

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* DE LOS
GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS DE LOS FRUTOS DE *Thevetia ahouia*
(COJÓN DE COSTA DE HOJAS LARGAS) Y *Thevetia peruviana* (CHILCA)
FAMILIA APOCYNACEAE.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JOSÉ ARNOLDO CAMPOS PANIAGUA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE DE 2009

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, Microbiológicos.

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

Docentes Directores

Dr. Marvin José Núñez Rivas

Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de graduación no sería hoy en día una realidad sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que deseo agradecer sinceramente su colaboración. A mis docentes directores, Dr. Marvin J. Núñez y Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, por toda la ayuda, paciencia, tiempo y apoyo. Por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos, de compartir sus conocimientos científicos y su amistad. A la coordinadora general y asesoras de área, Licda. María Odette Rauda, MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez. y Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza, por ser objetivas en sus evaluaciones, por su tiempo y dedicación en el desarrollo y culminación del presente trabajo. A la vez también expresar gratitud a la MSc. Morena Martínez, Licda. Fátima Sánchez, Doc. Néstor Orellana, Dra. Laila Moujir, entre otros, por sus consejos, ayuda y conocimientos. A los amigos (as) que he conocido en todos estos años y con los que he compartido trabajo y amistad. Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en esta investigación. Mis más sinceros agradecimientos.

José Arnoldo Campos Paniagua

DEDICATORIA

El Señor creo las plantas medicinales que brotan de la tierra: un hombre inteligente no las menosprecia. Él da a los hombres la ciencia para que lo glorifiquen por los maravillosos remedios que creo. Con los remedios El Señor sana y alivia de la enfermedad, y el farmacéutico hace con ellos sus mezclas.

Eclesiástico 38: 4, 6-7

PRIMERO A DIOS: en quien todo es posible, en Él encontré la sabiduría y entendimiento, fue Él quien me dio la fortaleza y paciencia para poder culminar mi carrera.

A MIS PADRES ARNOLDO CAMPOS AGUILAR Y ROSA MARÍA PANIAGUA DE CAMPOS: por estar allí con sus consejos oportunos, su amor incondicional y sus oraciones que han llegado a la misericordia de Dios.

A MIS HERMANAS: Karla Cecilia y Ana Lidia por su respeto, cariño, apoyo y comprensión que cada una me ha brindado de corazón.

Personas importantes: que fueron parte esencial para realizar este trabajo: FÁTIMA, ABUELITOS, TIOS Y demás familia, y a cada uno de los docentes que formaron parte activa en mi formación académica, amigos(as), compañeros(as), que colaboraron con mi persona de forma directa o indirecta. Gracias.

José Arnoldo Campos Paniagua.

INDICE

Página N°

RESUMEN

CAPITULO I

1.0 Introducción

xix

CAPITULO II

2.0 Objetivos

CAPITULO III

3.0 Marco teórico

24

3.1 Generalidades sobre Glicósidos Cardiotónicos.

24

3.2 Generalidades de las especies a estudiar.

27

3.2.1 Generalidades de *Thevetia ahouia*.

27

3.2.1 Generalidades de *Thevetia peruviana*.

29

3.3 Generalidades del cáncer.

33

3.3.1 Actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos

34

3.4 Generalidades de métodos de extracción, fraccionamiento y separación de productos naturales.	39
3.4.1 Métodos extractivos a partir de la droga.	40
3.4.2 Generalidades de cromatografía.	44
3.4.2.1 Cromatografía en capa fina.	45
3.5 Elucidación estructural.	47
3.5.1 Espectroscopia infrarroja (I.R).	47
3.5.2 Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS)	49
3.5.3 Resonancia magnética nuclear (RMN).	50
3.5.3.1 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H)	52
3.6 Generalidades sobre cultivos celulares.	54
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	59
4.1 Tipo de estudio.	59
4.1.1 Investigación bibliográfica.	59
4.1.2 Investigación de campo.	60

4.1.3 Investigación de laboratorio.	61
4.1.3.1 Parte experimental.	61
4.1.3.1.1 Preparación de las muestras a investigar.	62
4.1.3.1.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de los epicarpos y semillas de <i>Thevetia ahouia</i> y <i>Thevetia peruviana</i> .	63
4.1.3.1.3 Obtención de las fracciones	63
4.1.3.1.4 Análisis por cromatografía de capa fina.	64
4.1.3.1.5 Análisis espectroscópico.	66
4.1.3.1.6 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos.	66
4.1.3.1.7 Determinación de la actividad anticancerígena.	67

