina.	74
3.6 Elucidación estructural.	77
3.6.1 Espectroscopia infrarroja (I.R).	77
3.6.2 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)	79
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	82

4.1 Tipo de estudio.	82
4.2. Investigación bibliográfica.	81
4.3 Investigación de campo.	83
4.4 Investigación de laboratorio.	83
4.4.1 Preparación de las muestras a investigar.	83
4.4.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de epicarpis, semillas y flores de <i>C. procera</i> .	84
4.4.3 Fraccionamiento por partición liquido-liquido.	84
4.5 Identificación de los glicósidos cardiotónicos por cromatografía de capa fina.	85
4.6 Identificación de los glicósidos cardiotónicos por medio de análisis espectroscópico.	87
4.7 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos mediante espectroscopia UV	87
4.8 Determinación de la actividad citotóxica.	89

CAPITULO V

5.0 Resultados y discusión de resultados	94
--	----

CAPITULO VI

6.0 Conclusiones	119
------------------	-----

CAPITULO VII

7.0 Recomendaciones	123
---------------------	-----

8.0 Bibliografía	125
------------------	-----

Glosario	134
----------	-----

Anexos	138
--------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Página N°
1. Estructura de un glicósidos cardiotónicos	28
2. Biogénesis de los glicósidos cardiotónicos.	30
3. Características estructurales de los glicósidos cardiotónicos.	31
4. Destrucción de Sodoma y Gomorra por Dios.	33
5. Prescripción del Ayurveda redactada en sánscrito.	34
6. Distribución geográfica de <i>Calotropis procera</i>	35
7. Arbusto de <i>Calotropis procera</i> , detalles de flores y semillas.	37
8. Estructuras de glicósidos cardiotónicos presentes en <i>Calotropis procera</i> .	38
9. Etapas del cáncer uterino.	42
10. Diagramas esquemático de un seno (sección de mujer adulta)	43
11. Mamografías mostrando una mama normal (izq.) y una con cáncer (der.).	45
12. Esquema de pulmón, detalle de tejido canceroso.	46

13. Posibles mecanismos de acción de los glicósidos cardiotónicos	49
14. Estructura de cardenólidos que presentan actividad citotóxica <i>in vitro</i>	55
15. Reacción de coloración del ensayo MTT.	58
16. Proceso de maceración de raíces de <i>Ambrosia cumanensis</i> .	65
17. Aparato de destilación por arrastre de vapor.	66
18. Esquema de un equipo para digestión.	67
19. Aparato para reflujo.	68
20. Aparato de percolación.	70
21. Extractor soxhlet.	70
22. Cámara de separación de cromatografía en capa fina.	75
23. (a): Cromatografía de capa fina vista en cámara de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. (b): Cromatografía en capa fina revelada.	76
24. Espectro IR de la digitoxigenina.	78
25. Espectro UV de la digitoxigenina.	80

26. a. Esquema de trabajo	91
b. Esquema de trabajo	92
27. Cromatografía de capa fina de las fracciones de C. procera	95
28. Espectro IR de estándar de la digitoxigenina.	97
29. Espectro IR de Fracción CP9 (epicarpo en AcOEt)	98
30. Espectro UV de la digoxina	100
31. Espectro UV de la digitoxigenina.	1101
32. Espectro UV de la fracción CP5, (Semillas de C. procera en CH ₂ Cl ₂ .)	101
33. Espectro IR de Fracción CP4, flores de C. procera en diclorometano.	
34. Espectro IR de Fracción CP5, semillas de C. procera en diclorometano	
35. Espectro UV de Fracción CP5, semillas de C. procera en diclorometano	
36. Espectro UV de Fracción CP8, semillas de C. procera en acetato de etilo	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Página N°
1. Resumen de los estudios de las ultimas décadas sobre glicósidos cardiotónicos con actividad citotóxica.	50
2. Codificación de las muestras	85
3. Peso del material vegetal seco.	94
4. Resultado de la evaluación cromatográfica, de las diferentes fracciones procedentes de los frutos, semillas y flores.	96
5. Bandas de absorción en Infrarrojo, más característica en glicósido cardiotónicos presentes en cada una de las fracciones y testigos (espectros realizados en KBr).	98
6. Absorbancia y longitud de onda máxima en ultravioleta de cada una de las fracciones y testigos (realizados en etanol).	99
7. Datos del estándar.	105
8. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones.	109
9. Resumen de peso de muestras y contenido de glicósidos cardiotónicos en CP5 (semillas en CH ₂ Cl ₂).	110

10. Resumen de peso de muestras y contenido de glicósidos cardiotónicos en CP8 (semillas en AcOEt).	111
11. Porcentajes de glicósidos cardiotónicos en cada fracción.	12
12. Contenido y porcentaje de glicósidos en epicarpo y semillas.	112
13. Resultado de la actividad citotóxica.	115
14. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones tomando en cuenta todos los datos.	
15. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones tomando en cuenta únicamente los valores dentro del intervalo de confianza	

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo N°

1. Espectros Infrarrojos realizados en KBr.
2. Espectro Ultravioleta realizado en etanol.
3. Resultados del contenido de glicósidos cardiotónicos en las fracciones, expresados como digoxina.
4. Carta de autenticación del material vegetal extendida por un botánico experto

RESUMEN

La clase de compuestos designados como glicósidos cardíacos incluye fármacos bien conocidos como la digoxina, digitoxina y la ouabaína. Su continua eficacia en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y como agentes antiarrítmicos es muy apreciada. Menos conocida, sin embargo, es el nuevo papel de esta clase de compuestos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades proliferativas como el cáncer. Nuevos hallazgos en los últimos años han revelado que estos compuestos poseen un control selectivo en los tumores humanos, pero no en la proliferación celular normal. Tomando en cuenta los antecedentes antes mencionados, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo principal es investigar la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos de *Calotropis procera*. Especie originaria de Asia y África, es un pequeño árbol que se distribuye en las islas del Caribe y áreas tropicales de América.

Después de obtener los extractos hidroalcohólicos de cada uno de los órganos, se procedió a realizar la partición liquididad-liquida primero con *n*-hexano, luego con diclorometano y finalmente acetato de etilo para posteriormente llevar a cabo determinación de la presencia de glicósidos cardiotónicos, por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (ultravioleta e infrarrojo), detectándose en seis de las nueve fracciones, obtenidas de los epicarpis, semillas y flores. A las fracciones positivas se les determinó el contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, donde se obtuvo un mayor

porcentaje de estos metabolitos en las semillas. A la vez se determinó la actividad citotóxica *in vitro*, frente a tres líneas celulares: HeLa (carcinoma humano de cuello uterino), A-549 (cáncer humano de pulmón) y MCF7 (adenocarcinoma humano de mama), además se utilizaron las células Vero (células de riñón de mono verde) para determinar el grado de citotoxicidad sobre las células normales de cada una de las fracciones analizadas. Las fracciones más activas fueron las siguientes: semillas en diclorometano, epicarpo en diclorometano y semillas en acetato de etilo frente a la línea celular de carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), presentando solamente las semillas en acetato de etilo toxicidad media frente a las células vero.

Las seis fracciones mostraron actividad frente al cáncer humano de pulmón (A-549), presentando valores incluso mejores que la Mercaptopurina, utilizado como control positivo. Sin embargo, frente a las células Vero solamente las fracciones de flores en diclorometano y semillas en acetato de etilo presentaron toxicidad media; flores en acetato de etilo y epicarpo en acetato de etilo mostraron toxicidad débil, convirtiéndose estas últimas en las más prometedoras como agentes anticancerígenos, frente a la línea celular A-549.

En cuanto al adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) ninguna fracción presento actividad significativa.

Observando los valiosos resultados obtenidos se recomienda continuar con futuras investigaciones que permitan determinar a ciencia cierta los cardiotónicos responsables de la actividad.

**CAPITULO I
INTRODUCCIÓN**

1.0 INTRODUCCION.

Los glicósidos cardiotónicos, son sustancias constituidas de una porción esteroidea, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona- α,β -insaturada o δ -lactona- α,β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca congestiva.

Los cardiotónicos se encuentran principalmente en las hojas de plantas de las Familias Escrofulariáceas, Apocináceas, Liliáceas, Ranunculáceas y Asclepiadáceas.

Actualmente se ha demostrado que además de poseer acción sobre el músculo cardíaco, los glicósidos cardiotónicos presenta una actividad anticancerígena significativa, lo que ha hecho que nuevas investigaciones sean enfocadas en esta dirección.

En el presente trabajo se estudiarán las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, procedentes de los extractos hidroalcohólicos de los frutos, semillas y flores de ***Calotropis procera***, en la búsqueda de glicósidos cardiotónicos; los cuales se determinarán por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando el agente revelador de Baljet.

Las fracciones que presenten glicósidos cardiotónicos, se les realizará espectros de Infrarrojo (IR) y Ultravioleta (UV) para su identificación y cuantificación, además se les determinará la actividad citotóxica frente a las

líneas celulares: carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), cáncer humano de pulmón (A-459) y adenocarcinoma humano de mama (MCF-7).

De esta forma se contribuirá a la búsqueda de nuevas compuestos con actividad anticancerígena, además de continuar con el estudio fitoquímico de especies de la flora salvadoreña.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Identificar, cuantificar y determinar la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de los frutos, semillas y flores de ***Calotropis procera***.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.

2.2.1 Obtener los extractos hidroalcohólicos de los frutos, semillas y flores de los frutos de ***Calotropis procera***.

2.2.2 Obtener las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, a partir de los extractos hidroalcohólicos de los frutos, semillas y flores de ***Calotropis procera***.

2.2.3 Realizar pruebas cualitativas y cuantitativas para determinar la cantidad de glicósidos cardiotónicos en frutos, semillas y flores de ***Calotropis procera***.

2.2.4 Interpretar los espectros de Ultravioleta e Infrarrojo de las fracciones que presentan glicósidos cardiotónicos.

2.2.5 Determinar la actividad citotóxica en las fracciones que contengan glicósidos cardiotónicos.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEORICO.

3.1 GENERALIDADES SOBRE GLICÓSIDO CARDIOTÓNICOS.

Los glicósidos cardiotónicos, son un grupo de productos naturales, que actúan directamente sobre el miocardio y la circulación auriculo ventricular. De los más de 300 glicósidos cardiotónicos aislados hasta la fecha, digoxina y digitoxina son las más utilizadas para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca y de determinadas arritmias ^(47,50).

Se pueden encontrar en la naturaleza tanto en plantas como en animales. En las plantas está restringidas a un número reducido de familias botánicas, principalmente aquellas estrechamente relacionadas a Apocináceas (géneros *Nerium*, *Strophantus* y *Thevetia*) y Asclepiadáceas (*Asclepias*), apareciendo curiosamente en este último género en el látex. Además se encuentran en otras Familias de las dicotiledóneas, Crucíferas (*Erysimum*), Escrofulariáceas (*Digitalis*), Celastráceas (*Euonymus*) y entre algunas monocotiledóneas especialmente en las Liliáceas (*Urginea*) ⁽⁴⁷⁾.

Algunos animales utilizan los glicósidos cardiotónicos, producidos o almacenados dentro de su organismo, como mecanismos de defensa por ejemplo las mariposas monarca de la Familia Danaidae las cuales dentro de sí acumulan calactina, que las vuelve de sabor amargo para los predadores; este cardiotónico es acumulado en su fase de larva ingiriendo las hojas de ***Asclepia***

syrica⁽²⁶⁾. Otros animales que poseen glándulas que segregan bufadienólidos son los sapos del genero ***Bufo spp***, y la serpiente ***Rhabdophis subminiatus***

Se reconocen dos tipos de agliconas, los cardenólidos que son compuestos de C-23, por ejemplo la digoxina, y los bufadienólidos, por ejemplo la bufalotoxina, que son estructuras de C-24 (Figura N°1).

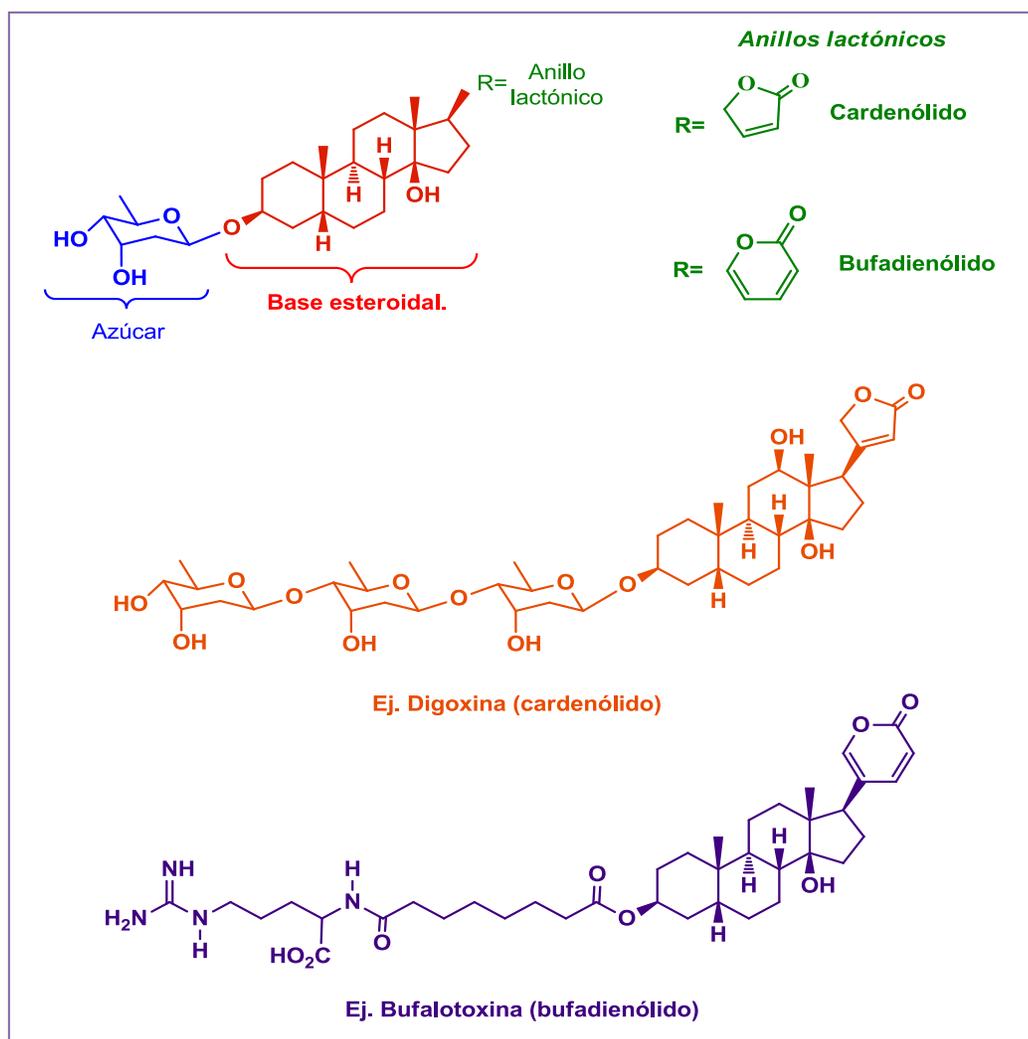


Figura N°1. Estructura de glicósidos cardiotónicos.

Los cardenólidos y bufadienólidos son estructuras básicas provenientes de la biogénesis del colesterol, donde la cadena lateral de esta es reducida a una metilcetona, mediante una ruptura oxidativa, posteriormente oxidaciones, tautomerismos ceto-enólicos, reducción $\Delta^{4,5}$ y reducción de la cetona en el C-3, nos conducen al 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-diona, la cual es hidroxilada en el C-14, con inversión de la configuración. Posterior hidroxilación de la cadena lateral, seguido de la condensación de malonil-CoA y oxoloacetil-CoA, nos conducen a los cardenólidos y bufadienólidos, respectivamente ⁽⁹⁾ (Figura N°2).

La parte glicósidica contiene en ocasiones azúcares que son exclusivos para este tipo de compuestos como la D-digitoxosa y D-digitalosa. Alrededor de 20 azúcares diferentes se han caracterizado como los 2,6-didesoxiazúcares (digitoxosa y cimarosa) o los 6-desoxiazúcares (rhamnosa, fucosa y digitalosa). Hay azúcares metilados, es decir, con OH en forma de éter (cimarosa y digitalosa) además se pueden encontrar azúcares acetilados ^(9, 24, 50).

La actividad farmacológica fundamental de los glicósidos cardiotónicos reside en la aglicona, pero se modifica considerablemente por la naturaleza del azúcar en el C-3, esta incrementa la polaridad del cardiotónico modificando la intensidad y duración de su efecto. Todos ejercen acciones similares, diferenciándose de sus características farmacocinéticas que están condicionadas por el grado de hidroxilación de la genina. Actúan directamente sobre el músculo cardíaco por inhibición de la bomba sodio potasio ATPasa

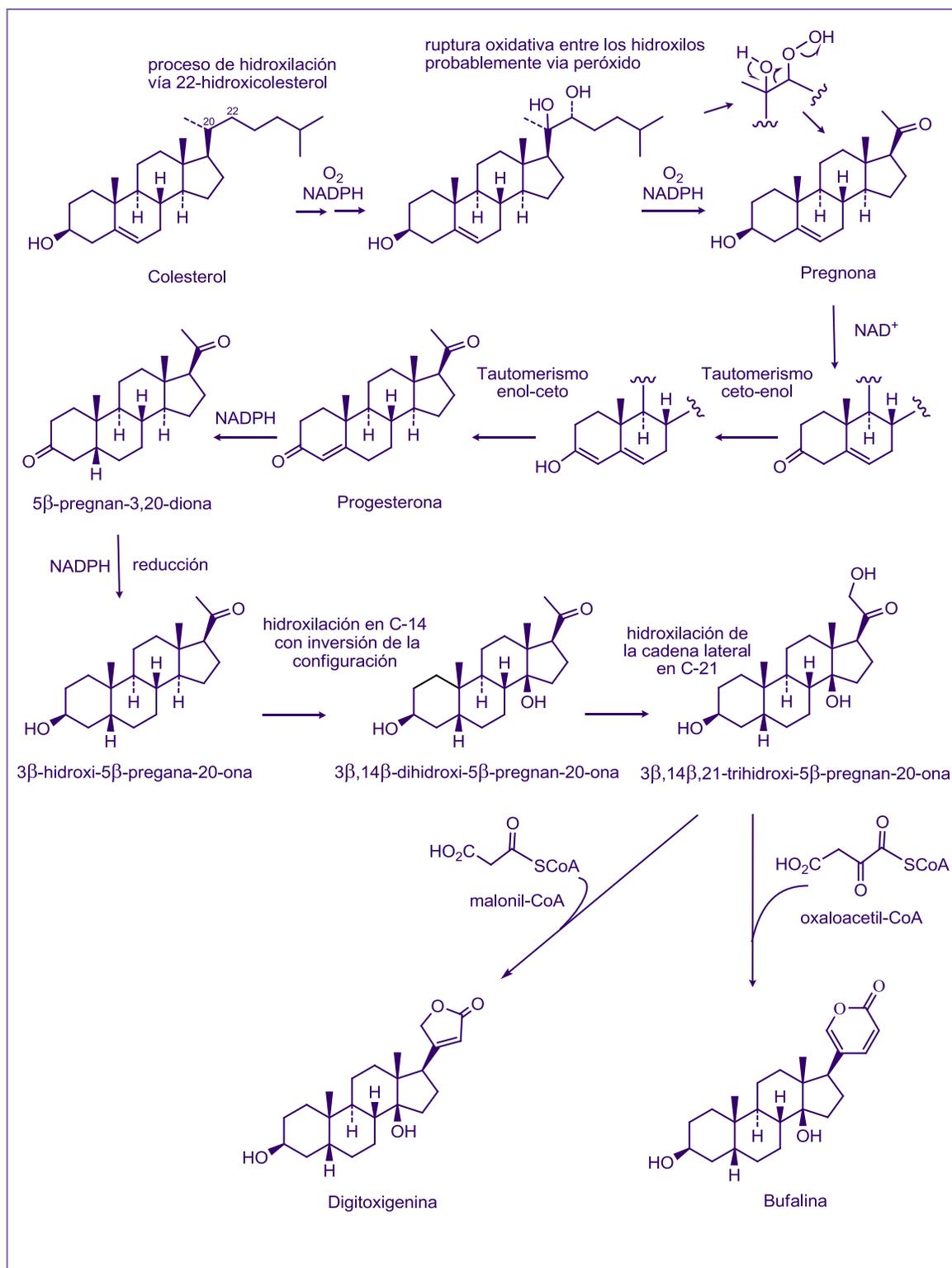


Figura N°2. Biogénesis de los glicósidos cardiotónicos.

dependiente, aumentando la contractilidad intrínseca de la fibra muscular (efecto inótropo positivo) y el volumen minuto, lo que conduce a la supresión de la hipertonia simpática refleja característica de la insuficiencia cardiaca ⁽²³⁾.

Son necesarias ciertas características estructurales para que los glicósidos cardiotónicos posean actividad sobre el músculo cardiaco (ver Figura N°3) las cuales son:

- Grupo OH en posición β en C-14.
- Unión *cis* entre los anillos A y B y entre los anillos C y D.
- Unión *trans* entre los anillos B y C.
- Una lactona α, β insaturada en el C-17 β .
- Un residuo azucarado sobre el OH β de C-3.