CAPITULO V

5.0 Resultados y discusión de resultados	70
--	----

CAPITULO VI

6.0 Conclusiones	91
------------------	----

CAPITULO VII

7.0 Recomendaciones	94
---------------------	----

8.0 Bibliografía	97
------------------	----

Glosario	106
----------	-----

Anexos	110
--------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°	Página N°
1. Ejemplo de un glicósido cardenólido.	25
2. Ejemplo de glicósido bufadienólido.	26
3. a) Flor y hojas de <i>Thevetia ahouia</i> ; b) fruto de <i>Thevetia ahouia</i> .	28
4. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de <i>Thevetia ahouia</i>	29
5. a) Flor y frutos. b) epicarpo y semilla de <i>Thevetia peruviana</i> .	31
6. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de <i>Thevetia peruviana</i> .	32
7. Glicósidos bufadienólidos tipo rhamnosido (1-3), obtenidos de los rizomas de <i>Helleborus orientalis</i> .	35
8. Estructura de la Calactina.	36
9. Glicósidos cardiotónicos aislado de la corteza de las raíces de <i>Calotropis procera</i> .	37
10. Compuestos aislados de los tallos y brotes de <i>Nerium oleander</i> .	38
11. Proceso de maceración de raíces de <i>Ambrosia cumanensis</i> .	43

12. Aparato de digestión. Macro Kjeldahl.	43
13. Cromatografía en capa fina: cámara de separación.	46
14. (a) Cámara UV.	46
(b) Cámara de revelado.	
(c) cromatografía de capa fina revelada.	
15. Espectro IR de la 20- α -hidroxitingenona.	48
16. Espectro ultravioleta-visible de la 20- α -hidroxitingenona.	50
17. Espectro de RMN- ^1H de la 20 β -hidroxitingenona.	53
18. Esquema de trabajo.	61 – 62
19. Estructura de la digitoxigenina.	65
20. Estructura de la digoxina.	66
21. Fracciones con presencia de glicósidos cardiotónicos.	71
22. Espectro IR de la digitoxigenina (testigo).	74
23. Espectro IR de fracción 1, Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en CH_2Cl_2 .	74
24. Espectro UV de la digitoxigenina (testigo).	76
25. Espectro UV fracción 1, Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en CH_2Cl_2 .	76

26. Espectro de RMN-¹H de la digitoxigenina (COCl₃, 500 MHz). 79
27. Espectro de RMN-¹H de fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH₂Cl₂ (D₂O, 500 MHz). 80
28. Placa cromatográfica revelada con reactivo de Kedde (manchas de color violeta presencia de glicósidos cardiotónicos).
29. Placa cromatográfica revelada con reactivo Baljet (Manchas de color naranja presencia de glicósidos cardiotónicos).
30. Espectro IR de la fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH₂Cl₂.
31. Espectro IR de fracción 5, Epicarpo de *T. Peruviana* en CH₂Cl₂.
32. Espectro UV de la fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH₂Cl₂.
33. Espectro UV de la Fracción 7, Semillas de *T. peruviana* en CH₂Cl₂.
34. Espectro de RMN-¹H Digoxina (MeOD, 500 MHz).
35. Espectro de RMN-¹H de fracción 7, semilla de *T. peruviana* en CH₂Cl₂ (D₂O, 500 MHz).

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Página N°
1. Desplazamiento químico más representativo en RMN- ¹ H para glicósidos cardiotónicos.	54
2. Peso del material vegetal seco.	70
3. Resultado de la evaluación cromatográfica, de los diferentes fracciones procedentes de los epicarpós y semillas de <i>Thevetia ahouia</i> y <i>T. peruviana</i> .	72
4. Bandas de absorción en Infrarrojo, más característica en glicósido cardiotónicos presentes en cada una de las fracciones y testigos (espectros realizados en acetona).	75
5. Absorbancia y longitud de onda máxima en ultravioleta de cada una de las fracciones y testigo (espectros realizados en etanol).	77
6. Desplazamiento químico de las fracciones y testigos en los espectros de RMN- ¹ H.	78
7. Datos del estándar.	81
8. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones.	84

9. Porcentaje de glicósidos cardiotónicos de cada fracción.	86
10. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en epicarpo y semilla de <i>Thevetia ahouia</i> y <i>T. peruviana</i> .	86
11. Resultado de la actividad anticancerígena en cada unas de las fracciones.	88
12. Resultados de la prueba de contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina.	

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo N°

1. Placas de cromatografía en capa fina reveladas con reactivo de Kedde y Baljet.
2. Espectro Infrarrojo, realizado en acetona.
3. Espectro Ultravioleta, realizado en etanol.
4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protón.
5. Técnica modificada para la determinación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina.
6. Resultados del contenido de glicósidos cardiotónicos en las fracciones, expresados como digoxina.
7. Materiales, equipos, reactivos y solventes.
8. Investigación de géneros *Thevetia* como una fuente de nuevos fármacos anticancerígenos.

RESUMEN

Los glicósidos cardiotónicos son un grupo de productos naturales formados por una o varias unidades de azúcar y un núcleo esteroideo unido a un anillo lactónico insaturado, comúnmente utilizados en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, para incrementar la fuerza de contracción del corazón. En la actualidad existen estudios que reportan a los glicósidos cardiotónicos como prometedores anticancerígenos. Tomando en cuenta dichos antecedentes, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo principal es investigar la actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos de dos especies de Apocynaceae: ***Thevetia ahouia*** y ***Thevetia peruviana***. Estas especies son arbustos que se distribuyen en América central, México, Sur América y otros países con clima tropical.

En el análisis fitoquímico se determinó la presencia de glicósidos cardiotónicos, por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (ultravioleta, infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón), detectándose en ocho fracciones, obtenidas de los epicarpos y de semillas de las especies en estudio. A éstas se les determinó el contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, donde se obtuvo en mayor porcentaje de estos metabolitos en los frutos de ***Thevetia ahouia***. A la vez se determinó la actividad anticancerígena *in vitro*, frente a tres líneas celulares: MCF7 (adenocarcinoma humano de mama), HeLa (carcinoma humano de cuello uterino) y A-549 (cáncer humano de pulmón), además se utilizaron las células Vero (células

normales) para determinar el grado de citotoxicidad de cada una de las fracciones analizadas. Las fracciones más activas fueron las siguientes: fracción semillas de *Thevetia peruviana* en diclorometano, frente a las líneas HeLa y MCF-7; fracciones de semillas de *Thevetia ahouia* en diclorometano, semillas de *Thevetia ahouia* en acetato de etilo, epicarpós de *Thevetia peruviana* en diclorometano, semillas de *Thevetia peruviana* en diclorometano y semillas de *Thevetia peruviana* en acetato de etilo frente a la línea celular A-549; cuyos valores resultaron ser incluso menores que la mercaptopurina, utilizada como control positivo. Sin embargo, solamente las fracciones de semillas de *Thevetia ahouia* en acetato de etilo y de semillas de *Thevetia peruviana* en acetato de etilo presentan toxicidad media y débil, respectivamente frente a la línea celular normal (Vero), convirtiéndose éstas en las más prometedoras como agentes anticancerígenos frente al cáncer humano de pulmón.

Donde se debe de continuar con el fraccionamiento de cada una de las muestras con presencia de glicósidos cardiotónicos que mostraron actividad anticancerígena para así obtener a los compuestos responsables de esta actividad, además de continuar con la búsqueda de especies ricas en estos metabolitos. A la vez se debe dar a conocer a la población de los efectos tóxicos de estas especies principalmente porque son utilizadas como plantas ornamentales.

**CAPITULO I
INTRODUCCIÓN**

1.0 INTRODUCCIÓN.

Los glicósidos cardiotónicos, son un grupo de compuestos naturales, que derivan biogenéticamente del colesterol y han sido extensamente utilizados en el tratamiento de algunas enfermedades cardiacas ⁽³⁵⁾.

Se encuentran distribuidas principalmente en las Familia Scrophulariaceae, Apocynaceae, Asclepiadáceae, Liliaceae y Moraceae ⁽³⁵⁾.

Además de la acción sobre el músculo cardíaco, hoy en día se ha demostrado, que presentan actividad anticancerígena, dirigiéndose los nuevos estudios hacia esta actividad ^(19, 28, 31, 38, 39).