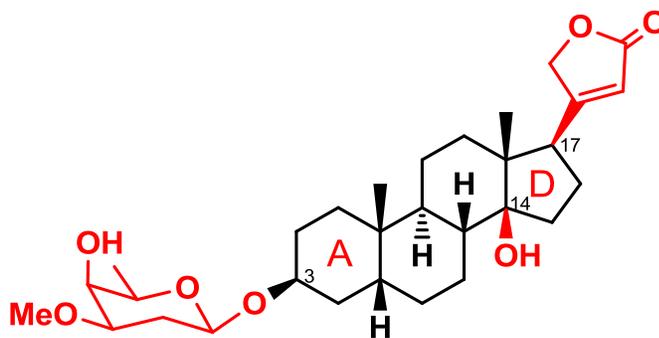


Figura N° 3. Características estructurales de los glicósidos cardiotónicos.

3.2 GENERALIDADES DE *Calotropis procera*.

3.2.1 Información Botánica

Nombre común: Huevos de toro, Matacoyote, Algodón de seda, Algodón de playa y Huevos de chucho.

Nombre Científico: *Calotropis procera*

Familia: Asclepiadaceae.

Referencia del herbario: Jardín Botánico de La Laguna, Antiguo Cuscatlán,

J. Monterrosa 1748 (LAGU), Berlín, Usulután.

3.2.2 Historia

Calotropis procera es conocida desde tiempos ancestrales por las culturas del medio oriente, atribuyéndole muchas propiedades terapéuticas, algunas de las cuales han sido estudiadas y comprobado científicamente.

Flavio Josefo, el historiador judío que vivió en la época romana, fue el primero en mencionar la así llamada manzana de Sodoma. Él describe la destrucción de Sodoma (Figura N°4), que fue borrada del mapa por Dios como castigo por los malos caminos de sus habitantes (Génesis 18:16-20). Josefo menciona que en su día los restos de la destrucción todavía pueden verse: "*sombras de las ciudades están todavía por ver, así como las cenizas que crecen en sus frutos, que los frutos tienen un color como si estaban en condiciones de ser*

consumidos, pero si las arrebatará con sus manos se disuelven en humo y ceniza". (Josefo, Guerra de los judíos, Libro IV, 8:4) ⁽¹⁰⁾. Otra referencia directa hacia la **C. procera** se puede apreciar en Deuteronomio 32:32 de la Biblia: *"Ellos son cual viñedos corruptos descendientes de Sodoma y Gomorra, que producen uvas amargas y venenosas"*.



Figura N° 4. Destrucción de Sodoma y Gomorra por Dios

En la India es mencionada en el Ayurveda ^(17, 22) (ciencia de longevidad India) como Arka, se le utiliza en el Swedan Karma como antimicrobiano, anticancerígeno, antihelmíntico y fibrinolítico, describiendo recetas precisas en

las cuales se indicaban cantidades específicas de las sustancias a utilizar (Figura N°.5).

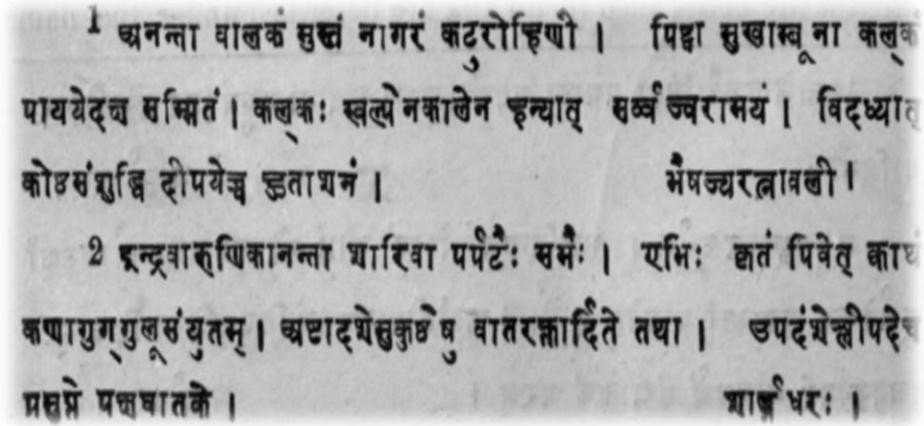


Figura N° 5. Prescripción del Ayurveda redactada en sánscrito.

3.2.3 Origen y distribución:

Es originaria de Asia y África. En el norte de África este árbol es común, llegando a formar bosquetes claros en el Sahara occidental, central y meridional. En el Valle del Sous aparecen dispersos por las partes más secas al sur del río. Actualmente se encuentra naturalizada en las islas del Caribe y áreas tropicales de América (14).

En El Salvador se encuentra ampliamente distribuida en la zona costera y otras de clima árido (Figura N° 6). Como por ejemplo, en los Departamentos de Ahuachapán, Morazán y La libertad (46).

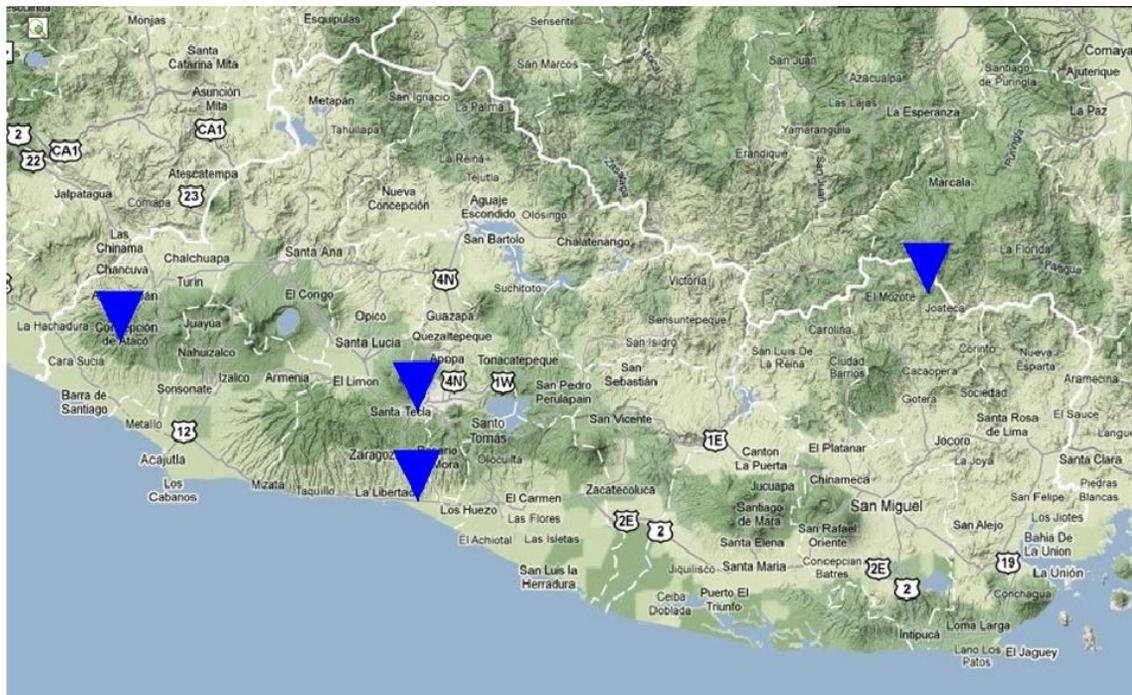


Figura N° 6. ▼ Distribución geográfica de *C. procera* en El Salvador

3.2.4 Descripción botánica:

Es un pequeño árbol perennifolio, hermafrodita de hasta 4-6 m de altura, con porte erguido (Figura N° 7). Copa más o menos redondeada, tronco bien definido, recto a un poco tortuoso, con característica corteza suberosa agrietada que recuerda a la del alcornoque, pero de color blanco. Ramas extendido-erguidas, las viejas cubiertas con la corteza suberosa blanquecina, las más jóvenes verdes, cubiertas de un denso tomento de pelos blancos (14, 25).

Hojas opuestas, sencillas grandes oval-elípticas, con ápice más o menos redondeado o agudo, generalmente acuminado y base más o menos anchamente redondeada, con el margen entero; planas, jóvenes son cubiertas de un tomento algodónoso, luego glabrescentes, de color verde intenso por el haz, con nerviación muy marcada, pubescente-puberulentas y verdoso-blanquecinas por el envés, sésiles, un poco amplexicaules, o con un pecíolo muy corto.

Inflorescencia en densas cimas axilares al final de las ramas ^(14, 25), con flores de 2-3 cm. de diámetro (Figura N° 7), con pedicelos pubescentes, blanquecinos, de unos 2 cm. de largo. Cáliz dividido hasta la base con 5 pétalos oval-trianguulares que se abren perpendicularmente, por fuera blanquecinos, por dentro con base y márgenes blanquecinos y parte media y superior purpúrea. Disco nectarífero pentagonal, blanquecino-amarillento, de sus lados nacen 5 estambres más o menos purpúreos ^(14, 25).

Fruto grande subglobuloso, floración generalmente después de las lluvias. Fructificación 1 o 2 meses después de la floración, pudiendo verse ejemplares con flores y frutos casi maduros al mismo tiempo ^(14, 25).

3.2.5 Hábitat:

Llanuras pedregosas o limoso-arenosas, en ambiente desértico y especialmente en depresiones de ríos.



Figura N° 7. Arbusto de *C. procera*, detalles de flores, frutos y semillas.

3.2.6 Composición Química:

Estudios fitoquímicos han demostrado que dentro de los compuestos que posee la *C. procera*, se encuentran: flavonoides, polifenoles, triterpenos, esteroides y glicósidos cardiotónicos ⁽¹⁹⁾.

Dentro de los terpenos aislados se encuentran: calotropterpenil, un *norditerpenil* ester y dos triterpenos pentacíclicos: acetato de calotropursenilo y acetato de calotropfriedenilo ⁽¹⁹⁾. Además se encuentran presentes los glicósidos cardiotónicos: calotropina, calactina, uscharidina, uscharina, calotoxina,

uzarigenina, proceragenina, voruscharina, siriogenina, procerocido, calotropagenina y un artefacto derivado de calotropagenina (Figura N° 8) (1, 19, 20 42, 45).

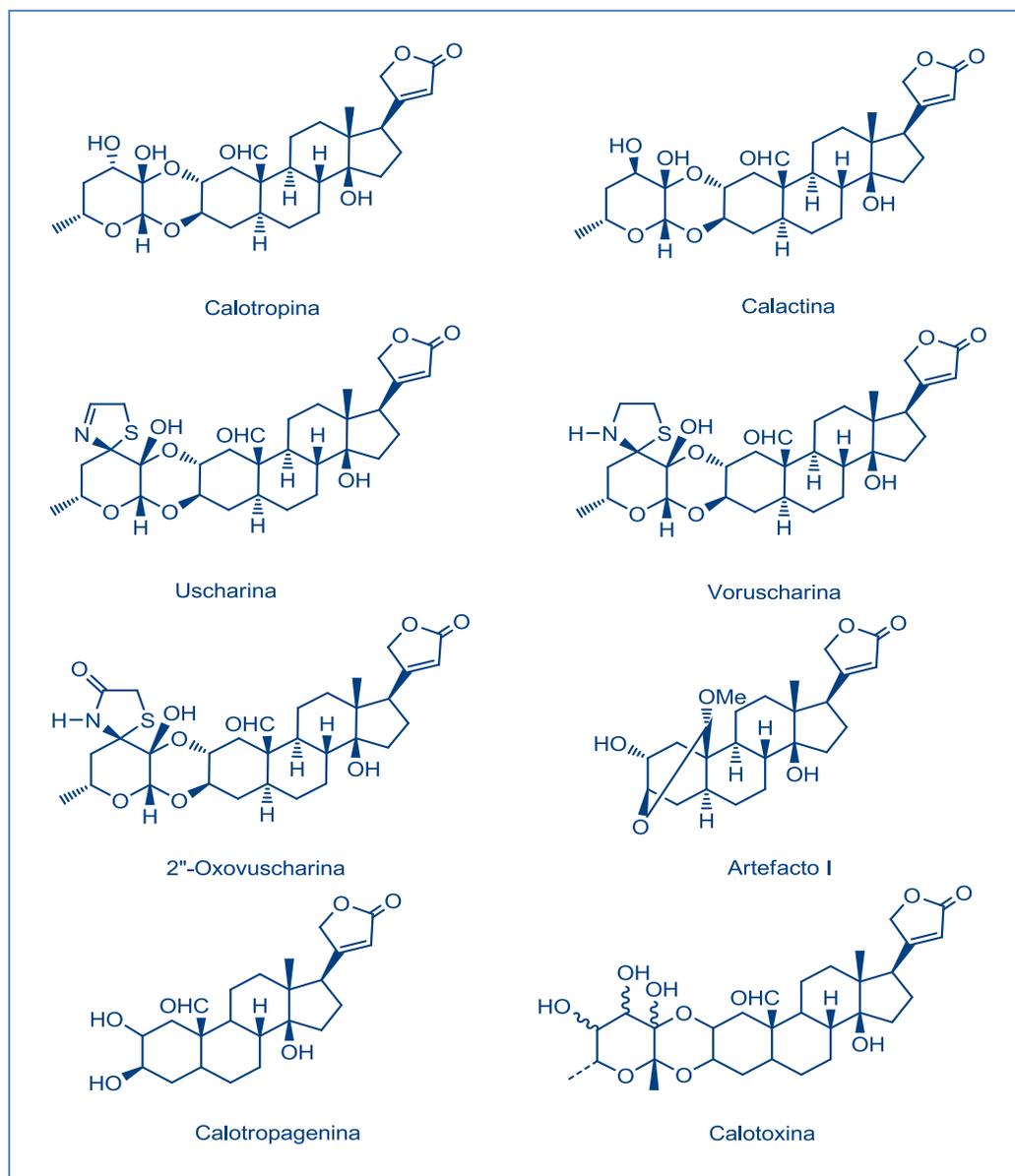


Figura N° 8. Estructuras de glicósidos cardiotónicos presentes en *Calotropis*

procera.

3.2.7 Usos etnobotánicos:

Es utilizada como ascaricida, fibrinolítico, esquizonticida, antihelmíntico, antibacterial, insecticida, antiinflamatorio, espasmolítico, larvicida, analgésico, expectorante y diaforético. Además le son atribuidos propiedades anticancerígenas y antitumorales (3, 10, 17, 21, 22, 25, 44).

Los extractos de flores presentan actividad hepatoprotectora, debidas a la presencia de flavonoides que le brindan las características antioxidantes (15,16).

El látex por sus propiedades queratolíticas es utilizado para el tratamiento de muchas afecciones de la piel, como la lepra. En algunas partes de El Salvador lo utilizan para la eliminación de verrugas, aunque esta es una propiedad no documentada. En algunas regiones de África el látex es utilizado para la producción de queso (41).

3.2.8 Toxicidad:

Sin riesgos para la salud o efectos secundarios conocidos con dosis terapéuticas adecuadas. Dosis muy altas pueden causar bradicardia seguida de convulsión, diarrea, vómitos y hasta la muerte (10, 22).

El contacto del látex en los ojos puede causar fotofobia, perdida de la agudeza visual, congestión en la conjuntiva y edema corneal de leve a severo (43). En

personas con sensibilidad, el látex puede ocasionar enrojecimiento de la piel y la aparición de sarpullido ⁽¹⁴⁾.

3.3 GENERALIDADES DEL CANCER.

El cáncer es un término genérico, que define un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Otros términos utilizados son neoplasias y tumores malignos. Una de las características que define el cáncer es la generación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos en un proceso que da lugar a la formación de las llamadas metástasis.

Existen numerosos tipos cánceres, entre los que destacan 3 subtipos principales:

- En primer lugar hay que mencionar los sarcomas, que proceden del tejido conjuntivo presente en los huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo.
- El segundo tipo lo constituyen los carcinomas que surgen en los tejidos epiteliales como la piel o las mucosas que tapizan las cavidades y órganos corporales como el sistema respiratorio o digestivo o en los tejidos glandulares de la mama y la próstata. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes, como el cáncer de pulmón, el

de colon o el de mama. Los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas. Los que tienen una estructura glandular que se denominan adenocarcinoma.

- En el tercer subtipo se encuentran las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres que se originan en los tejidos formadores de las células sanguíneas. Pueden producir una inflamación de los ganglios linfáticos (adenopatías), aumento de tamaño del bazo (esplenomegalia) o invasión y destrucción de la médula ósea, así como una producción excesiva de leucocitos o linfocitos inmaduros. Estos factores ayudan a su clasificación (6, 8, 35).

En la actualidad los tipos de cáncer reportados con mayor incidencia son:

Cáncer de cuello uterino: es una enfermedad muy común en las mujeres; es conocida también como cáncer cervical o carcinoma del cuello uterino.

Es una neoplasia maligna epitelial que se origina en el cuello uterino a expensas del epitelio escamoso y glandular.

El cáncer del cuello uterino es la segunda causa de muerte en nuestro país, las mujeres más afectadas fluctúan entre los 30 a 54 años, sin embargo también se presentan casos en menor rango en las mujeres de 20 a 24 años. Sus factores más frecuentes es el inicio de las relaciones sexuales a temprana edad, tener

antecedentes familiares y por infección con el virus del papiloma humano (VPH)

(6).

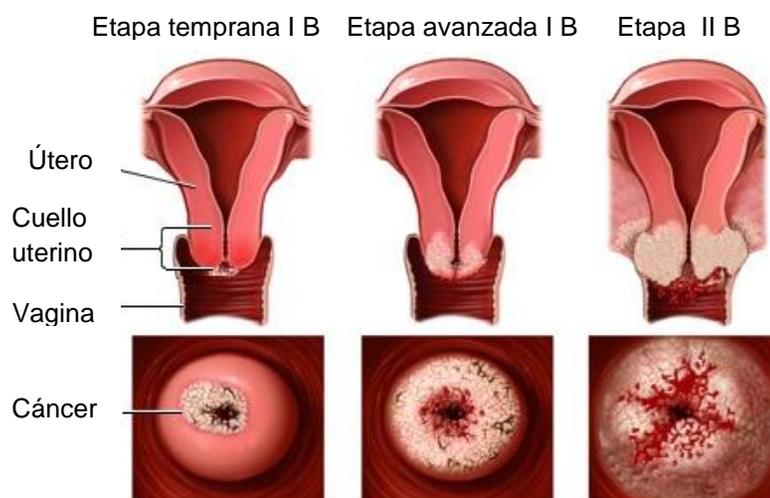


Figura N°9. Etapas del cáncer uterino.

Este cáncer en su primera fase no presenta síntomas pero conforme avanza presenta sangrado vaginal anormal, flujo anormal de olor fétido, pérdida de peso. Para poder diagnosticar este cáncer se debe realizar la Prueba de Papanicolau, la cual consiste en tomar células de la superficie del cuello uterino; se utiliza un trozo de algodón, un cepillo o una paleta de madera para raspar suavemente las células del cuello uterino y luego estas células son examinadas a través del microscopio para determinar si son anormales.

Cáncer de mama (seno): Es una neoplasia maligna que tiene su origen en la proliferación acelerada e incontrolada de células que tapizan en un 90% de los casos el interior de los conductos que durante la lactancia llevan la leche desde

los acinos glandulares donde se produce hasta los conductos galatóforos, situados detrás de la areola y el pezón, donde se acumula en espera de salir al exterior. Este cáncer de mama se conoce como carcinoma ductal. En el 10% de los casos restantes el cáncer tiene su origen en los propios acinos glandulares y se le llama carcinoma lobulillar. El carcinoma ductal puede extenderse por el interior de la luz ductal e invadir el interior de los acinos en lo que se conoce como fenómeno de cancerización lobular.

Muchos cánceres de mama se encuentran confinados en la luz de los ductos o de los acinos, sin invadir los tejidos vecinos. En ese caso reciben el nombre de carcinomas *in situ*. Cuando proliferan demasiado pueden romper la llamada membrana basal y extenderse infiltrando los tejidos que rodean a ductos y acinos y entonces reciben nombres como carcinoma ductal infiltrante o carcinoma lobulillar infiltrante. Los carcinomas de mama *in situ* son potencialmente curables si se extirpan en su totalidad.



Figura N°10. Diagrama esquemático de un seno (sección de una mujer adulta)

El nombre de carcinoma hace referencia a la naturaleza epitelial de las células que se convierten en malignas. En realidad, en sentido estricto, los llamados carcinomas de mama son adenocarcinomas, ya que derivan de células de estirpe glandular (de glándulas de secreción externa). Sin embargo, las glándulas de secreción externa derivan de células de estirpe epitelial, de manera que el nombre de carcinoma que se aplica a estos tumores suele aceptarse como correcto aunque no sea exacto. En casos verdaderamente raros hay cánceres escamosos de mama que podrían ser llamados más precisamente carcinomas. Estos tumores escamosos, verdaderos carcinomas estrictos, son consecuencia de la metaplasia de células de origen glandular.

Existen tumores malignos de mama que no son de estirpe glandular ni epitelial. Estos tumores, poco frecuentes, reciben otros nombres genéricos diferentes. Los sarcomas son producto de la transformación maligna de células del tejido conectivo de la mama. Los linfomas derivan de los linfocitos, un tipo de glóbulos blancos que procede de los ganglios linfáticos. En general, los linfomas no son tumores raros, pero es raro que un linfoma tenga su lugar de origen en una mama y no en otras regiones del organismo.