En el presente trabajo se estudiarán las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, procedentes de los extractos hidroalcohólicos de los frutos de ***Thevetia ahouia*** (cojón de costa de hojas largas) y ***Thevetia peruviana*** (chilca), en la búsqueda de glicósidos cardiotónicos; los cuales se determinarán por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando los agentes reveladores de Kedde y Baljet; usando la digitoxigenina como testigo para la detección de los glicósidos cardiotónicos en las diferentes fracciones.

Las fracciones que presenten glicósidos cardiotónicos, se les realizará espectros de Infrarrojo (IR), Ultravioleta (UV) y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN-¹H), además se determinará el contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina ⁽⁷⁾, y se les determinará la actividad

anticancerígena *in vitro* en las líneas celulares de carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), cáncer humano de pulmón (A-459) y adenocarcinoma humano de mama (MCF-7).

El estudio fitoquímico y la determinación del contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina ⁽⁷⁾ se llevarán a cabo en el Laboratorio de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales; los espectros de Ultravioleta y de Infrarrojo se realizarán en la escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y la determinación de la actividad anticancerígena *in vitro* se llevarán a cabo en el Instituto de Bio-orgánica “Antonio Gonzales” y en el departamento de Microbiología y Biología, de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

De esta forma se contribuirá a la búsqueda de nuevos fármacos 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.

Determinar la actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos procedentes de los frutos de *Thevetia ahouia* (cojón de costa de hojas largas) y *Thevetia peruviana* (chilca).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.

2.2.1 Obtener los extractos hidroalcohólicos del epicarpo y semillas de los frutos de *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*.

2.2.2 Obtener las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, a partir de los extractos hidroalcohólicos del epicarpo y semilla de *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*, por medio de partición líquida.

2.2.3 Identificar los glicósidos cardiotónicos en las diferentes fracciones mediante pruebas químicas y espectroscópicas.

2.2.4 Realizar e interpretar los espectros de Ultravioleta, Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de las fracciones que presentan glicósidos cardiotónicos.

2.2.5 Determinar el contenido de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones que presenten estos metabolitos.

2.2.6 Determinar la actividad anticancerígena *in vitro* en las fracciones que contengan glicósidos cardiotónicos.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO.

3.1 GENERALIDADES SOBRE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

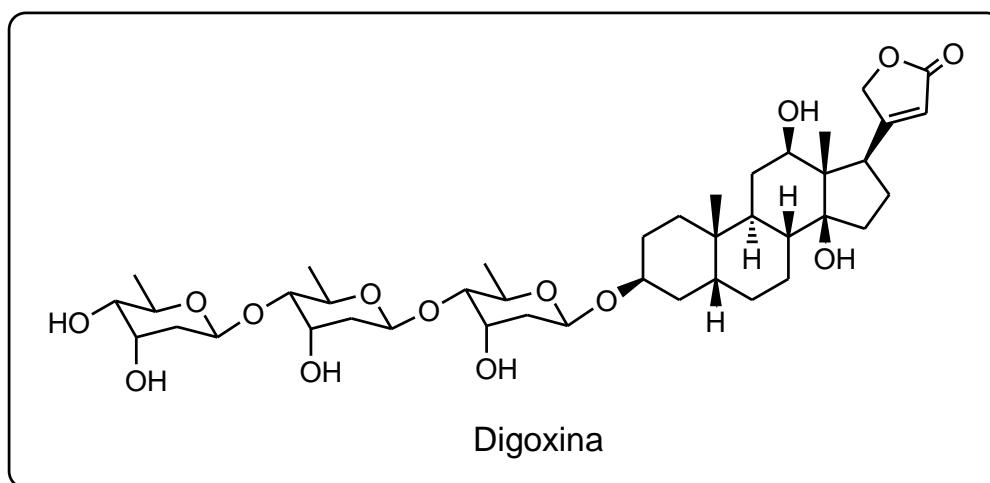
Los glicósidos cardiotónicos son un grupo de productos naturales, que actúan directamente sobre el miocardio y la circulación auriculo ventricular. De los más de 300 glicósidos cardiotónicos aislados hasta la fecha, digoxina y digitoxina son las más utilizadas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y de determinadas arritmias ^(30, 36).

Su distribución en la naturaleza está restringida a un número reducido de familias botánicas, principalmente aquellas estrechamente relacionadas a Apocynaceae (géneros *Nerium*, *Strophantus* y *Thevetia*) y Asclepiadaceae (*Asclepias*), apareciendo curiosamente en este último género en el látex. Además se encuentran en otras familias de dicotiledóneas: Cruciferaeae (*Erysimum*), Moraceae (*Antiaris*), Esclophulariaceae (*Digitalis*), Celastraceae (*Euonymus*) y entre algunas monocotiledóneas especialmente en las Liliaceae (*Urginea*) ⁽³⁰⁾. Los glicósidos cardiotónicos están formados por una parte glicósídica constituida por una o varias unidades de azúcar y un núcleo esteroideo unido a un anillo lactónico insaturado. El sistema tetracíclico deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno, posee un grupo OH en posición beta en carbono 14 y una unión *cis* entre los anillos A y B y entre los anillos C y D, y *trans* entre los anillos B y C; el anillo lactónico en posición beta en carbono 17 del núcleo esteroidal puede ser de 5 o 6 miembros, lo cual permite su

clasificación. La parte glicósidica contiene en ocasiones azúcares que sólo se encuentran formando parte de estos glicósidos cardiotónicos, como los 2,6-desoxiazúcares (digitoxosa y cimarosa) o los 6-desoxiazúcares (ramnosa, fucosa y digitalosa). Hay azúcares metilados, es decir, con OH en forma de éter (cimarosa y digitalosa) y también se encuentra azúcares acetilados. La actividad de los glicósidos cardiotónicos está directamente relacionada con su estructura ^(15, 36).

Los glicósidos cardiotónicos pueden clasificarse en dos grupos.

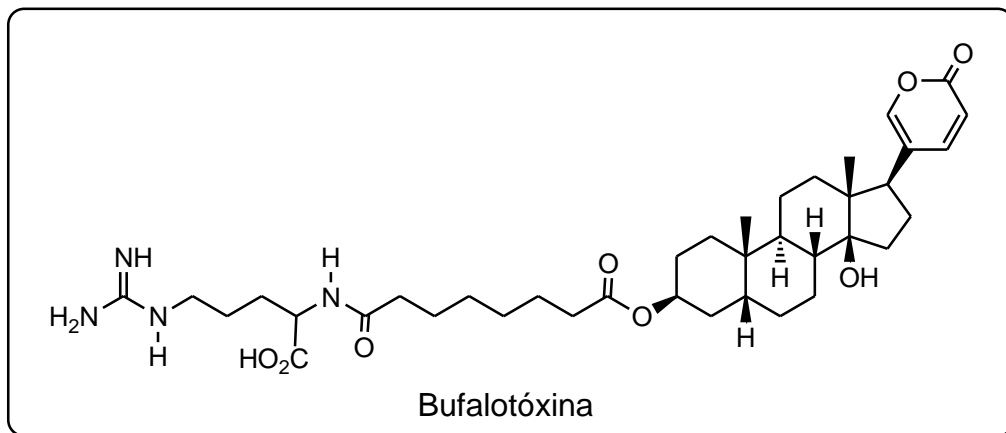
- Cardenólidos (C 23): poseen una lactona insaturada de cinco miembros (pentagonal) en la posición 17 del núcleo esteroidal ⁽¹⁸⁾. Ej.: digoxina.



Fig

ura N° 1. Ejemplo de un glicósido cardenólido.

- Bufadienólidos (C 24): poseen una lactona insaturada de seis miembros



(hexagonal) en la posición 17 del núcleo esteroidal ⁽¹⁴⁾. Ej.: bufalotóxina.

Figura N° 2. Ejemplo de glicósido bufadienólido.

La actividad cardíaca se debe principalmente a la genina mientras que la porción azucarada incrementa su polaridad modificando la intensidad y duración del 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 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 que es característica de la insuficiencia cardíaca ⁽¹⁵⁾.

3.2 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES A ESTUDIAR.

3.2.1 Generalidades de *Thevetia ahouia*.

Nombre común: Huevo de gato, Cojón de tigre, Cojón de costa de hojas largas.

Nombre científico: *Thevetia ahouia*.

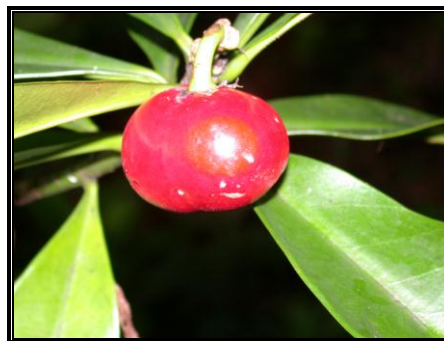
Familia: Apocynaceae.