Los carcinomas de mama pueden presentarse a casi cualquier edad de la vida pero son más frecuentes en las mujeres de más edad. Suelen escasear en las mujeres menores de cuarenta años y son raros en las menores de treinta ⁽⁶⁾.

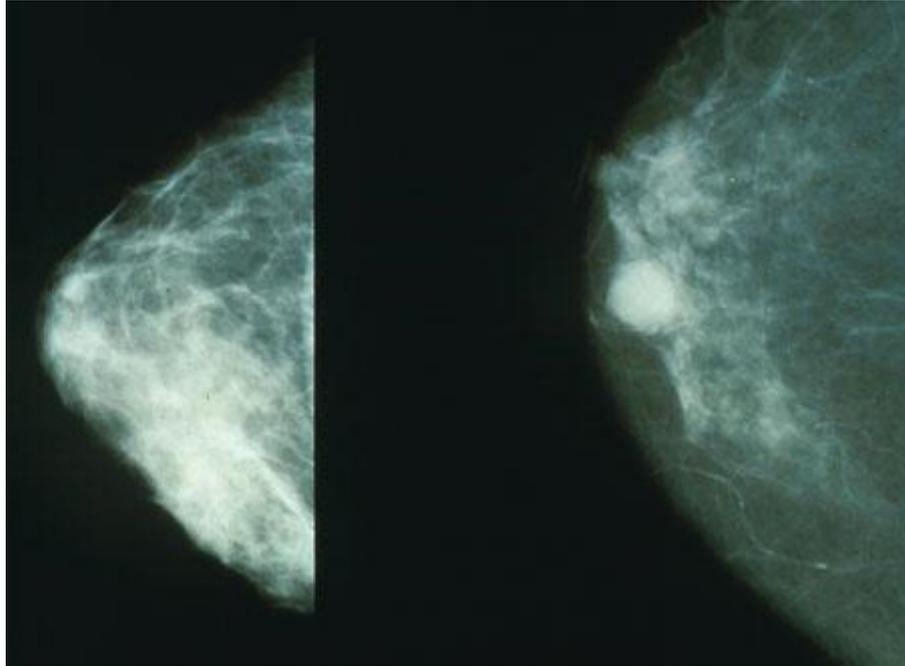


Figura N°11. Mamografías mostrando una mama normal (izq.) y una con cáncer (der.)

Cáncer de pulmón: es la enfermedad resultante del crecimiento anormal de células en el tejido pulmonar. Proveniente de células epiteliales, este crecimiento generalmente maligno, puede derivar en metástasis e infiltración a otros tejidos del cuerpo.

Los síntomas más frecuentes suelen ser dificultad respiratoria, tos (incluyendo tos sanguinolenta) y pérdida de peso, así como también dolor torácico, ronquera e hinchazón en cuello y cara.

El cáncer de pulmón es clasificado en dos tipos principales, en función del tamaño y apariencia de la células malignas: el cáncer pulmonar de células pequeñas (microcítico) y el de células no pequeñas (no microcítico).

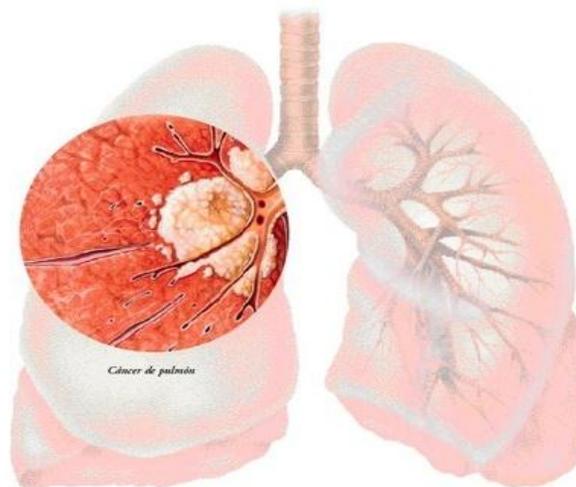


Figura N°12. Esquema de pulmón, detalle de tejido canceroso.

Esta distinción condiciona el tratamiento y así, mientras el primero por lo general, es tratado con quimioterapia y radiación, el segundo tiende a ser tratado, además, mediante cirugía, láser y terapia fotodinámica.

La causa más común de cáncer de pulmón es el tabaquismo, siendo el 95 % de los pacientes con cáncer de pulmón fumadores y ex-fumadores. En las personas no-fumadoras, la aparición del cáncer de pulmón es resultado de una combinación de factores genéticos, gas radón, asbesto y contaminación atmosférica, incluyendo humo secundario (fumadores pasivos). El diagnóstico

temprano del cáncer de pulmón es el principal condicionante para el éxito en su tratamiento.

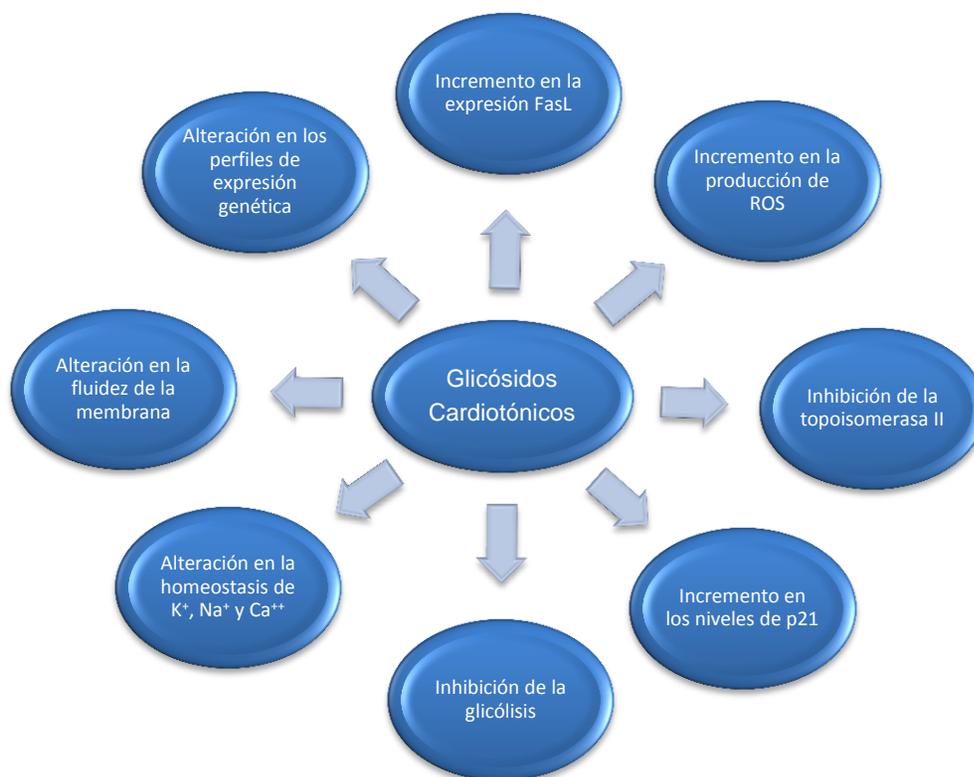
En estadios tempranos, el cáncer de pulmón puede, en alrededor del 20% de los casos, ser tratado mediante resección quirúrgica con éxito de curación. Sin embargo, debido a su virulencia y a la dificultad para su detección precoz, en la mayoría de los casos de diagnóstico donde ya ocurre metástasis, el cáncer de pulmón presenta, junto con el cáncer de hígado, páncreas y esófago, los peores pronósticos, con una esperanza de vida promedio de aproximadamente 8 meses.

3.3.1 Actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos.

La continúa eficacia de glicósidos cardiotónicos, los han convertido en medicamentos de elección para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva y como agentes antiarrítmicos. Sin embargo, es menos conocido, el papel emergente de esta categoría de compuestos en la prevención y/o tratamiento de enfermedades proliferativas como el cáncer ⁽³⁴⁾. Nuevos hallazgos dentro de los últimos cinco años han revelado que estos compuestos participan en los mecanismos de transducción de señal celular compleja, resultando en control selectivo de tumores humanos pero no en la proliferación celular normal.

El uso potencial de compuestos como los cardenólidos para el tratamiento del cáncer, fue inicialmente investigado hace cuarenta años, pero se abandonó debido a la toxicidad de estos compuestos; ya que los agentes quimioterápicos aceptables deben actuar con una cierta especificidad que permita una ventana terapéutica, es decir, una situación en que la dosis empleada suponga más beneficio que los efectos secundarios tóxicos. Así, el ensayo inicial más común de la actividad anticancerígena de un compuesto o extracto es su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales en cultivos (34, 40, 51).

Los mecanismos moleculares dependientes del aumento de la susceptibilidad de las células cancerígenas a los glicósidos cardiotónicos no son todavía totalmente elucidados (37); posibles mecanismos se resumen en la figura número 13.



FasL: ligandos Fas.

p21: inhibidores 1A dependientes

ROS: especies reactivas al oxígeno.

de la ciclinquinasa.

Figura N° 13. Posibles mecanismos de acción de los glicósidos cardiotónicos

Muchos estudios realizados han demostrado que los glicósidos cardiotónicos son una propuesta viable para el tratamiento de diversas líneas celulares cancerígenas ⁽³⁵⁾. Cada día se ve engrosada la lista de especies vegetales que producen glicósidos cardiotónicos y que poseen actividad citotóxica *in vitro* comprobada, en la siguiente tabla se presenta un resumen de los compuestos aislados y ensayados en las últimas décadas. (Ver Cuadro N° 1 ⁽³⁵⁾)

Cuadro N° 1. Resumen de los estudios realizados de las últimas décadas sobre Glicósidos Cardiotónicos con actividad citotóxica.

Especies	Glicósido Cardíaco (s)	Efecto Citotóxico <i>In Vitro</i>
<p><i>Apocynum cannabinum</i> (Apocynaceae)</p>	<p>Apocannosido y cymarina</p>	<p>Carcinoma de la nasofaringe humana (KB)</p>
<p><i>Asclepias curassavica</i> (Asclepiadaceae)</p>	<p>Calotropina, 16α-acetoxicalotropina, 15β-hidroxicalotropina, calactina, 15β-hidroxicalactina, asclepina, 16α-hidroxiasclepina, uscharidina, uscharina y uzarigenina</p>	<p>Carcinoma de pulmón humano (A549), carcinomas de seno (MCF-7 y MDA-MB-231) y hepatoma (HepG2)</p>
<p><i>Beaumontia breviflora</i> (Apocynaceae)</p>	<p>Digitoxigenina, oleandrigenina, α-l-cymarosido, digitoxigenina β-gentiobiosil-α-l-cymarosido, Δ^{16}-digitoxigenina y β-d-glucosil-α-l-cymarosido</p>	<p>Carcinoma de seno humano (BC1), carcinoma de colon (Col2), fibrosarcoma (HT-1080), carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma nasofaríngeo vinblastina-resistente (KB-V1), carcinoma de pulmón</p>

Cuadro N° 1 (Continuación)

Especies	Glicósido Cardiaco (s)	Efecto Citotóxico <i>In Vitro</i>
<p><i>Cerbera odollam</i> (Apocynaceae)</p>	<p>2'-O-Aceti cerleasido A, 17α-neriifolina, 17β-neriifolina y cerberina</p>	<p>Carcinoma epidermoide oral humano (KB) y carcinoma de seno (BC)</p>
<p><i>Coronilla varia</i> (Fabaceae)</p>	<p>Hyrmanosido</p>	<p>Leucemia linfocitica humana (P-388) y carcinomas de nasofaringe (9KB)</p>
<p><i>Digitalis purpurea</i> (Scrophulariaceae)</p> <p><i>Digitalis lanata</i> (Scrophulariaceae)</p>	<p>Digoxina, digitoxina y gitoxina</p>	<p>Carcinomas de próstata humanos (LNCaP, DU145, PC3), adenocarcinoma renal (TK-10), adenocarcinoma de seno (MCF-7), melanoma maligno (UACC-62) y leucemia mielógena crónica (K-562)</p>
<p><i>Elaeodendron sp.</i></p>	<p>Elaeodendrosidos</p>	<p>Carcinoma de ovario humano (A2780)</p>

Cuadro N° 1 (Continuación)

Especies	Glicósido Cardíaco (s)	Efecto Citotóxico <i>In Vitro</i>
<p><i>Euonymus sieboldianus</i> (Celastraceae)</p>	<p>Euonymosido A</p>	<p>Carcinoma de pulmón humano (A549) y adenocarcinoma de ovario (SK-OV-3)</p>
<p><i>Maquira calophylla</i> (Moraceae)</p>	<p>Maquirosido A</p>	<p>Carcinoma epidermoide oral humano (KB)</p>
<p><i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae)</p>	<p>Oleander, oleandrina, cardenolido N-1, cardenolido N-4, 3β-O-(β-d-sarmentosil)-16β-acetoxi-14-hidroxi-5β,14β-card-20-(22)-enolido y 16β-acetoxi-3β,14-dihidroxi-5β,14β-card-20-(22)-enolido</p>	<p>Leucemia de linfocitos T (células Jurkat), linfoma histiocítico (U-937), carcinoma cervical (Hela), carcinoma de seno (MCF-7), carcinomas de próstata (LNCap, DU145,PC3), fibroblastoma malignano (VA-13) y carcinoma de hígado (HepG2)</p>

Cuadro N° 1 (Continuación)

Especies	Glicósido Cardíaco (s)	Efecto Citotóxico <i>In Vitro</i>
<i>Ornithogalum umbellatum</i> (Hyacinthaceae)	Convallatoxina	Carcinoma epidermoide oral humano (KB)
<i>Periploca graeca</i> (Asclepiadaceae)	Isómeros de la Periplocina	Carcinoma de próstata humano (PC-3)
<i>Rhodea japonica</i> (Liliaceae)	Rhodexina A	Leucemia humana (K562)
<i>Streblus asper</i> (Moraceae)	Steblosido y mansonina	Carcinoma epidermoide oral humano (KB)

Cuadro N° 1 (Continuación)

Especies	Glicósido Cardíaco (s)	Efecto Citotóxico <i>In Vitro</i>
<p><i>Streptocaulon griffithii</i> (Asclepiadaceae)</p>	<p>3-O-(β-glucopiranosil)acovenosigenina A</p>	<p>Cáncer gastrointestinal humano (HCG-27), carcinoma de pulmón (A549), carcinoma de seno (MCF-7) y carcinoma cervical (HeLa)</p>
<p><i>Thevetia peruviana.</i> (Apocynaceae)</p>	<p>Thevetina A , thevetina B y thevetosido</p>	<p>Hepatoma humano (SMMC-7721), carcinoma gástrico (SGC-7901) y carcinoma cervical (HeLa)</p>
<p><i>Urginea maritime</i> (Liliaceae)</p>	<p>Proscillaridina A y scillaren A</p>	<p>Carcinoma de seno humano (MCF-7)</p>

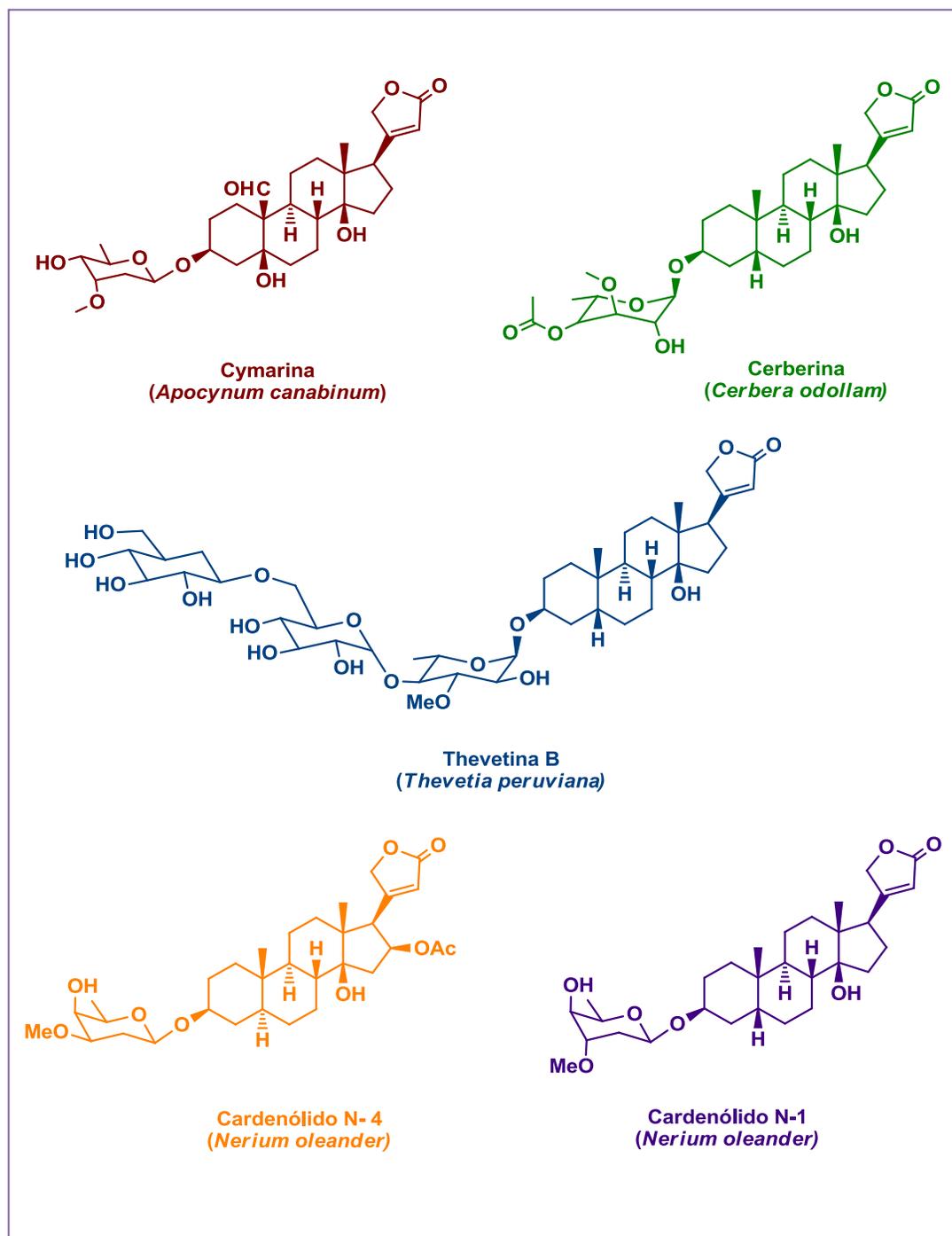


Figura N°14. Estructura de cardenólidos que presentan actividad citotóxica *in vitro*.

3.4 GENERALIDADES SOBRE METODOS PARA LA DETERMINACION DE CITOTOXICIDAD.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático ^(2,39).

Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales: ser simple, rápida, eficiente, económica, reproducible, sensible, segura, efectiva en la medida de la población celular viable y, que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar. Más aun: si el método es aplicable a técnicas de barrido o tamizaje de alta eficiencia (HTS) y las células pueden ser usadas para más experimentos se

habrá adquirido una herramienta excepcional. Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Primero, el uso de colorantes tales como cristal violeta y sulforrodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. Segundo, los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa, y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y (2-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido) (XTT), los cuales al ser reducidos a formazan producen una intensa coloración ^(2,39).

El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT). Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazan (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa ^(2,39).

Las células deben ser conservadas en condiciones de esterilidad en N₂ líquido (-190 °C). El período de exposición de la sustancia de ensayo varia puede ser durante períodos cortos (1-2 h de tratamiento), o largos de 24 ó 72 h. Se debe medir la densidad óptica (D.O) al concluir el tiempo de incubación 550 nm utilizando un filtro de 620 nm como referencia. Por lo general se deben realizar al menos 3 réplicas de cada concentración que se evalúa. Se deben evaluar hasta 6 concentraciones del compuesto, alcanzando una concentración de 1000 µg/mL o hasta el límite máximo de solubilidad del producto en el medio.

Si es alcanzada esta concentración y no se observa toxicidad, entonces resulta necesario aumentar el rango de concentraciones hasta 100 000 µg/mL o hasta la máxima concentración soluble del compuesto en el medio. Es necesario tener en cuenta que si el producto que se evalúa precipita en el medio de cultivo, estos resultados deben ser descartados. Debe utilizarse en el ensayo un control de medio, un control de solvente y es recomendable un control positivo como

por ejemplo la **línea celular Vero**, la cual se deriva de las células epiteliales del riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (2,39).

Análisis de los resultados.

Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% = \frac{\text{D.O. de las células tratadas}}{\text{D.O. de las células controles}} \times 100$$

La curva dosis respuesta debe ser calculada teniendo en cuenta el rango de concentración utilizado y el porcentaje de reducción del crecimiento celular correspondiente. A partir de ello se calcula la concentración que produce la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

3.5 GENERALIDADES DE METODOS DE EXTRACCION, FRACCIONAMIENTO Y SEPARACION DE PRODUCTOS NATURALES.

El estudio de los productos naturales inician con la selección del material vegetal a estudiar, para ello se toman diversos tipos de criterios, entre ellos:

- Por sus usos tradicionales.
- Composición química.
- La búsqueda de una actividad biológica concreta.
- Estudios de plantas venenosas.
- Basada en la combinación de criterios.
- Selección arbitraria

Existen varias posibilidades para la obtención de principios activos a partir de la droga o de precursores de origen natural, entre los cuales tenemos:

1. Métodos extractivos a partir de la droga.
2. Métodos hemisintéticos o semisintéticos.
3. Métodos biotecnológicos (24, 50).