Referencias de herbario (Jardín Botánico La Laguna): E. Sandoval 27.1.1.1997 (MS-00350) (B, INB, LAGU).

Descripción: Arbusto de 2 a 8 m de altura y de 5 a 10 cm de diámetro. Copa irregular y con follaje disperso. Tronco ramificado a baja altura o partir de la base. Corteza exterior blanca o grisácea. Ramas terminales de color verde. El desprendimiento de cualquier parte de la planta produce el flujo de un exudado lechoso. Hojas simples y alternas, concentradas al final de las ramas, de 6 a 25 cm de largo y de 3 a 7 cm de ancho, oblanceoladas, con ápice acuminado, bordes enteros y base cuneada. Pecíolos de 0.3 a 0.6 cm de largo, generalmente con glándulas escamiformes en la base. Inflorescencias en cimas terminales. Flores de color amarillo pálido. Frutos en bayas globosas de 3 a 4 cm de diámetro, verdes, tornándose rojos al madurar ⁽¹⁾.



a)



b)

Figura N° 3. a) Flor y hojas de *Thevetia ahouia*; b) fruto de *Thevetia ahouia*.

Localización: se han reportado especímenes en América Central, México, Sur América y Asia. La especie crece a bajas elevaciones, en climas secos o húmedos, en bosques pantanosos o inundables, a veces a orillas de caminos y carreteras. Florece y fructifica durante todo el año, principalmente a inicios de la estación lluviosa ⁽¹⁾.

Usos etnobotánicos: presentan cierta actividad antiinflamatoria y antifúngica contra *Fusarium oxysporum* ⁽³¹⁾.

Composición química: se ha reportado el aislamiento de: thevetiogenina, 3-O-D-gentiobiosil - (1 - 4) - α - L-rhamnopiranosido, thevetiogenina 3-O- β -D-glucopiranosil - (1 - 4) - α - L - rhamnopiranosido, digitoxigenina 3-O- β -D-glucopiranosil - (1 - 4) - α - L - acofriopiranosido y digitoxigenina 3-O- β -D-glucopiranosil - (1 - 4) - 2''-O-acetil - α - L- thevetopiranosido, neriifolina, 3'-O-methilevomonosido y 2' - acetil - neriifolina ^(4, 8, 14).

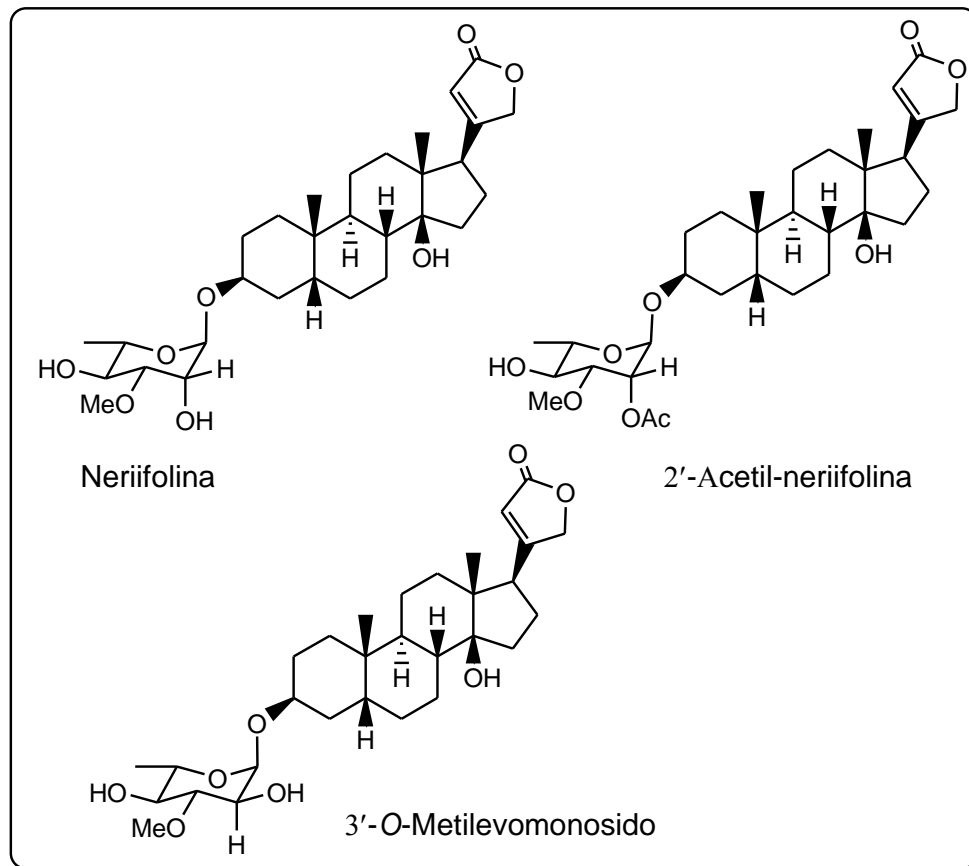


Figura N° 4. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de *Thevetia ahouia*.

3.2.2 Generalidades de *Thevetia peruviana*

Nombre común: Chilca, Chilindrón, Covadonga, Covalonga, Codo de fraile, Chira, Naranja amarillo, Yoyote, Caballón, Campanilla muerta, Pepa de cruz, Lengua de gato, Yellow oleander ⁽⁴⁾.

Nombre científico: *Thevetia peruviana*

Familia: Apocynaceae

Referencia de herbario (Jardín Botánico La Laguna): J. Flores S.N (JBL-00526) (LAGU, MO).

Descripción botánica: Arbusto de hasta 10 metros de altura, hojas alternas, 1-nervias, lineales, de 7 a 15 cm de longitud, y de 5 a 10 mm de ancho, casi sésiles, color verde brillante, y lustrosa en la cara superior, más bien mate en la inferior, nervio central prominente y la nervación lateral oscura. Flor con 5 cáliz partido multiglandularmente en la base, los segmentos de 7 mm de largo, lanceolado-oavados y acuminados. Corola amarilla de 7 cm de largo, funeliforme, con el tubo más corto que el limbo, cilindro en la parte inferior, portando escamas con pelos, en la parte superior, expandido abruptamente en un cuello campanulado, y 5 anchos lóbulos sinistrorsos. Estambres insertos con las escamas en el extremo superior del tubo, saco de antenas noapendiculares. Disco nulo. Ovario 2-lobado, 2-locular, estilo filiforme, estigma discoideo, su pequeña punta 2-lobada, 2 óvulos en cada cavidad del ovario. Fruto, una drupa triangular comprimida de 3-4 cm de ancho con 2 cm de largo, y de 1 a 1.5 cm de grosor, casi truncada, la carne delgada, el endocarpio óseo, 2-locular. Semilla con una testa gruesa y sin endospermo ⁽⁴⁾.



Figura N° 5. a) Flor y frutos; b) epicarpo y semilla de *Thevetia peruviana*.

Localización: Se localiza en América Central, México, la Florida, las Antillas Mayores, algunas de las menores, Sur América y Sur África ^(2, 5, 10, 17, 19, 35, 37, 38).

Usos etnobotánicos: Febrífugos, catártico, emético, antiartrítico, para conciliar el sueño, pérdida de peso; el látex se utiliza para el tratamiento de la sordera, la sarna, las úlceras, dolores de muela, tumores y hemorroides ⁽⁴⁾.

Toxicidad: Toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos. La inhalación, ingestión o contacto con las mucosas, con la savia o extractos de la planta puede causar muchas reacciones adversas. En este sentido diversos autores han referido irritación de las mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y auriculo-ventricular), como resultado de la ingestión ⁽⁴⁾.

Composición química: contiene glicósidos cardiotónicos como: thevetina A, thevetina B, thevetoxina, peruvosido, ruvosido, neriifolina, thevefolina, cerberina, peruvosido 2'- monoacetato, acetilthevetina B, tevenerina, cerberosido, glucoperuvosido, thevebiosido, acetilneriifolina, perusitina, acetilthevetina B, acetilthevebiosido B y el diacetato de la nerifolina (2, 5, 10, 17, 19, 35, 37, 38)