Con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción y la reproducibilidad de la misma hay que someter el material vegetal en estudio a una serie de operaciones preliminares, como son:

- a) Identificación botánica del material: género, especie, origen, etc.
- b) Selección de la parte vegetal a extraer: hojas, raíces, flores, semillas, etc.
- c) Inactivación de los sistemas enzimáticos del vegetal cuando se trabaja con materiales frescos (hojas y flores), es decir recién recolectados. Así se asegura su integridad evitando procesos de degradación que conlleve a la alteración de los principios.
- d) Desecación de las plantas bajo condiciones controladas para evitar la transformación química de los componentes. El proceso debe de ser rápido, con temperatura moderada y preferiblemente con aire caliente (24, 50).

3.5.1 MÉTODOS EXTRACTIVOS A PARTIR DE LA DROGA.

Se fracciona la droga y se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos. Existen varios métodos, los cuales son:

- Extracción mecánica: es una técnica que permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugos.

- Extracción con disolvente: consiste en colocar la droga con un disolvente capaz de extraer los metabolitos secundarios. Donde los metabolitos secundarios deben de pasar de la droga al disolvente de manera que se obtengan un extracto líquido, que posteriormente se pueden concentrar eliminando la mayor o menor cantidad de disolvente (24, 50).

Para que la extracción con disolventes se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores:

1. Característica de la droga:

- Drogas deseadas y molidas para facilitar el máximo contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente (24, 50).

2. Naturaleza del disolvente:

- Principalmente se utilizan extracciones en mezclas hidroalcohólicas (agua y etanol, considerados como solventes universales).
- Se puede utilizar otros solventes orgánicos como: *n*-hexano, éter etílico, éter de petróleo, metanol, propilenglicol, etc.

- Muchos metabolitos secundarios se hidrolizan en agua, además que los extractos ácidos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados (24, 50).

3. Temperatura:

- El aumento de la temperatura favorece la extracción de los metabolitos secundarios (hay que tener precaución con los metabolitos que sean termolábiles).

4. Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente:

- Depende de las características de la droga (dureza, grado de división, etc.) y de la naturaleza de los metabolitos secundarios (volátiles, hidrolizables, oxidables, etc.).

5. Control de difusión celular:

- Una correcta difusión se consigue cuando la droga ofrece un grado de división adecuado (mayor superficie de difusión) y cuando se renueva correctamente el disolvente, se produce una difusión de los metabolitos secundarios de la droga hacia el disolvente (difusión pasiva) (24, 50).

Extracción discontinua:

Extracción simple o maceración:

- Se deja el material vegetal en contacto con el disolvente a temperatura ambiente.
- Se puede reemplazar el disolvente por volúmenes frescos.
- Ventajas: la muestra no entra en contacto con el calor, el extracto puede permanecer sin contaminación microbiana (excepto cuando se utiliza agua).
- Desventajas: proceso lento, no se consigue agotamiento total de la muestra y se emplean grandes volúmenes de disolvente (24, 50).



Figura N° 16. Proceso de maceración de raíces de *Ambrosia cumanensis*.

Destilación:

- Es una técnica que se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga, lo cual permite la separación de componentes volátiles. Se suelen hacer extracciones por arrastre de vapor o hidrodestilación que facilitan la extracción de los principios activos volátiles (24, 50).

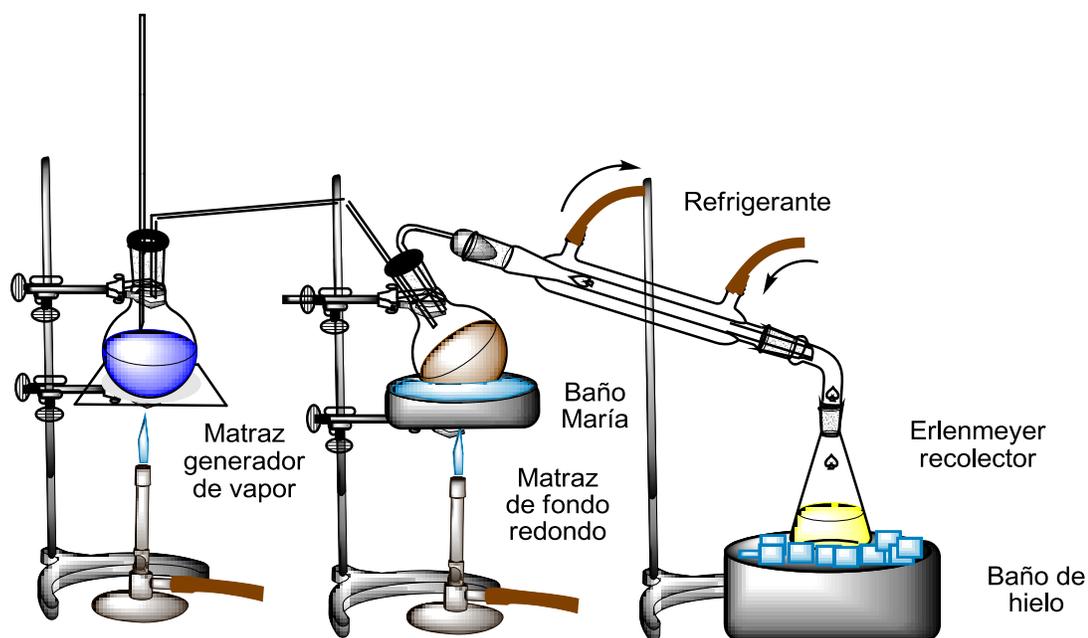


Figura N° 17. Aparato de destilación de arrastre por vapor.

Digestión:

- Es un método extractivo similar a la maceración pero que se trabaja a temperaturas más elevadas en el cual se usa baño de María (no llegando a temperatura de ebullición) (24, 50).

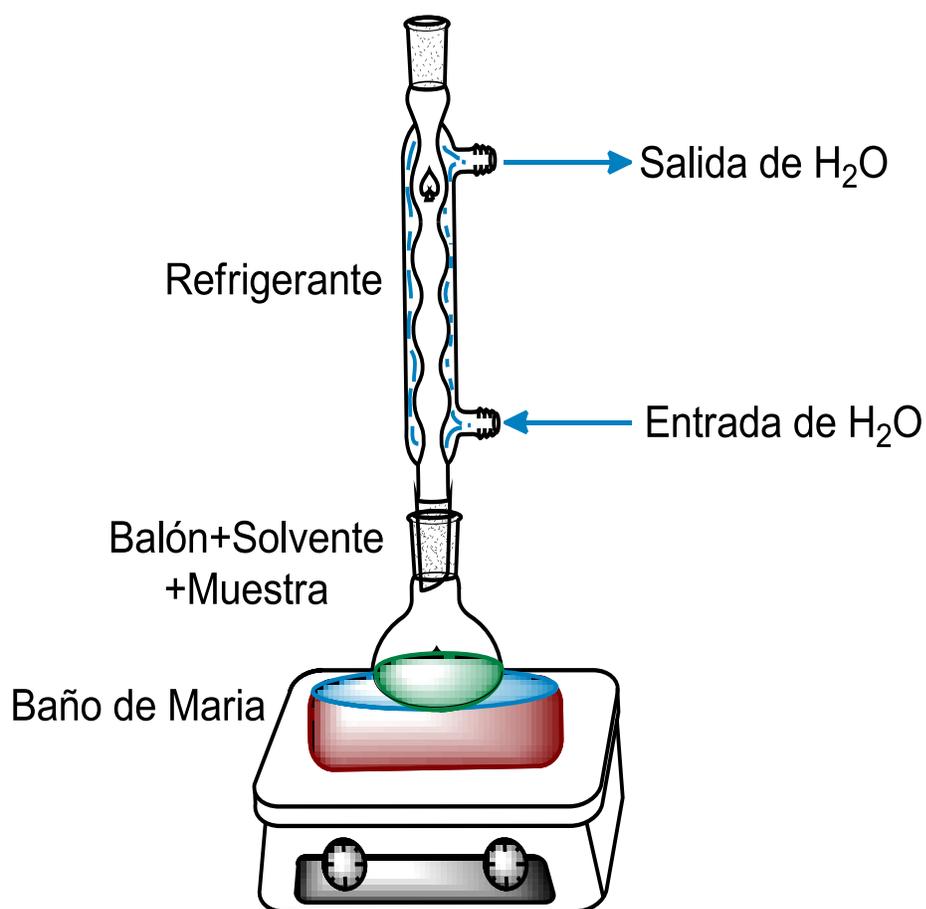


Figura N° 18. Esquema de un equipo para digestión.

Reflujo:

- Es un método de extracción, donde la sustancia se coloca en un balón y se trabaja a temperaturas de ebullición. La muestra entra en contacto directo con la fuente de calor.



Figura N°19. Aparato de reflujo.

Infusión:

- Se trabaja con un disolvente (agua). Primero se introduce la droga, luego se humedece con agua fría y a continuación se le agrega agua próxima a ebullición, para finalizar se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente.

Decocción:

- La droga se pone en contacto con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva hasta la temperatura de ebullición, manteniendo dicha ebullición durante unos 10-30 minutos, una vez enfriado, se filtra.
- Se aplica generalmente a drogas duras (corteza, raíces, semillas, etc.) en las que resulta difícil el contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente debido a sus características histológicas.

Tanto en las infusiones como en las decocciones se utiliza como disolventes siempre el agua por lo que no resultaran métodos adecuados para extraer metabolitos secundarios activos hidrolizables. También hay que tomar en cuenta la poca estabilidad en el tiempo de los extractos acuosos, de ahí la conveniencia de preparar las infusiones y las decocciones en el momento en que se van a utilizar (24, 50).

Extracción continua:

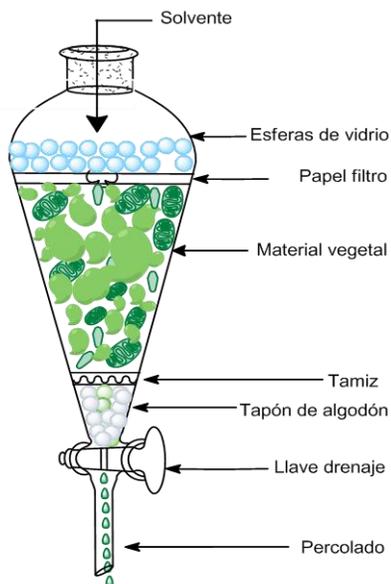


Figura N° 20 Aparato de percolación

Percolación:

- Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente.
- El disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal, el cual es recogido por la parte inferior del percolador.
- Se puede llegar a la extracción completa de los metabolitos secundarios con el inconveniente del empleo y acumulación de grandes cantidades de disolvente (22, 44).

Soxhlet:

- Consta de tres partes: matraz o balón, cuerpo extractor y refrigerante.
- Ventajas: se utilizan volúmenes de disolventes menores, extracciones exhaustivas y tiempos más cortos de extracción.
- Inconvenientes: degradación térmica y uso de disolventes de bajo punto de ebullición (24, 50).

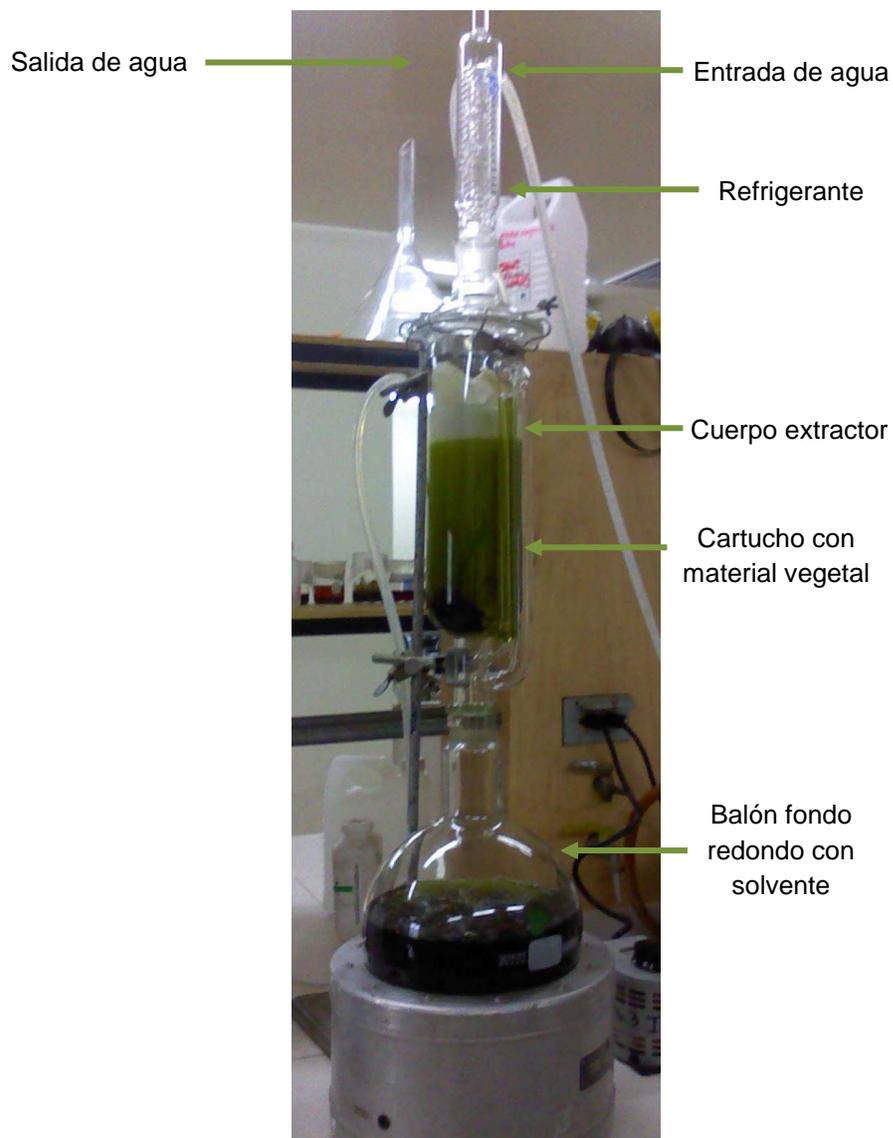


Figura N° 21. Extractor soxhlet.

Antes de fraccionar el extracto debemos de eliminar las sustancias no deseadas, que interfieran en el proceso de separación de la sustancia de interés; pueden ser sustancias tipo ceras, clorofilas, polifenoles, taninos, etc. (24, 50).

3.5.2 GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- a) Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original ⁽⁴⁰⁾.

La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación ⁽⁵⁰⁾.

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.

- a) Dependiendo de la naturaleza de la fase móvil y la estacionaria se clasifican:

1. Cromatografía sólido-líquido: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
2. Cromatografía líquido-líquido: la fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil es un líquido.
3. Cromatografía líquido-gas: la fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil es un gas.
4. Cromatografía sólido-gas: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas
(40).

b) Clasificación según el mecanismo de separación:

1. Cromatografía de adsorción: la separación se basa fundamentalmente en las distintas afinidades de adsorción de los componentes de la muestra hacia la superficie de un sólido activo.
2. Cromatografía de reparto: la separación se basa fundamentalmente en las diferencias de solubilidad de los componentes de la muestra en la fase estacionaria o en las diferencias de solubilidad de los componentes en la fase móvil y en la estacionaria.
3. Cromatografía de intercambio iónico: la separación se basa fundamentalmente en la distinta susceptibilidad para el intercambio de iones de los componentes de la muestra.

4. Cromatografía de exclusión: la separación se basa en los efectos de exclusión tales como diferencias en el tamaño de las moléculas, en su forma o en su carga ⁽⁵⁰⁾.
5. Cromatografía de afinidad: la separación se basa en una interacción biológica específica entre el analito y la fase.
6. Cromatografía de capa fina: la separación se basa en una capa de adsorbente de espesor uniforme que se deposita sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico.
7. Cromatografía en columna: la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil es forzada a pasar a través del tubo bajo presión o por gravedad ⁽⁵⁰⁾.

3.5.2.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF).

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un adsorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

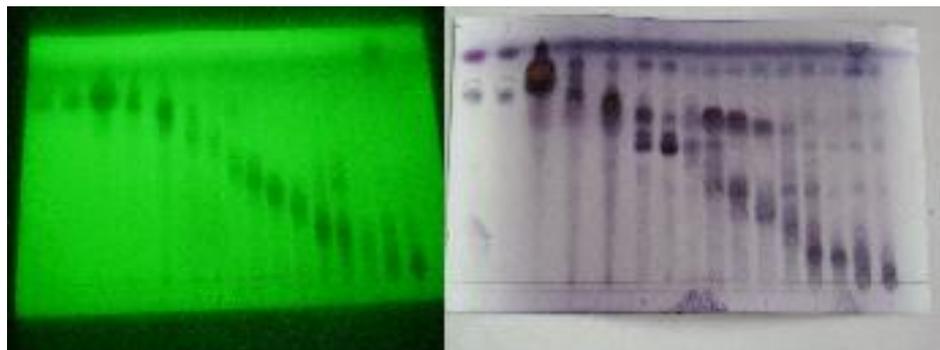
La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos

polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas. La placa se coloca en una lámpara de luz UV, con el objetivo de determinar los grupos cromóforos presentes en las manchas. Se procede luego a marcar con un lápiz el contorno de las manchas observadas, en caso contrario, utilizar un agente revelador ⁽²⁹⁾.



Figura N° 22 Cámara de separación de cromatografía en capa fina.



(a)

(b)

Figura N° 23. (a): Cromatografía de capa fina vista en cámara de luz UV a una longitud de onda de 254 nm. (b): Cromatografía en capa fina revelada.

3.6 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Cuando se pretenda conocer la composición química de las fracciones procedentes de la separación de una especie vegetal, se recurre a técnicas espectroscópicas, que se describen a continuación:

3.6.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (I.R).

Las bandas que se observan en los espectros de infrarrojo ($4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$), se relacionan con el cambio de los estados vibracionales de los enlaces presentes en la molécula ⁽²⁹⁾.

La posición e intensidad de las bandas correspondientes a un grupo funcional, que generalmente aparecen distribuidas en varias zonas más o menos constantes del espectro, son muy poco afectadas por el resto de la molécula, por lo tanto el análisis del espectro ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula, tales como: -OH, -NH, -CO-, etc., así como del carácter alifático o/y aromático del compuesto ⁽²⁹⁾.

La región comprendida entre 1350 y 900 cm^{-1} representa la “huella dactilar” de la molécula, pues las bandas de esa región corresponden a las vibraciones y rotaciones del esqueleto carbonado y por lo tanto son muy sensibles a los diferentes arreglos moleculares, aun para sustancias muy similares. Por esta razón esta zona debe considerarse cuidadosamente al establecer la identidad de dos muestras por comparación de sus espectros de IR ⁽²⁹⁾.

Las regiones en infrarrojo donde más frecuentemente se encuentran los glicósidos cardiotónicos van de 3600 a 3400 cm^{-1} para el grupo OH de C-14 y los OH de los azucres, además estos presentan una absorción típica entre 1050-980 cm^{-1} . Se encuentran señales a 2980 - 2850 cm^{-1} de CH_3 , CH_2 y una señal a 3060 cm^{-1} de protón vinílico. Los cardenólidos exhiben una absorción a 1725 - 1715 a 1780 cm^{-1} y un estiramiento de $\text{C}=\text{C}$ de 1740 a 1780 cm^{-1} para la γ lactona α, β insaturada, según reportes científicos (24, 27, 28, 49).

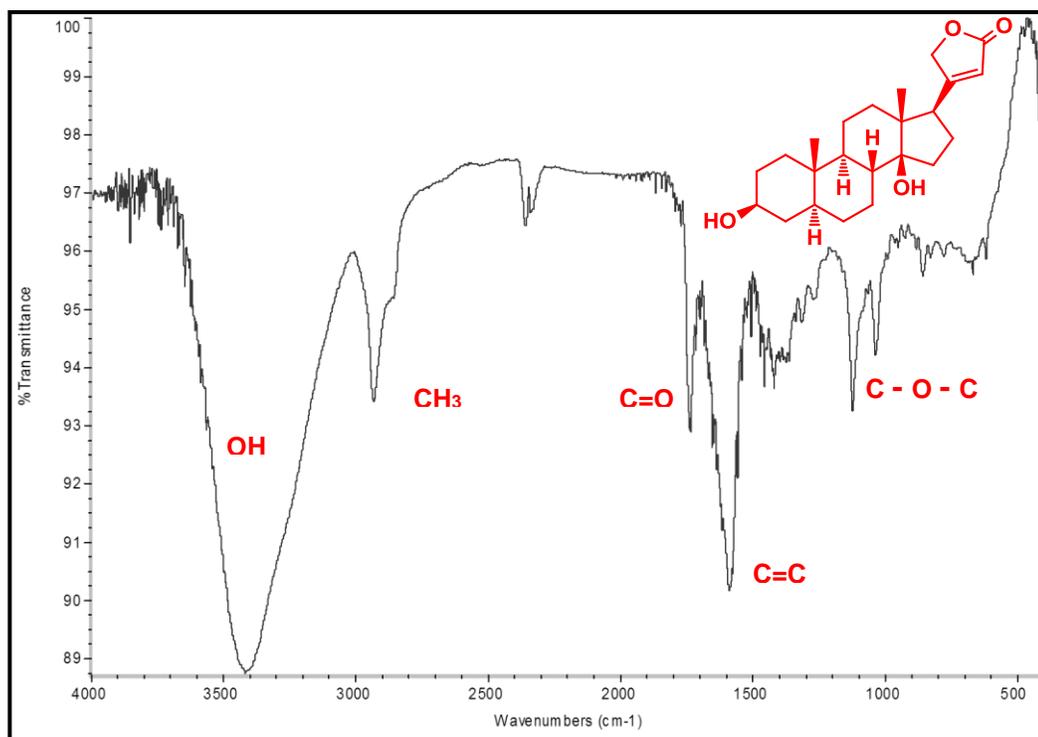


Figura N°24. Espectro IR de la digitoxigenina (4).

3.6.2 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS)

La espectroscopía UV-VIS permite determinar la absorción de luz en una muestra. Cuando la radiación incide sobre una sustancia, no toda ella se ve afectada por la misma, al átomo o conjunto de átomos que absorben radiación se le denominaba cromóforo. En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo, se denominaban a tales grupos auxocromos ⁽²⁹⁾.

La absorción de la energía se registra de 190 a 380 nm para la región ultravioleta y de 380 a 700 nm para la región visible ⁽²⁷⁾; particularmente los glicósidos cardiotónicos absorben entre los 200 a 300 nm (ϵ 5000 -10000) ^(34, 49, 40,51).

En contraste con las técnicas RMN e IR, las señales en el espectro UV son muy anchas debido a los múltiples cambios de estados vibracionales y rotacionales que acompañan a las transiciones electrónicas.

Para que se observe una absorción máxima debe existir en la molécula un cromóforo (aquellos grupos funcionales que sin unión o conjugación con otros grupos, muestran absorción electrónica en la región del visible y ultravioleta), de esta manera la técnica permite detectar la presencia de un determinado

cromóforo el cual origina prácticamente el mismo patrón espectral, independientemente de la estructura total de la molécula (29).

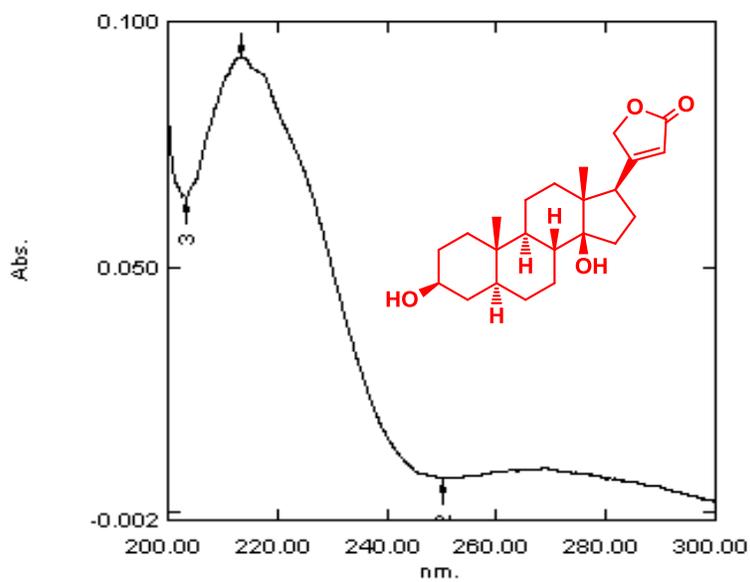


Figura N° 25. Espectro ultravioleta de la digitoxigenina (4).

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La presente investigación se puede catalogar como un estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, pues es basada en estudios realizados anteriormente y a la vez se propone una nueva alternativa mediante datos obtenidos experimentalmente, además es hipotético-deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular la siguiente hipótesis:

- Las fracciones procedentes de los extractos hidroalcohólicos de las flores, epicarpo y las semillas de los frutos de ***Calotropis procera***, poseen actividad citotóxica frente al carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón y adenocarcinoma humano de mama.

La investigación del presente estudio se divide en tres etapas:

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, manuales etc. En la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador y en biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia- Biología, de la Universidad Alberto Masferrer.
- Revistas científicas, ej: *Journal of Natural Products*, *Journal of Organic Chemistry*, *Phytochemistry*, entre otras.

- SciFinderScholar (base de datos del *American Chemical Society*).
- Internet.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

El universo de la investigación fue la Familia Asclepiadaceae, en donde la muestra que se tomó fue ***Calotropis procera***, estudiándose específicamente el epicarpo del fruto, semillas y flores.

Previo a la recolección se presentó una muestra de la especie vegetal en el Herbario del Jardín Botánico La Laguna para su identificación por un botánico experto (ver anexo N° 4).

Referencia del herbario: Jardín Botánico La Laguna, Antiguo Cuscatlán,

J. Monterrosa 1748 (LAGU), Berlín, Usulután.

La recolección de los frutos y flores se realizó en:

- Anillo periférico, tramo Soyapango-Apopa, durante los meses de diciembre de 2009 a marzo de 2010.

4.4 INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO.

4.4.1 Preparación de las muestras a investigar.

Luego de la recolección, los frutos se limpiaron con un paño, para eliminar cualquier contaminante externo y las flores fueron limpiadas cuidadosamente.

Posteriormente los frutos fueron separados en epicarpos y semillas; en el caso de los epicarpos se fraccionaron en pequeñas porciones para así obtener un mejor secado; las flores y las semillas se secaron sin ser fraccionadas. Todo el secado se realizó a temperatura ambiente evitando la luz directa del sol.

El material ya seco, se pulverizó y se pesó por separado previo a su extracción.

4.4.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de epicarpos, semillas y flores de *C. procera*.

Se colocaron 319.7 g de epicarpos previamente pulverizados en un balón para ser extraídos, por medio de una maceración durante 72 horas utilizando como disolvente etanol al 60% y luego se filtró; el residuo del material vegetal fue extraído nuevamente usando el método de reflujo por 24 horas con etanol al 60% y se filtró; se reunieron ambos filtrados, obteniéndose así el extracto hidroalcohólico. Las flores y las semillas fueron sometidas al mismo procedimiento que los epicarpos.

4.4.3 Fraccionamiento por partición líquido-líquido.

A cada uno de los extractos hidroalcohólicos de las flores, epicarpo y semillas, se les realizaron tres extracciones líquido-líquido con *n*-hexano (eliminación de grasas), con posterior recuperación del solvente, obteniendo así la fracción *n*-hexánica. Se colocaron de nuevo el extracto hidroalcohólico en la ampolla de separación y se le realizaron tres extracciones con diclorometano y luego de

igual manera que la anterior con acetato de etilo, con posterior recuperación de cada uno de los disolventes; obteniéndose así las fracciones diclorometánicas y de acetato de etilo, al final se obtuvo un total de nueve fracciones, codificadas de la siguiente manera:

CUADRO N° 2: Codificación de las muestras.

Código de la fracción	Fracción	Código de la fracción	Fracción	Código de la fracción	Fracción
CP1	Flores en <i>n</i> -Hexano	CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	CP7	Flores en AcOEt
CP2	Semillas en <i>n</i> -Hexano	CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	CP8	Semillas en AcOEt
CP3	Epicarpo en <i>n</i> -Hexano	CP6	Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	CP9	Epicarpo en AcOEt

4.5 Identificación de los glicósidos cardiotónicos por cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando las siguientes condiciones:

Fase estacionaria: placa cromatográfica de silica gel de 10 x 20 cm (Polygram Sil G/Uv Macherey-Nagel).

Fase móvil: acetato de etilo: metanol: agua (8: 1: 1).

Muestras: cada una de las fracciones concentradas obtenidas del fraccionamiento líquido-líquido de los epicarpos, semillas y flores de **C. procera**.

Revelador:

- Reactivo de Baljet: Identifica la lactona presente en los glicósidos cardiotónicos.

Preparación del reactivo:

Sol. a: 1.0 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol al 95%.

Sol. b: 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

Mezclar *a* y *b* en proporciones iguales, y rociar ⁽⁶⁾.

Resultado positivo: Coloración naranja después de rociar.

Testigos:

- Digoxina calidad USP (como glicósido).
- Digitoxigenina calidad reactivo (como aglicona).

4.6 Identificación de los glicósidos cardiotónicos por medio de análisis espectroscópico.

A las fracciones que resultaron positivas a la presencia de glicósidos cardiotónicos en el análisis de cromatografía de capa fina se les realizaron los siguientes análisis espectroscópicos:

- Espectroscopia Infrarroja: Espectrofotómetro Nicolet-520 con transformada de Fourier; los espectros fueron tomados a una resolución de 4cm^{-1} y fueron promediados con 30 scans.
- Espectroscopia Ultravioleta: Espectrofotómetro UV-1800, marca SHIMADZU.

4.7 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos mediante espectroscopía ultravioleta.

La cuantificación de los glicósidos cardiotónicos en cada fracción se expresó como miligramos de digoxina ($\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$), tomando como referencia la norma CPMP/QWP/2819/00 y EMEA/CVMP/814/00 de la Agencia Europea de Inspección de Medicamentos (EMA); la cual establece que en los productos naturales puede ser expresado su contenido en base a un compuesto puro, en este caso la digoxina, tomando para ello una técnica establecida por la Farmacopea Italiana.

El procedimiento se realizó solamente a las fracciones que resultaron positivas a la presencia de glicósidos cardiotónicos. La técnica utilizada se describe a continuación: (3, 4, 5).

Disolver 40 mg de la muestra en alcohol *R* y diluir con el mismo solvente a 50.0 mL. Diluir 5.0 mL de la solución anterior a 100.0 mL con alcohol *R*. Preparar una solución de referencia de igual manera, usando 40 mg de digoxina USP. A 5.0 mL de cada solución agregar 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio, dejar reposar por 30 minutos protegiéndolas de la luz y determinar la máxima absorbancia de cada solución a 495 nm, usando como blanco una mezcla de 5.0 mL de alcohol *R* y 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio preparada al mismo tiempo.

El cálculo de la cantidad de mg glicósidos cardiotónicos presentes en las muestras se realizaron utilizando la siguiente fórmula:

$$C_{Mx} = \frac{(C_{St})(A_{Mx})}{A_{St}} \times FD$$

El proceso antes descrito se realizó por quintuplicado y se determinó la desviación estándar para comprobar su reproducibilidad (7,8).

Además con los datos obtenidos por fracción se determinó el contenido de glicósidos cardiotónicos presentes en las flores, epicarpes de los frutos y semillas de ***C. procera***

Alcohol R: Alcohol Pro-Análisis marca Merk a una concentración del 99.99%.

El estándar fue sometido a una preparación previa antes de su uso, la cual se describe a continuación: el estándar fue secado a 105°C por una hora, los cálculos se realizaron usando un valor de 0.961 mg de digoxina por miligramo sobre base seca.

4.8 Determinación de la actividad citotóxica.

La actividad citotóxica se realizó en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España, por la Dra. Laila Moujir.

Las líneas celulares ensayadas fueron:

- HeLa (carcinoma humano de cuello uterino).
- A-549 (cáncer humano de pulmón).
- MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama).
- Células Vero (Células de riñón de mono verde) como control.

Las líneas celulares se cultivaron en monocapas, en medios Dulbecco Eagle modificado, MEDM (Sigma), suplementado con 5% de suero de ternera fetal (Gibco), y una mezcla de 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 UI/mL). Las células se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂ y 98% de humedad. La

actividad citotóxica se evaluó a través del método colorimétrico MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio bromuro].

Ensayo: 30 células en suspensiones (0.1 mL, de 2×10^4 células buenas) se incubaron en una placa con 96 pocillos; las fracciones que dieron positivas a las pruebas para glicósidos cardiotónicos, a diferentes concentraciones se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 48 ó 72 h se midió la densidad óptica utilizando un lector micro ELISA (Multiskan Plus II) a 550 nm y usando una lectura de fondo de 620 nm después de la disolución de la MTT formazan con DMSO. El porcentaje de viabilidad (CI_{50}) se calculó por medio de una curva. Todos los experimentos se repitieron tres veces (2, 52,48).

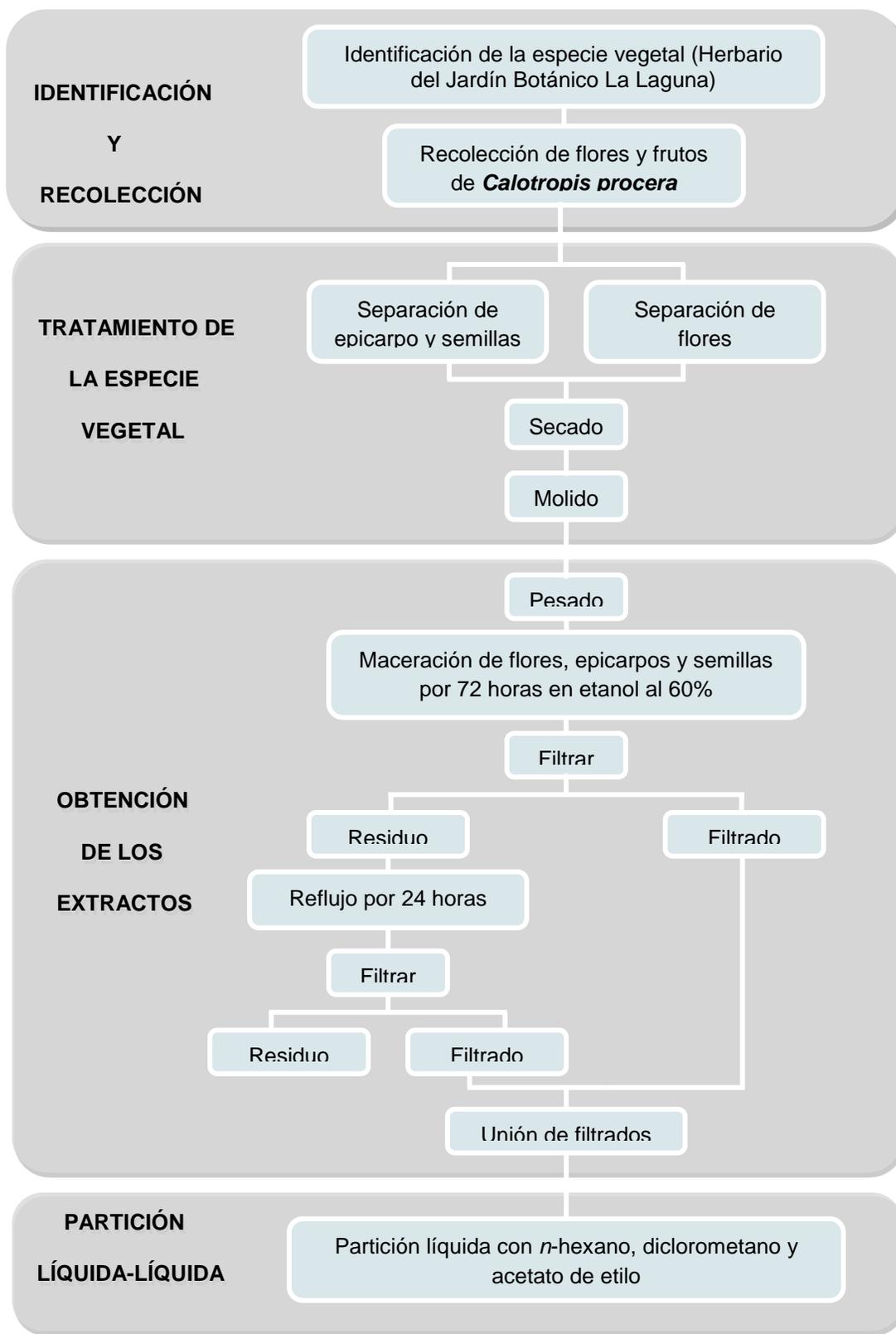


Figura N°24 a. Esquema de trabajo.



Figura N°24 b. Esquema de trabajo.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Luego de la recolección, los frutos, fueron separados en epicarpos y semillas, las flores no sufrieron ninguna fragmentación, posteriormente fueron secados y molidos.

A continuación se presenta el peso del material vegetal seco del que se partió para obtener los respectivos extractos hidroalcohólicos y las subsiguientes fracciones, estos pesos fueron utilizados para determinar el contenido total de glicósidos cardiotónicos en cada parte del fruto.

Cuadro N°3. Peso de material vegetal seco.

Parte de la planta	Peso del material vegetal seco y molido
Epicarpo	319.7 g
Semillas	255.4 g
Flores	104.2 g

5.1 RESULTADO DEL ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA.

El análisis por cromatografía en capa fina de las fracciones de n-hexano, diclorometano y de acetato de etilo, de los extractos hidroalcohólicos de los frutos, flores y semillas de *C. procera*; se realizaron con el objetivo de identificar los glicósidos cardiotónicos presentes en cada fracción.

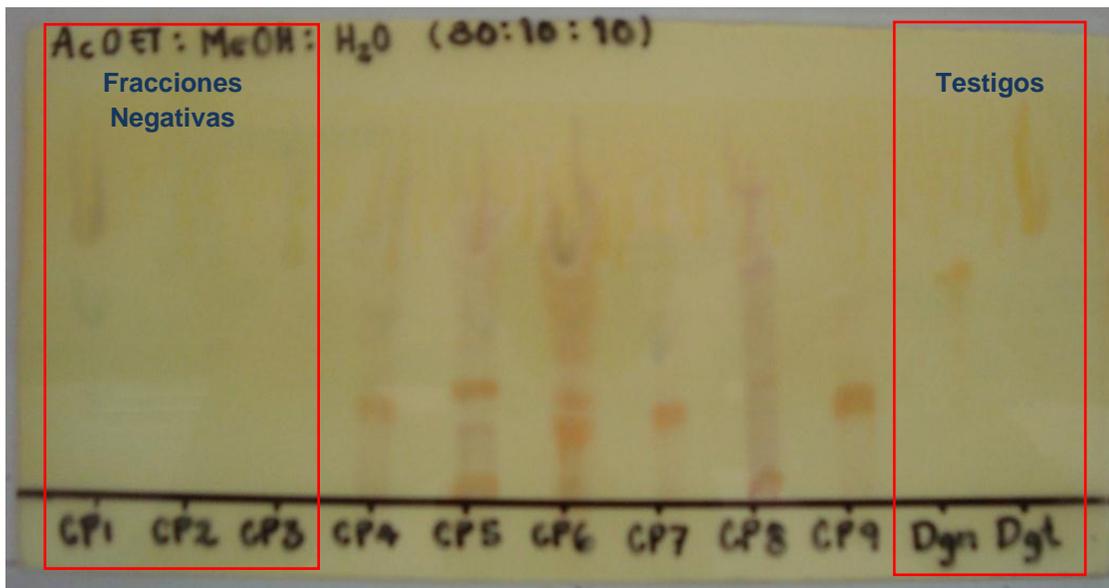


Figura N° 27. Marcas observables en cromatografía de capa fina de las fracciones de *C. procera*. (CP4-CP6: Fracciones diclorometánicas; CP7- CP9: Fracciones de acetato de etilo)

A través de la realización de la cromatografía de capa fina se identificó la presencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones diclorometánicas (CP4,CP5, CP6) y de acetato de etilo (CP7, CP8 y CP9), obtenidas a partir del extracto hidroalcohólico de epicarpos , del extracto hidroalcohólico de semillas y el extracto hidroalcohólico de flores; es de recalcar que las fracciones n-hexánicas de flores, epicarpos y semillas (CP1, CP2 y CP3 respectivamente) no mostraron presencia alguna de glicósidos cardiotónicos (Figura N° 27), por lo cual no serán tomados en cuenta en los análisis espectroscópicos ni en la determinación de la citotoxicidad.

Al ser comparado los R_f de los testigos (digitoxigenina y digoxina) con los diferentes R_f de las fracciones de diclorometano y acetato de etilo, se observa solo la presencia de cardiotónicos en forma de glicósidos ($R_f < 0.5$) lo que comprueba que la muestra no sufrió degradación alguna durante el proceso de extracción.

Cuadro N° 4. Resultado de la evaluación cromatográfica, de las diferentes fracciones procedentes de los epicarpes, semillas y flores de la *C. procera*.

Código de la fracción	Fracción	R_f de la mancha	Código de la fracción	Fracción	R_f de la mancha
CP4	Flores en CH_2Cl_2	0.08	CP7	Flores en AcOEt	0.22
		0.23			0.26
		0.27			0.45
		0.48			
CP5	Semillas en CH_2Cl_2	0.05	CP8	Semillas en AcOEt	0.05
		0.23			0.23
		0.30			0.30
		0.43			0.53
CP6	Epicarpo en CH_2Cl_2	0.50	CP9	Epicarpo en AcOEt	
		0.22			0.24
		0.24			0.42
		0.28			0.46
		0.41			
	0.42				
	0.50				
	0.57				
Dgn	DIGOXINA (Glicosido)	0.55	Dgt	DIGITOXIGENINA (Aglicona)	0.68

5.2 RESULTADOS DE ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO.

El análisis espectroscópico se le realizó solamente a las fracciones de diclorometano y acetato de etilo pues fueron las que resultaron positivas en el análisis de cromatografía de capa fina.

5.2.1 Espectroscopia Infrarroja.

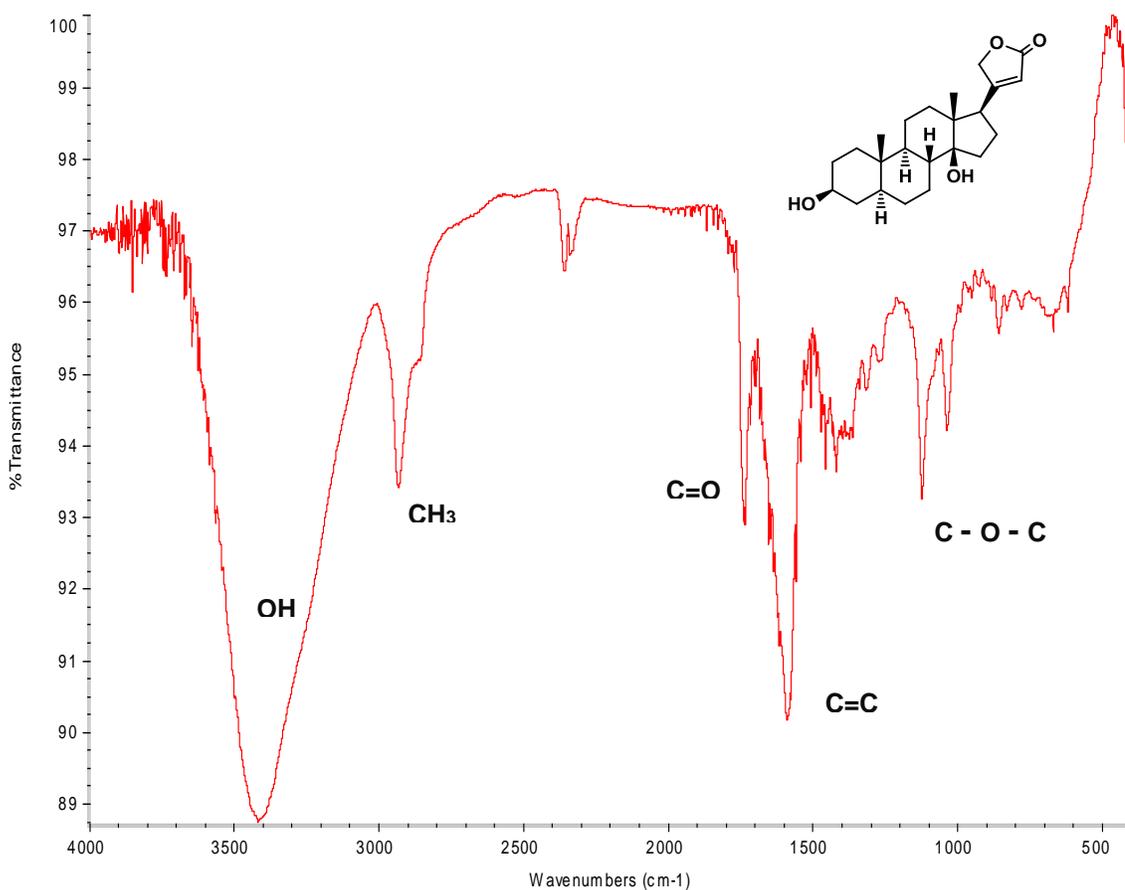


Figura N°28. Espectro IR de estándar de Digitoxigenina.

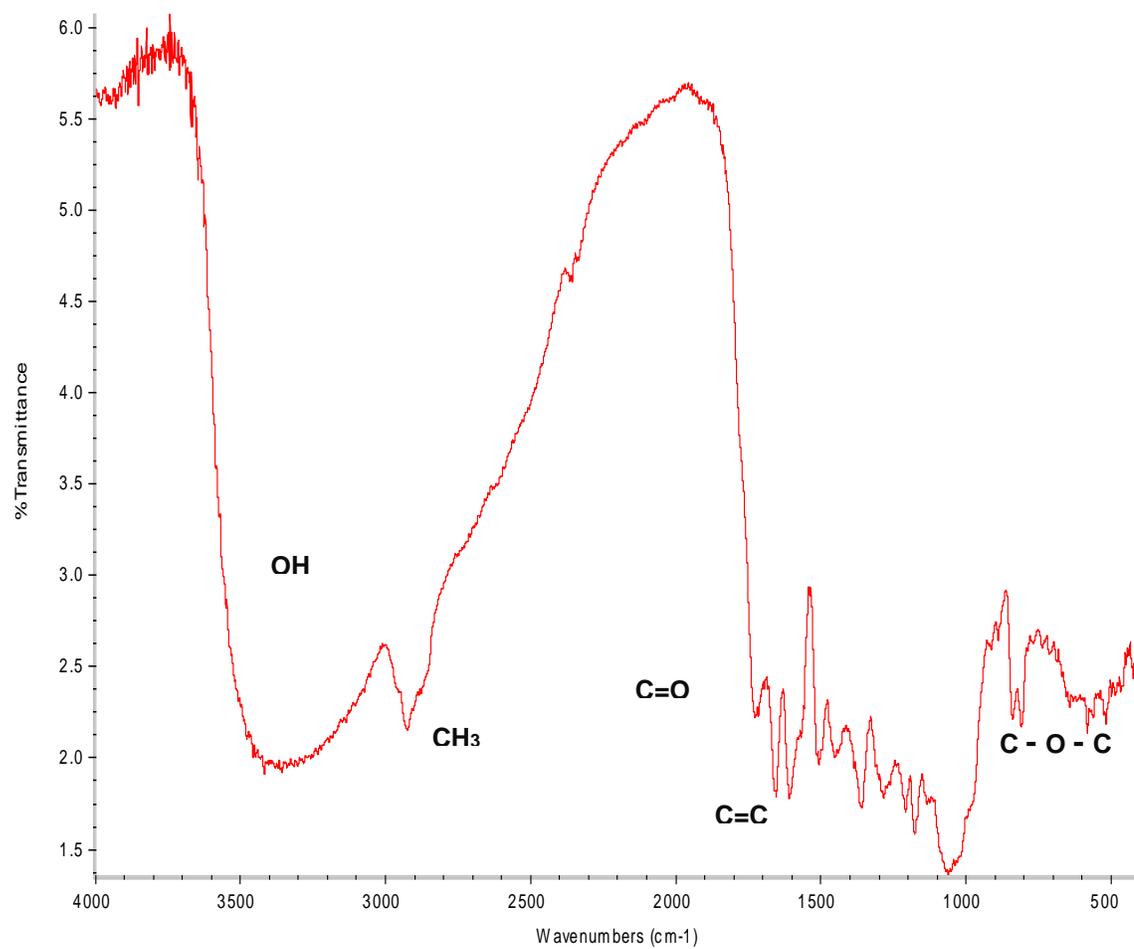


Figura N°29. Espectro IR de muestra CP9 Epicarpo en AcOEt.

Cuadro N° 5. Bandas de Absorción en Infrarrojo características de glicósidos cardiotónicos presentes en cada una de las fracciones analizadas y testigos utilizados (espectros realizados en KBr.).

Código de la fracción	Bandas de absorción (cm^{-1})				
	OH 3600 - 3700	CH ₃ 2870 - 2960	C=C 1450 - 1635	C-O-C 10201270	C=O 1735
CP4 Flores en CH ₂ Cl ₂	X	X	X	X	X
CP5 Semillas en CH ₂ Cl ₂	X	X	X	X	X
CP6 Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	X	X	X	X	X
CP7 Flores en AcOEt	X	X	X	X	X
CP8 Semillas en AcOEt	X	X	X	X	X
CP9 Epicarpo en AcOEt	X	X	X	X	X
DIGOXINA	X	---	X	---	X
DIGITOXIGENINA	X	X	X	X	X

Las fracciones analizadas en espectroscopia infrarroja mostraron las bandas características de los glicósidos cardiotónicos al ser comparadas con los espectros de los estándares utilizados (digoxina y digitoxigenina).

Se observó la presencia del grupo hidroxilo correspondiente al OH del carbono 14 de la porción azucarada entre 3600-3700 cm^{-1} , además de bandas características de la lactona α - β -insaturada propia de estos metabolitos, a 1450-1635 (C = C) y 1735 (C = O). (Ver Anexo N° 1)

Además se observó en la muestra CP9 (epicarpo en acetato de etilo) bandas características de los cardiotónicos de la *Calotropis procera* como la correspondiente al estiramiento de -NH en el rango de $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ y la banda de -SH a 1710 cm^{-1} .

5.2.2 Espectroscopia ultravioleta.

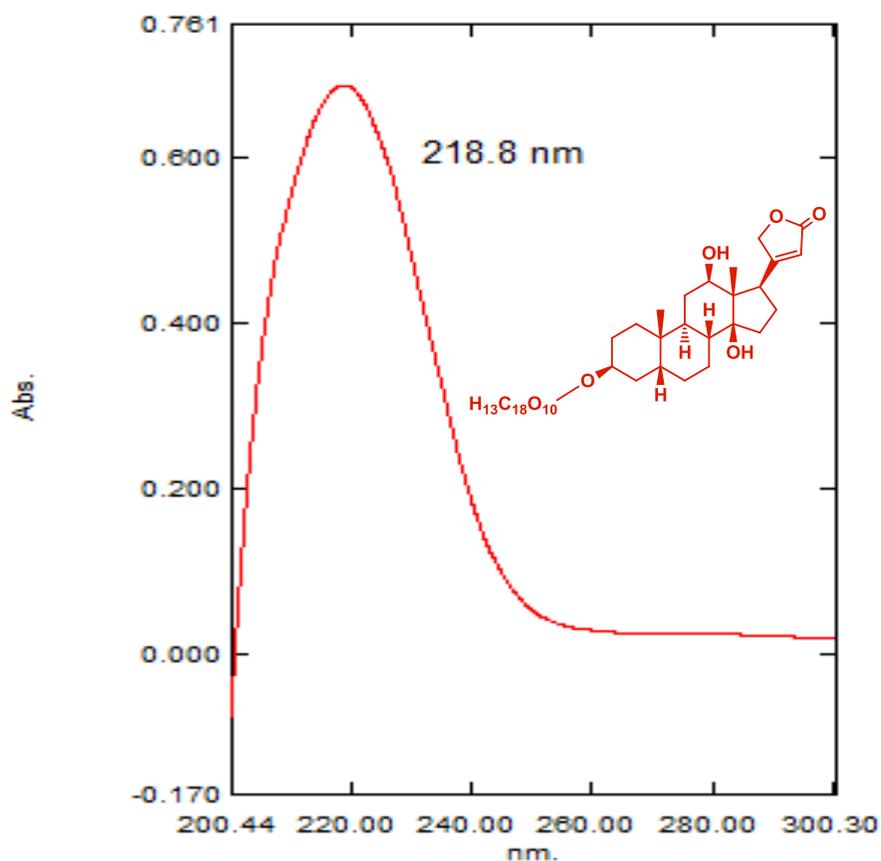


Figura N°30. Espectro ultravioleta de la digoxina.

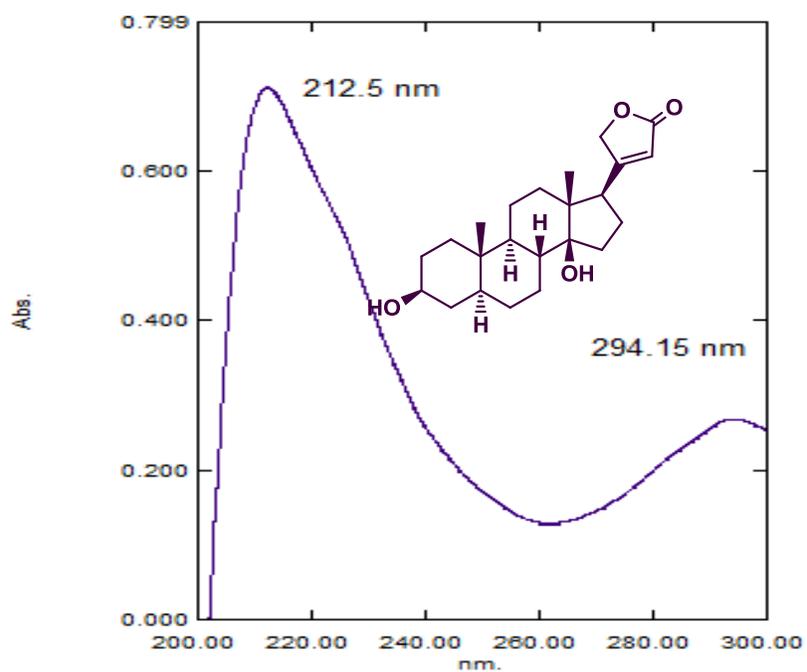


Figura N°31. Espectro ultravioleta de la digitoxigenina.

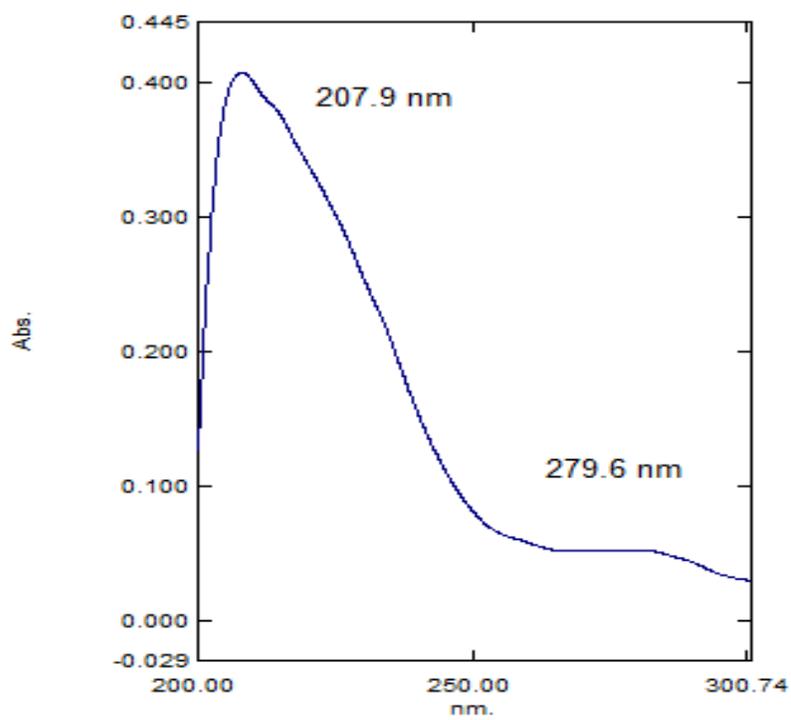


Figura N°32. Espectro ultravioleta de fracción CP5 (semillas en CH₂Cl₂).

Cuadro N°6. Absorbancia y longitud de onda máxima en cada una de las fracciones y testigos (espectros realizados en etanol).

Código de la fracción	Muestra	Absorbancia Máxima	Longitud de onda Máxima (nm)
CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	0.317	267.9
		0.642	207.4
CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	0.407	207.9
		0.053	279.6
CP6	Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	0.168	268.0
		0.679	201.1
CP7	Flores en AcOEt	0.177	268.1
		0.692	201.7
CP8	Semillas en AcOEt	0.068	281.7
		0.673	203.6
CP9	Epicarpo en AcOEt	0.166	267.9
DIGOXINA		0.686	218.8
DIGITOXIGENINA		0.268	294.1
		0.712	212.5

Las fracciones a las cuales se les realizó un análisis en espectroscopia ultravioleta presentan un máximo de absorción entre 300 y 200 nm al igual que los estándares utilizados, lo cual indica la presencia de lactonas α - β -insaturada características de los glicósidos cardiotónicos. (Ver Anexo N° 2)

Los máximos observados son característicos de los glicósidos cardiotónicos de la ***C. procera***, aunque se observa un desplazamiento en estos, debido a la sumatoria de longitudes de onda de los diferentes glicósidos cardiotónicos presentes en las fracciones.

5.4 RESULTADO DE CUANTIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

Procedimiento realizado con estandar de referencia:

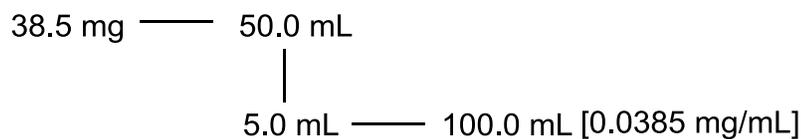
Promedio.

Peso de digoxina:

$$\bar{X} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_n}{n_{\text{total}}}$$

$$\bar{X} = \frac{(38.6 + 38.5 + 38.5 + 38.5 + 38.4) \text{ mg}}{5} = 38.5 \text{ mg}$$

Cascada de dilución de estándar de referencia.



Promedio.

Absorbancia:

$$\bar{X} = \frac{0.380 + 0.372 + 0.336 + 0.340 + 0.350}{5} = 0.356$$

Condiciones para estándar:

- Estándar de referencia: Digoxina USP.
- Blanco: Mezcla de 5.0 mL de etanol para análisis (99.99%) y 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio.
- Concentración promedio de estándar de referencia: 0.0385 mg/mL.
- Factor de dilución: 1000.
- Longitud de onda: 495 nm.

A continuación se ejemplifica el procedimiento realizado con la muestra CP4 (Flores en CH₂Cl₂).

CUADRO N°7 Datos del estándar para cuantificación.

Peso de estándar	Pureza de estándar	Concentración en alícuota	Absorbancia de estándar	Factor de dilución
40.0 mg	96.1 %	0.0385 mg/mL	0.356	20.0

Fórmula utilizada:

$$C_{Mx} = \frac{(C_{St})(A_{Mx})}{A_{St}} \times FD$$

Dónde:

C_{Mx} = Cantidad de glicósidos cardiotónicos en la muestra.

C_{St} = Concentración del estándar usado en el análisis.

A_{Mx} = Absorbancia de la muestra.

A_{St} = Absorbancia del estándar.

FD = Factor de dilución.

Cantidad por muestra analizada.

$$CP4-1 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.547)}{0.356} \times 20 = 1.2 \text{ mg}$$

$$CP4-2 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.482)}{0.356} \times 20 = 1.0 \text{ mg}$$

$$CP4-3 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.494)}{0.356} \times 20 = 1.1 \text{ mg}$$

$$CP4-4 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.480)}{0.356} \times 20 = 1.0 \text{ mg}$$

$$CP4-5 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.484)}{0.356} \times 20 = 1.0 \text{ mg}$$

Promedio.

$$\bar{X} = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_n}{n_{\text{total}}}$$

$$\bar{X} = \frac{(1.2 + 1.0 + 1.1 + 1.0 + 1.0) \text{ mg}}{5} = 1.1 \text{ mg}$$

Desviación típica estándar.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde:

S: Desviación típica estándar.

$\sum_{i=1}^n$: Sumatoria desde muestra 1 a n número de muestras.

X_i : Muestra individual.

\bar{X} : Promedio de muestras.

n : Número de muestras.

$$S = \sqrt{\frac{[(1.2-1.1)^2 + (1.0-1.1)^2 + (1.1-1.1)^2 + (1.0-1.1)^2 + (1.0-1.1)^2] \text{mg}^2}{(5 - 1)}}$$

$$S = 0.1 \text{ mg}$$

Intervalo de confianza.

$$IC(\mu) = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

IC(μ): Intervalo de confianza.

\bar{X} : Promedio de muestras.

t : t de student.

n-1: Grados de libertad.

S: Desviación típica estándar.

n: Número de muestras.

Valor de t para 4 grados de libertad al 95.0% de confianza es igual a 2.131846, por lo tanto:

$$IC(\mu) = 1.1 \text{ mg} \pm \left[2.131846 \left(\frac{0.1 \text{ mg}}{\sqrt{5}} \right) \right]$$

$$IC(\mu) = 1.1 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg} \left\{ \begin{array}{l} \text{Limite inferior} = 1.0 \text{ mg} \\ \text{Limite superior} = 1.2 \text{ mg} \end{array} \right.$$

CUADRO N°8. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones.

Código	Muestra	Peso de la fracción (g)	Peso de la M_x (mg) ^a	Contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina	
				Muestra (mg) ^b	Fracción (g)
CP4	Flores en CH_2Cl_2	2.5697	10.0	1.1	0.28
CP5	Semillas en CH_2Cl_2	3.2361	10.2	5.8	1.84
CP6	Epicarpo en CH_2Cl_2	6.0698	10.1	3.3	1.98
CP7	Flores en AcOEt	0.6527	10.0	0.4	0.26
CP8	Semillas en AcOEt	1.6001	10.2	3.8	0.60
CP9	Epicarpo en AcOEt	1.2766	10.1	0.9	0.11

^a Datos promedios de análisis realizado por quintuplicado.

^b Resultados con intervalo de confianza del 95%.

Rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones.

Ejemplo de cálculos utilizando datos de las fracciones CP5 (semillas en CH_2Cl_2)

y CP8 (semillas en AcOEt).

CUADRO N° 9. Resumen de peso de muestras y contenido de glicósidos cardiotónicos en CP5 (semillas en CH₂Cl₂)

Código de muestra	Peso de muestra	Contenido de glicósidos cardiotónicos
CP5-1	10.2 mg	5.9 mg/mL
CP5-2	10.2 mg	5.7 mg/mL
CP5-3	10.3 mg	5.8 mg/mL
CP5-4	10.3 mg	5.8 mg/mL
Promedio	10.2 mg	5.8 mg/mL

*Exclusión de CP5-5 pues los valores se encuentran afuera del intervalo de confianza. Ver ANEXO N° 3

CP 5 (Fracción de diclorometano en semillas).

Peso de muestra ——— Contenido de glicósidos cardiotónicos
 Peso de fracción ——— Cantidad de glicósidos cardiotónicos en la fracción

0.0102 g ——— 0.0058 g
 3.2361 g ——— X g X = 1.8401 g

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción:

3.2361 g ——— 100.00%
 1.8401 g ——— X % X % = 56.86%

CUADRO N° 10. Resumen de peso de muestras y contenido de glicósidos cardiotónicos en CP8 (semillas en AcOEt).

Código de muestra	Peso de muestra	Contenido de glicósidos cardiotónicos
CP8-1	10.3 mg	3.8 mg/mL
CP8-2	10.3 mg	4.0 mg/mL
CP8-3	10.3 mg	4.0 mg/mL
CP8-4	10.2 mg	3.7 mg/mL
CP8-5	10.1 mg	3.6 mg/mL
Promedio	10.2 mg	3.8 mg/mL

CP 8 (Fracción de acetato de etilo en semillas).

$$\begin{array}{rcl} 0.0102 \text{ g} & \text{—} & 0.0038 \text{ g} \\ 1.6001 \text{ g} & \text{—} & X \text{ g} \end{array} \quad X = 0.5961 \text{ g}$$

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción:

$$\begin{array}{rcl} 1.6001 \text{ g} & \text{—} & 100.00\% \\ 0.5961 \text{ g} & \text{—} & X \% \end{array} \quad X \% = 37.25\%$$

Contenido de glicósidos cardiotónicos en semillas:

$$\sum \text{CP 5} + \text{CP 8} = 1.8401 \text{ g} + 0.5961 \text{ g}$$

$$\sum \text{CP 5} + \text{CP 8} = 2.4362 \text{ g}$$

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en semillas:

$$\begin{array}{rcl} 4.8362 \text{ g} & \text{—} & 100.00\% \\ 2.4362 \text{ g} & \text{—} & X \% \end{array} \quad X \% = 50.37\%$$

CUADRO N° 11. Porcentaje de glicósidos cardiotónicos de cada fracción.

Fracción N°	Muestra	Peso de la fracción (g)	Porcentaje de Glicósidos Cardiotónicos (%)
CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	2.5697	10.70
CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	3.2361	56.86
CP6	Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	6.0698	32.62
CP7	Flores en AcOEt	0.6527	4.00
CP8	Semillas en AcOEt	1.6001	37.25
CP9	Epicarpo en AcOEt	1.2766	8.71

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos extraídos de semillas respecto al material seco.

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso de glicósidos cardiotónico}}{\text{Peso del material vegetal}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{2.4362 \text{ g}}{255.4 \text{ g}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = 0.95\%$$

CUADRO Nº 12. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en epicarpo, semilla y flores de *Calotropis procera*, en base a material vegetal seco.

Parte de la planta	Peso del material vegetal	Contenido de glicósidos cardiotónicos, expresados como digoxina	Porcentaje (%)
Epicarpo	319.7 g	2.0343 g	0.63
Semilla	255.4 g	2.4362 g	0.95
Flores	104.2 g	0.3069 g	0.29

La determinación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, demuestran que las fracciones poseen cardiotónicos en cantidades que pueden ser consideradas como significativas al ser comparadas con otras plantas a las cuales se les extrae estos metabolitos con fines médicos, como la digoxina que se encuentra en la *Digitalis purpurea* en porcentajes entre el 0.15-0.4%

Al analizar los resultados obtenidos, se puede establecer que el solvente de preferencia para una buena extracción de glicósidos cardiotónicos presentes en epicarpes y semillas es el diclorometano pues con él se obtuvo un rendimiento mucho mayor que con acetato de etilo, sin embargo para la extracción de metabolitos presentes en las flores el uso del acetato de etilo no presenta diferencia alguna frente al diclorometano como solvente de extracción.

De todas las fracciones obtenidas de los diferentes órganos, la que presentó mayor porcentaje de glicósidos cardiotónicos fueron las procedente de las fracciones de semillas tanto en diclorometano (56.86%) como en acetato de etilo (37.25%); de igual manera en el contenido total de glicósidos cardiotónicos, a partir del material seco, se obtuvo en mayor porcentaje las semillas, siendo este un 0.95%.

El elevado porcentaje de glicósidos cardiotónicos en las fracciones de semillas, es debido a que la planta usa estos metabolitos como medio de defensa, ya que en la semilla están presente el embrión, responsable de perpetuar la especie, brindándoles los glicósidos cardiotónicos un sabor desagradable a la semilla que evita sea comida y permite que la especie se siga propagando.

5.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

CUADRO N° 13. Resultado de la actividad citotóxica en cada una de las fracciones realizadas.

Código	Fracción	Líneas Celulares Ensayadas			
		HeLa CI ₅₀ (µg/mL)	A-549 CI ₅₀ (µg/mL)	MCF-7 CI ₅₀ (µg/mL)	Vero* CI ₅₀ (µg/mL)
CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	0.68	0.43	1.18	2.24
CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	0.19	0.15	0.62	0.56
CP6	Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	0.36	0.42	0.88	0.33
CP7	Flores en AcOEt	45.32	5.40	76.57	>40
CP8	Semillas en AcOEt	0.34	0.18	1.15	1.180
CP9	Epicarpo en AcOEt	10.80	2.83	9.72	10.56
G.C*	Digoxina	0.50	0.53	0.27	0.18
G.C*	Digitoxigenina	0.13	0.06	0.12	0.19
Control positivo	Mercaptopurina	0.50	8.00	0.24	11.50

* Células Vero: Línea celular no tumoral de riñón de mono verde africano.

* G.C.: Glicósido cardiotónico.

A-549: Cáncer humano de pulmón.

CI₅₀: Porcentaje de viabilidad.

MCF-7: Adenocarcinoma humano de mama.

HeLa: Carcinoma humano de cuello uterino.

Se dice que una sustancia es activa cuando a una concentración determinada es capaz de inhibir el 50% del crecimiento de las células cancerígenas y esta es menor a la concentración utilizada por el control positivo para lograr el mismo efecto, además de considerarse la toxicidad causada en las células Vero, esta debe de ser de toxicidad media a baja para considerar la sustancia como un agente anticancerígeno efectivo. Se considera una toxicidad media a baja si la sustancia ensayada utiliza concentraciones altas para inhibir el crecimiento de un 50% de células buenas respecto a la concentración utilizada para inhibir el 50% de crecimiento de las células infectadas. Así decimos que las fracciones CP5 (semillas en CH_2Cl_2), CP6 (epicarpo en CH_2Cl_2) y CP8 (semillas en AcOEt) poseen actividad frente a la línea celular de carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), ya que la concentración para inhibir el 50% de células infectadas es menor a la concentración de la Mercaptopurina utilizada como control positivo, presentando la fracción CP8 toxicidad media frente a las células vero, las cuales fueron utilizadas como control, mientras que la fracción CP4 (flores en CH_2Cl_2) no fue activa como las antes mencionadas.

Las fracciones CP4 a CP9 mostraron actividad frente al cáncer humano de pulmón (A-549), presentando valores incluso mejores que la Mercaptopurina. Sin embargo, frente a las células Vero solamente las fracciones CP4 y CP9 presentaron toxicidad media y, CP7 y CP8 toxicidad débil, convirtiéndose estas últimas en las más prometedoras como agentes anticancerígenos, frente a la línea celular A-549₍₉₎.

En cuanto al adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) ninguna fracción presento actividad significativa.

CAPITULO IV
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis por cromatografía de capa fina de los epicarpos, semillas y flores de *Calotropis procera*, demuestra la presencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones de diclorometano y de acetato de etilo, pero no en las fracciones de *n*-hexano debido a que las manchas características para estos metabolitos frente al reactivo revelador propio para glicósido cardiotónicos no fueron observadas; ya que este solvente solo sirvió para desengrasar los extractos y evitar que existiera interferencia en las otras fracciones.
2. Se comprobó la similitud en el perfil cromatográfico entre todas las fracciones realizadas y al ser comparados los R_f de los testigos (Digitoxigenina y Digoxina) con los diferentes R_f de las fracciones, se observa la presencia solamente de cardiotónicos en forma de glicósidos ($R_f < 0.5$) lo cual demuestra que los metabolitos no sufrieron degradación durante el proceso de extracción.
3. La utilización de métodos espectrofotométricos (IR y UV visible) permitieron confirmar la presencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones de diclorometano y acetato de etilo procedentes de epicarpos, semillas y flores.

4. Se comprobó mediante los resultados obtenidos durante toda la investigación que es necesario la utilización de diclorometano y acetato de etilo como solventes de extracción, para así obtener un buen rendimiento y presencia de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones.
5. Se demostró mediante los valores obtenidos en la cuantificación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, que ***Calotropis procera*** es una buena fuente para la extracción de glicósidos cardiotónicos para uso médico, pues los porcentajes son comparables a los de otras plantas usadas para los mismos fines. Además se demostró que el órgano vegetal que presentó mayor cantidad de estos metabolitos fueron las semillas; pues la planta los utiliza como mecanismo de defensa frente a los depredadores con el objetivo de perpetuar la especie.
6. En la determinación de la actividad citotóxica las fracciones CP5 (semillas en CH₂Cl₂), CP6 (epicarpo en CH₂Cl₂) y CP8 (semillas en AcOEt) mostraron actividad frente a la línea celular de carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), presentando solamente la fracción CP8 toxicidad media frente a las células Vero, las cuales fueron utilizadas como control, mientras que la fracción CP4 (flores en CH₂Cl₂) no fue activa como las antes mencionadas.

7. Las fracciones CP4 a CP9 mostraron actividad frente al cáncer humano de pulmón (A-549), presentando valores incluso mejores que la Mercaptopurina, la cual fue utilizada como control positivo. Sin embargo, frente a las células Vero solamente las fracciones CP4 y CP9 presentaron toxicidad media y, CP7 y CP8 toxicidad débil, convirtiéndose estas últimas en las más prometedoras como agentes anticancerígenos, frente a la línea celular A-549. En cuanto al adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) ninguna fracción presentó actividad significativa.

CAPITULO V
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios comparativos de los diferentes órganos de la planta en los cuales se determine la etapa en la cual los frutos, semilla y flores posean una mayor cantidad de glicósidos cardiotónicos.
2. En futuras investigaciones de glicósidos cardiotónicos utilizar sucesivas extracciones con diclorometano y acetato de etilo, con el objeto de obtener un mejor rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones, tomando como base los resultados alcanzados en la presente investigación.
3. Realizar nuevas investigaciones para continuar el fraccionamiento aislar de CP7 (flores en AcOEt) y CP8 (semillas en AcOEt) los glicósidos cardiotónicos responsables de la actividad citotóxica frente a la línea celular A-549.
4. Realizar nuevos ensayos de citotoxicidad para determinar si las fracciones poseen actividad sobre otras líneas celulares, además de las ya ensayadas.
5. Para la cuantificación, se recomienda realizarla por quintuplicado, ya que esto permite reducir el índice de errores al analizar los datos y obtener valores más confiables y verídicos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA.

1. Akhtar, Nargis. Proceragenin, an antibacterial cardenolide from ***Calotropis procera***. *Phytochemistry* 1992 Vol. 31(8); Pág. 2821-4.
2. Arencibia Arrebola, Daniel Francisco; Rosario Fernández, Luis Alfredo; Curveco Sánchez, Dayisell Lazara. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea [Revista en línea]* 2009.Vol 19. Pág. 40 – 52. [Consultado 19 de septiembre de 2010]. Disponible en:<http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=661>.
3. Bankole, Olanrewaju A.; Elujoba, Anthony A.; Iwalewa, Ezekiel O. In vitro spasmolytic effect of aqueous extract of ***Calotropis procera*** on guinea pig trachea smooth muscle chain. *Fitoterapia*. 2006; Vol. 76. Pag. 250-253.
4. Campos, José Arnoldo. Determinación de la actividad anticancerígena *in Vitro* de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de ***Thevetia ahouia*** (cojon de hojas largas) y ***Thevetia peruviana*** (Chilca) Familia Apocynaceae. [tesis]. San Salvador, Universidad de El Salvador; 2009.
5. Cancer.gov. [Consultado 19 de enero de 2010]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdp>

6. Cancer.gov. [Consultada 11 de marzo de 2010]. disponible en:
<http://ha.cancer.gov/diccionario/?CdrID=444973>
7. Ctfs.si.edu. [Consultado 15 de diciembre de 2009] Disponible en:
<http://ctfs.si.edu/webatlas/findinfo.php?specied=8362&leng=spanih>.
8. Demedicina.com. [Consultado 14 de enero de 2010]. Disponible en:
<http://www.demicina.com/salud/cancer.html>.
9. Dewick, Paul. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. 2nd edition. Jonh Wiley and Sons Ltd. USA. 2002 Pag. 241 -252.
10. Duke, James; Duke's Handbook of medicinal plants of the Bible. USA, CRC. 2008 Pag.72-76.
11. Ecoaldea.com. [Consultada 11 de diciembre de 2009]. Disponible en:
<http://www.ecoaldea.com/plmd/cabalonga.htm>.
12. EMEA (European Medicine Agency Inspection). Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal Products, CPMP/QWP/2819/00 and EMEA/CVMP/814/00. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). 2008
13. Farmacopea Ufficile della Repubblica Italiana. Ottava edizione. Roma, Italia. Istituto Poligrafico dello statu P.V. 1972. Il Volume, Pag. 390-393.

14. Francis, John. ***Calotropis procera***. International Institute of Tropical Forestry. Jardín Botánico Sur. Puerto Rico 2003.
15. Gallegos-Olea, RS.; Borges, MOR.; Borges, ACR.; Freire, SMF.; Silveira, LMS.; Vilegas, W.; Rodrigues, CM.; Oliveira, A.V.; Costa, JL. Flavonoid content of ***Calotropis procera*** R. Br. (Asclepiadaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2008 Vol.10 (1), Pág. 29-33
16. Gouda, A. Veeran; Prabhu, K; Prakash, T.; Patil, Tushar; Swamy Viswanath; Quereshi, Absar Ahmed; Setty S. Ramachandra Hepatoprotective activity of ***Calotropis procera*** flowers against paracetamol induced hepatic injury in rats.. 2007. Fitoterapia. Vol. 78. Pag.451-454.
17. Gupta, Mradu; Shaw, BP. Uses of medicinal plants in Panchakarma Ayurvedic Therapy. Indian Journal of traditional knowledge .2009. Vol 8 (3), Pág. 372-378
18. IUCN Center for Mediterranean Cooperation. A guide to medicinal plant of North Africa. 1ed. España, Graficas La Paz. 2005. Pag.69-70.
19. Juncker, Tom; Schumacher, Marc; Dicato Mario; Diederich Marc. UNBS1450 from ***Calotropis procera*** as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death Biochemical Pharmacology. 2009. Vol.78. Pag. 1 -10.

20. Kandhro, Aftab; Khanzada, Kabir; Kazi TG. Analysis of fatty acid, elemental and total protein *Calotropis procera*, medicinal plants. Pakistan Journal of Botany; 2008. Vol. 40 (5).Pag. 1913-1921
21. Khan, Muhammad; Nisar, Muhammad; Ghulam, Iqbal Zafar, Lateef Muhammad Jabbar Abdul. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait). Flowers in sheep. Journal of Ethnopharmacology. 2005 Vol.10 (2). Pag.256 - 231.
22. Khare, C. P. Indian Medicinal Plants. Nueva Deli, India. Springer. 2007. Pag.113 - 114.
23. Kiss, Robert; Darro, Francis; Delest, Bruno; Debeir, Oliver; Quaquebe´ Eric. Van; Mijatovic, Tatjana.. Cardiotonic Steroids on the road to anti-cancer therapy. Biochimica el Biophysica. 2007 Vol.17. Pag. 35 -57.
24. Kuklinski, Claudia. Farmacognosia Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, Espana. Ediciones Omega. 2000. Pag. 154 – 160.
25. Lagos, Jorge Adalaberto. Compendio de Botánica Sistemática. Tercera Edición. Dirección de Publicación e impresos del Ministerio de Cultura y Comunicaciones. San Salvador, El Salvador 1987.Pag. 79, 81, 95.
26. Lixin, Li; Ping Li; Min Ye, Lei Zhong and Dean Guo Cytotoxic Resibufogenin Transformation Products from Cell Suspension Cultures of

Platycodon Grandiflorum. Letters in Organic Chemistry 2004. Vol.1:
Pag.176 – 178.

27.Lock, Olga. Investigación Fitoquímica. 2ª Ed. España. Pontificia
Universidad Católica del Perú. 1994 Pág 265 y 269.

28.Mahran, GH.; Rizkallah M.M. and Saber, A.H.; Phytochemical study of
Calotropis procera growing in Egypt. Bulletin of the Faculty of Pharmacy
(Cairo University). 1971. Vol. 10(1), Pág. 1 – 21.

29.Marcano D.; Hasegawa, M. Fitoquímica Orgánica, Consejo de Desarrollo
Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas,
Venezuela. 2002. Pág. 54 – 57.

30.Mebs, D.; Reuss, E.; Schneider, M. Toxicon. Studies on the cardenolide
sequestration in African milkweed butterflies (Danaidae). 2005. Vol. 45.
Pag.581 -584.

31.Miller James. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Quinta
edición. Madrid, España. Pearson Educación, S.A. 2002. Capitulo 3, pág.
41- 76.

32.Morales, J. Francisco; Barry Hammel; Nelson Zamora; Michael Grayum.
[Internet]. Manual de plantas de Costa Rica. San José. 1999. [Consultado
27 de feb. 2010]. En línea Disponible en: <http://www.darnis.inbio.ac.cr>.

33. MSPAS (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, ES) (Dirección de Vigilancia Sanitaria, Unidad de Estadística e Información en Salud).
34. Mukherjee, AK.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, AC. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. Current Medicinal Chemistry. 2001. Vol. 8. Pag.1467 – 1486.
35. Newman, Robert; Yang, Peiyong; Pawlus, Alison. Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. Molecular Intervention [Revista línea].2008; Vol. 8 (1) [Consultado 17 de marzo de 2010] disponible en: <http://molinterv.aspetjournals.org/content/8/1/36.full>.
36. Nih.gov. [Consultado 4 de enero de 2010]. Disponible en: <http://www.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.html>.
37. Prassas, Ioannis; Diamandis, Eleftherios. Novel Therapeutic Applications of Cardiac Glycosides. Nature Reviews. 2008. Vol. 7 (11). Pag. 926 – 933.
38. Qari, Sameer H. Molecular and biochemical evaluation of genetic effect of *Calotropis procera* (Ait.) latex on *Aspergillus terreus* (Thom). Indian Journal of Experimental Biology. 2008. Vol 46. Pag.725 – 730.

39. Rodríguez, J. y otros. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en estudio del crecimiento y citotoxicidad *in vitro* de líneas de melanoma. Patología. 1997. Vol. 30, N° 1. Pág. 18 - 27.
40. Roy, Michael. C.; Chang, Fang-Rong; Huang, Hsiao-Chu; Chiang, Michael; Wu, Yang-Chang. Cytotoxic Principles from the Formosan Milkweed, *Asclepias curassavica*. Journal Natural Products. 2005. Vol. 68. Pag. 1494 – 1499.
41. Salawu, OT; Adetunji, VO.; African soft chesse “wara” processed with *Calotropis procera* and *Carica papaya*: A comparative assessment of nutritional values. African Journal of Biotechnology. 2008. Vol. 7(18). Pág.3360 – 3362.
42. Saturnino, HM.; Melo, MM.; Vaz, FA.; Gonçalves, LC.; Phytochemical study of the *Calotropis procera* Ait in goat feeding: clinical effects and biochemical parameter, Revista Bras. sude. 2001. Vol. 2. Pag.15 – 20.
43. Singal, Prashant; Mohanta, Ayan; Bhaumik, Arup; Ocular toxicity by latex of *Calotropis procera* (Sodom apple). Indian Journal Ophthalmology. 2009. Vol.57 (3). Pág. 232 – 234.
44. Smit, HF.; Woerdenbag, HJ.; Singh, RH.; Meulenbeld GJ.; Labadie RP.; Zwaving JH.; Ayurvedic herbal drugs with possible cytostatic activity. Ethnofarmacology. 1995. Vol. 47. Pág. 75 – 84.

45. Tóth, Gabor; Gáti, Tamas; Simon, András; Hanna, Atef. 1999. Complete ¹H and ¹³C signal assignment of 5-cardenolide isolated from *Calotropis procera*. Journal of Molecular Structure. 1999. Vol. 477. Pag. 207 – 208.
46. Tropicos.org. [Consultado 12 de abril de 2010]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/NameSpecimens.aspx?nameid=2603214>.
47. Ub.es [consultado 20 de enero de 2010] Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>.
48. Uprn.edu [consultada 1 de abril de 2011] Disponible en : <http://www.uprn.edu/biology/profs/massol/manual/p4actividadmicro.pdf>
49. Van Quaquebeke, Eric.; Simon, Gentiane; André, Aurélie; Dewelle, Janique; El Yazidi, Mohamed; Tuti, Jerome; et al. Identification of a Novel Cardenolide (2''-Oxovoruscharin) from *Calotropis procera* and the Hemisynthesis of Novel Derivatives Displaying Potent in Vitro Antitumor Activities and High in Vivo Tolerance: Structure-Activity Relationship Analyses. Journal Medical Chemistry. 2005. Vol. 48. Pag. 849 – 856
50. Villar del Fresno; Ángel Maria. Farmacognosia General. Vallehermoso, Madrid, España. Editorial Síntesis. 1999. Pag.33 – 43, 181 – 188 y 335.
51. Watanabe, Kazuki; Mimaki, Yoshihiro; Sakagami, Hiroshi; Sashida, Yutaka. Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of

Helleborus orientalis. Journal Natural Products. 2003. Vol. 66. Pág. 236 – 241.

52. Wikibooks.org [Consultada el 15 de diciembre de 2010] Disponible en:http://es.wikibooks.org/wiki/Tablas_estad%C3%ADsticas/Distribuci%C3%B3n_t_de_Student.

53. Zhao, Ming; Bai, Liming; Wang, Liyan; Toki, Asami; Hasegawa, Toshiaki; Kikuchi, Midori; et al. Bioactive Cardenolides from the Stems and Twigs of ***Nerium oleander***. Journal Natural Products. 2007. Vol. 70 Pág. 1098 – 1103.

GLOSARIO (32, 33, 41)-

- **Auxocromo:**

Es un grupo funcional que no absorbe por si solo en la región del ultravioleta pero que tiene los efectos de desplazar picos de los cromóforos hacia longitudes de onda larga además de aumentar sus intensidades.

- **Catártico:**

Agente que provoca la evacuación intestinal mediante la estimulación de la perístasis, aumentando la fluidez o el volumen del contenido intestinal, reblandeciendo las heces o lubricando la pared intestinal.

- **Células Jurkat:**

Línea celular derivada de la Leucemia de células T humanas y utilizada para determinar el mecanismo de susceptibilidad diferencial a medicamentos anticancerosos y a la irradiación.

- **Células Vero:**

La línea celular Vero se deriva de las células epiteliales del riñón del mono verde africano. Se estableció en 1962 por científicos japoneses; son susceptibles a una amplia gama de virus y se utilizan ampliamente para desarrollar vacunas y determinación de citotoxicidad para fármacos anticancerígenos.

- **Diurético:**

Fármaco que incrementa el volumen de orina actuando principalmente sobre los riñones y produciendo una pérdida de sales y agua del organismo.

- **Epicarpo:**

Es la capa más externa del fruto, cuya estructura varía de un fruto a otro.

- **Espectroscopía:**

Término general empleado para describir técnicas que se basan en la medición de absorción, emisión, o fluorescencia de la radiación electromagnética.

- **Formazan:**

Precipitado insoluble de coloración morada intensa causada por la reducción de una sal de tetrazolium

- **Inotropo:**

Pertenece a la fuerza o energía de las contracciones musculares, especialmente las del músculo cardíaco. Los agentes inotrópicos aumentan la contractilidad del miocardio.

- **Insuficiencia cardiaca:**

Trastorno en el que el corazón no es capaz de mantener un bombeo de sangre adecuado en relación al retorno venoso y a las necesidades de los tejidos en cada momento.

- **Línea celular:**

Están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las que se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes (*genes anormales del cromosoma, que alteran la estructura normal de la célula*), o con tratamiento con carcinogénicos (*sustancia o elemento capaz de incrementar la tasa de mutaciones naturales*), por lo que les confiere un nuevo fenotipo.

- **Ortotópico:**

Se refiere a algo que ocurre en el lugar normal o habitual del cuerpo. Se usa con frecuencia para describir un tejido u órgano que se transporta a su lugar normal del cuerpo.

ANEXOS

ANEXO N° 1
ESPECTROS INFRARROJOS
(Realizados en KBr)

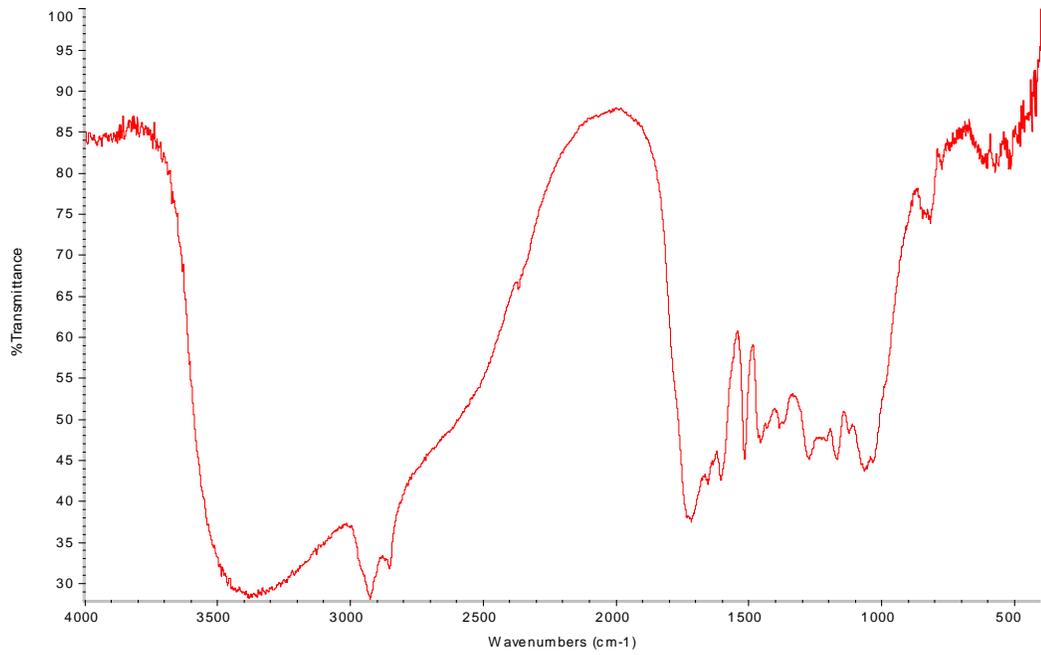


Figura N° 33 Espectro IR de Fracción CP4, flores de *C. procera* en diclorometano.

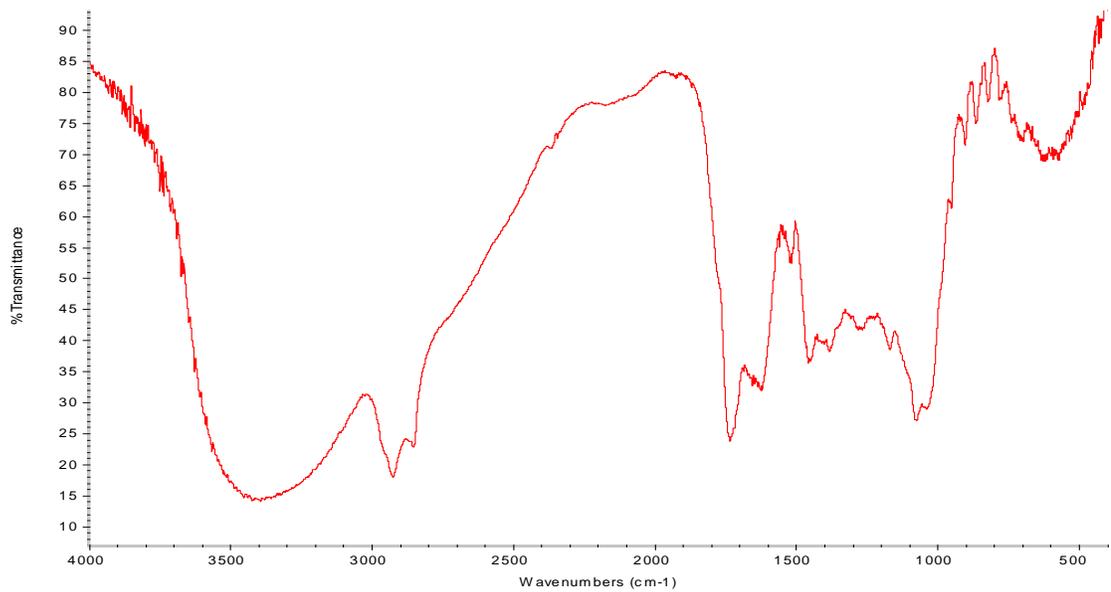


Figura N° 34 Espectro IR de Fracción CP5, semillas de *C. procera* en diclorometano

ANEXO N° 2
ESPECTROS ULTRAVIOLETA
(Realizados en Etanol al 99.9%)

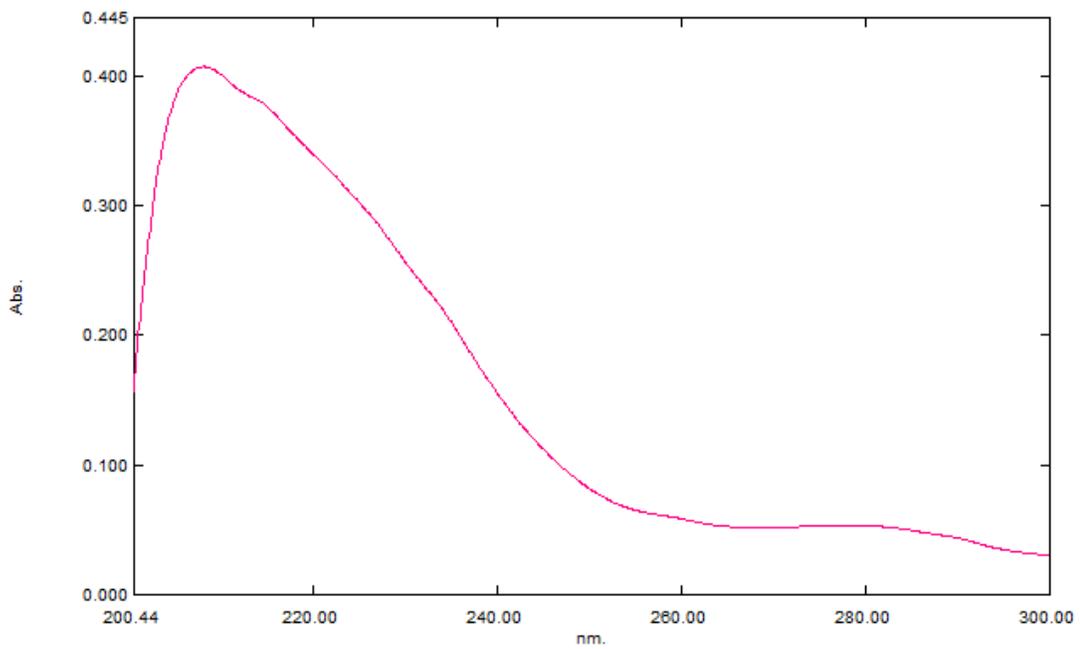


Figura N° 35 Espectro UV de Fracción CP5, semillas de *C. procera* en diclorometano

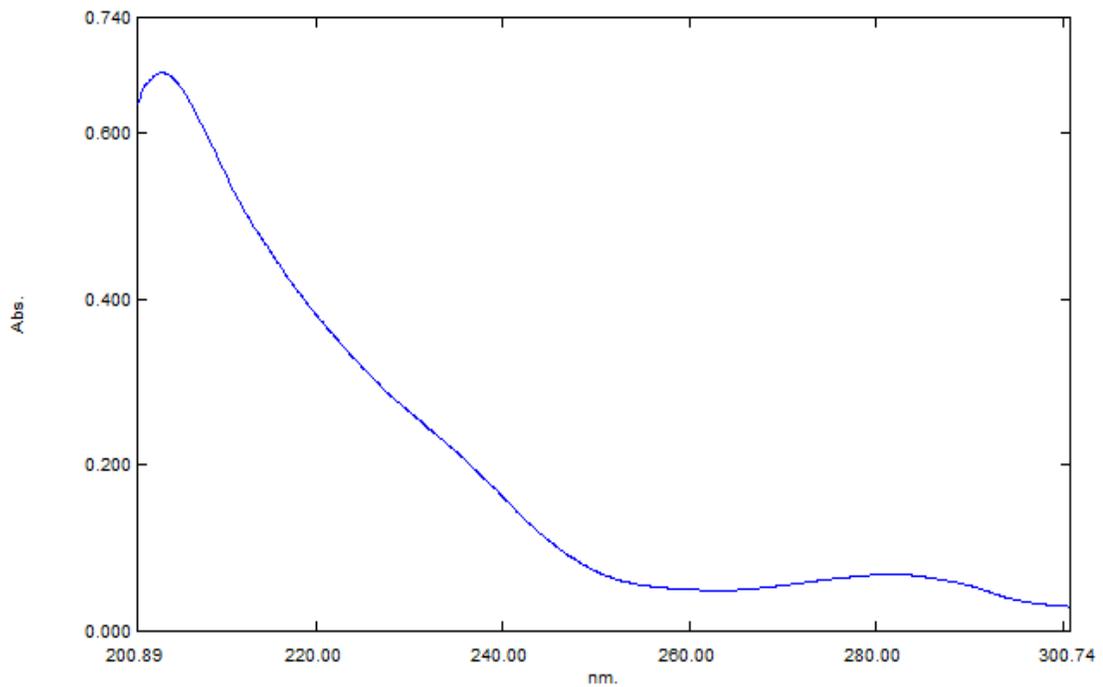


Figura N° 36 Espectro UV de Fracción CP8, semillas de *C. procera* en acetato de etilo

ANEXO N° 3

**RESULTADOS DEL CONTENIDO DE GLICOSIDOS CARDIOTONICOS
EN LAS FRACCIONES, EXPRESADOS COMO DIGOXINA.**

CUADRO N° 14. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones tomando en cuenta todos los datos.

Código	Muestra	Peso de la fracción (g)	Peso de las muestras (mg)	Absorbancia	Factor de dilución	Contenido de Glicósidos Cardiotónicos, expresado como digoxina.	
						Muestras (mg)	Fracción (g)
CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	2.5697	10.0	0.547	20	1.2	0.28
			10.0	0.482		1.0	
			10.0	0.494		1.1	
			10.1	0.480		1.0	
			10.0	0.484		1.0	
CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	3.2361	10.2	0.651	83.3	5.9	1.87
			10.2	0.631		5.7	
			10.3	0.647		5.8	
			10.3	0.649		5.8	
			10.0 ^a	0.738 ^a		6.6 ^a	
CP6	Epicarpo en CH ₂ Cl ₂	6.0698	10.1	0.632	50	2.4	1.92
			10.1	0.601		3.2	
			10.1	0.618		3.3	
			10.2	0.603		3.3	
			10.1 ^a	0.514 ^a		2.8 ^a	
CP7	Flores en AcOEt	0.6527	10.0	0.303	12.5	0.4	0.33
			10.0	0.385		0.5	
			10.0	0.308		0.4	
			10.1 ^a	0.489 ^a		0.7 ^a	
			10.1	0.328		0.4	
CP8	Semillas en AcOET	1.6001	10.3	0.711	50	3.8	0.60
			10.3	0.753		4.0	
			10.3	0.740		4.0	
			10.2	0.688		3.7	
			10.1	0.675		3.6	
CP9	Epicarpo en AcOET	1.2766	10.2	0.543	16.6	1.0	0.11
			10.1	0.462		0.8	
			10.1	0.479		0.9	
			10.2	0.498		0.9	
			10.2	0.488		0.9	

^a datos que están fuera del intervalo de confianza, por lo cual fueron eliminados, trabajando con solo cuatro valores

CUADRO N° 15. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones tomando en cuenta únicamente los valores dentro del intervalo de confianza

Código	Muestra	Peso de la fracción (g)	Peso de las muestras (mg)	Absorbancia	Factor de dilución	Contenido de Glicósidos Cardiotónicos, expresado como digoxina.	
						Muestras (mg)	Fracción (g)
CP4	Flores en CH ₂ Cl ₂	2.5697	10.0 10.0 10.0 10.1 10.0	0.547 0.482 0.494 0.480 0.484	20	1.2 1.0 1.1 1.0 1.0	0.28
CP5	Semillas en CH ₂ Cl ₂	3.2361	10.2 10.2 10.3 10.3	0.651 0.631 0.647 0.649	83.3	5.9 5.7 5.8 5.8	1.84
CP6	Epicarp o en CH ₂ Cl ₂	6.0698	10.1 10.1 10.1 10.2	0.632 0.601 0.618 0.603	50	2.4 3.2 3.3 3.3	1.92
CP7	Flores en AcOEt	0.6527	10.0 10.0 10.0 10.1	0.303 0.385 0.308 0.328	12.5	0.4 0.5 0.4 0.4	0.33
CP8	Semillas en AcOET	1.6001	10.3 10.3 10.3 10.2 10.1	0.711 0.753 0.740 0.688 0.675	50	3.8 4.0 4.0 3.7 3.6	0.60
CP9	Epicarp o en AcOET	1.2766	10.2 10.1 10.1 10.2 10.2	0.543 0.462 0.479 0.498 0.488	16.6	1.0 0.8 0.9 0.9 0.9	0.11

Ejemplo de desarrollo de cálculos para datos que se salen de la media.

Cantidad por muestra analizada, CP5 semillas en diclorometano.

$$CP5-1 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.651)}{0.356} \times 83.3 = 5.9 \text{ mg}$$

$$CP5-2 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.631)}{0.356} \times 83.3 = 5.7 \text{ mg}$$

$$CP5-3 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.647)}{0.356} \times 83.3 = 5.8 \text{ mg}$$

$$CP5-4 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.649)}{0.356} \times 83.3 = 5.8 \text{ mg}$$

$$CP5-5 = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.738)}{0.356} \times 83.3 = 6.6 \text{ mg}$$

Promedio.

$$\bar{X} = \frac{(5.9 + 5.7 + 5.8 + 5.8 + 6.6) \text{ mg}}{5} = 5.9 \text{ mg}$$

Desviación típica estándar.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde:

S: Desviación típica estándar.

$\sum_{i=1}^n$: Sumatoria desde muestra 1 a n número de muestras.

X_i : Muestra individual.

\bar{X} : Promedio de muestras.

n : Número de muestras.

$$S = \sqrt{\frac{[(5.9-5.9)^2 + (5.7-5.9)^2 + (5.8-5.9)^2 + (5.8-5.9)^2 + (6.6-5.9)^2] \text{mg}^2}{(5 - 1)}}$$

$$S = 0.4 \text{ mg}$$

Intervalo de confianza.

$$IC(\mu) = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

IC(μ): Intervalo de confianza.

\bar{X} : Promedio de muestras.

t : t de student.

n-1: Grados de libertad.

S: Desviación típica estándar.

Valor de t para 4 grados de libertad al 95.0% es igual a 2.131846, por lo tanto:

$$IC(\mu) = 5.9 \text{ mg} \pm \left[2.131846 \left(\frac{0.4 \text{ mg}}{\sqrt{5}} \right) \right]$$

$$IC(\mu) = 5.9 \text{ mg} \pm 0.4 \text{ mg} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{Limite inferior} = 5.5 \text{ mg} \\ \text{Limite superior} = 6.3 \text{ mg} \end{array} \right.$$

El intervalo de confianza excluye al quinto valor (6.6 mg en 10mg de muestra, con Absorbancia de 0.738); por lo que se repiten los cálculos, para tener mayor exactitud y precisión en la cuantificación de cada fracción.

Cantidad por muestra analizada.

$$\text{CP5-1} = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.651)}{0.356} \times 83.3 = 5.9 \text{ mg}$$

$$\text{CP5-2} = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.631)}{0.356} \times 83.3 = 5.7 \text{ mg}$$

$$\text{CP5-3} = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.647)}{0.356} \times 83.3 = 5.8 \text{ mg}$$

$$\text{CP5-4} = \frac{(0.0385 \text{ mg/mL})(0.649)}{0.356} \times 83.3 = 5.8 \text{ mg}$$

Promedio.

$$\bar{X} = \frac{(5.9 + 5.7 + 5.8 + 5.8) \text{ mg}}{4} = 5.8 \text{ mg}$$

Desviación típica estándar.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{[(5.9-5.9)^2 + (5.7-5.9)^2 + (5.8-5.9)^2 + (5.8-5.9)^2] \text{mg}^2}{(4 - 1)}}$$

$$S = 0.1 \text{ mg}$$

Intervalo de confianza.

$$\text{IC}(\mu) = \bar{X} \pm t_{n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Valor de t para 3 grados de libertad al 95.0% es igual a 2.353363, por lo tanto:

$$\text{IC}(\mu) = 5.8 \text{ mg} \pm \left[2.353363 \left(\frac{0.1 \text{ mg}}{\sqrt{4}} \right) \right]$$

$$\text{IC}(\mu) = 5.8 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg} \quad \begin{array}{l} \text{Limite inferior} = 5.7 \text{ mg} \\ \text{Limite superior} = 5.9 \text{ mg} \end{array}$$

ANEXO N° 4

**CARTA DE AUTENTICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EXTENDIDA
POR UN BOTANICO EXPERTO**



Antiguo Cuscatlán, lunes 8 de febrero de 2010

A quien interese:

Por este medio se hace constar que los alumnos Miriam Romero Arévalo y Jorge Denis Martínez se hicieron presente a las instalaciones de nuestro herbario solicitando la confirmación en la identificación de una especie arbustiva.

Después de revisar la muestra se confirma que pertenece a la especie *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton de la familia *Esclerpiadaceae*.

Y para los usos que los interesados estimen convenientes, se extiende esta carta de confirmación.

Lic. Jorge Alberto Monterrosa Salomón
Sección Técnica Científica
Herbario LAGU
Curador