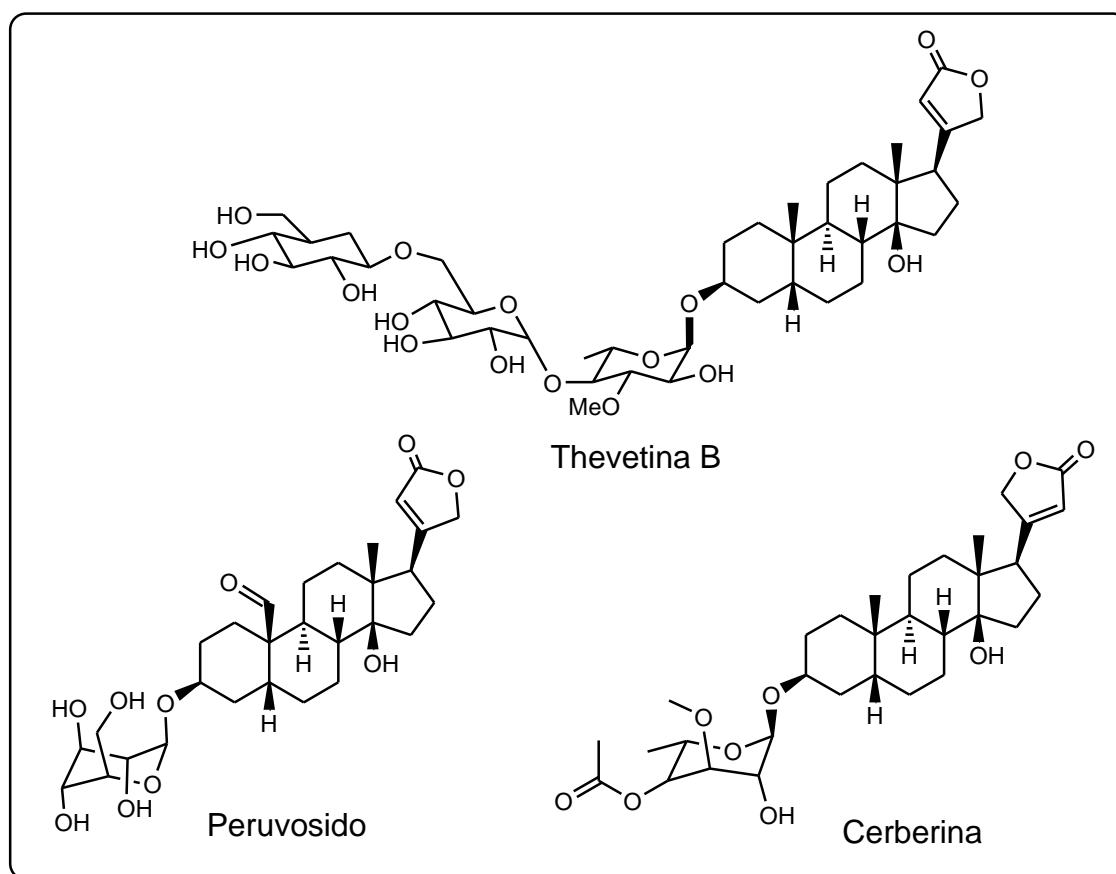


Figura N° 6. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de *Thevetia peruviana*.

3.3 GENERALIDADES DEL CANCER.

El cáncer se considera como el crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continúa de células anormales que produce una enfermedad. Existen numerosos tipos cánceres, entre los que destacan 3 subtipos principales (13, 18, 34).

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, digestivo o 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 (13, 18, 34).

3.3.1 ACTIVIDAD ANTICANCÉRIGENA DE LOS GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

El uso de agentes químicos citotóxicos que destruyan las células cancerosas ha constituido la gran esperanza en el tratamiento del cáncer desde hace varias décadas. 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 (19, 26, 30, 31, 39).

Los glicósidos cardiotónicos además de su acción cardiovascular, se le ha demostrado su acción citotóxica, a concentraciones más bajas que las utilizadas en el tratamiento cardiovascular (19, 26, 30, 31, 39).

De las raíces de *Thevetia neriifolia* se aislaron tres cardenólidos citotóxicos, digitoxigenina, neriifolina y evomonosido. Los cuales mostraron actividad citotóxica frente a seis líneas celulares de cáncer. Aparentemente este el primer reporte de aislamiento de cardenólido de raíces de esta planta, además del ensayo citotóxico de la neriifolina (6).

Watanabe y otros en 2003, ensayaron tres glicósidos bufadienólidos tipo rhamnosido (1-3), obtenidos de los rizomas de *Helleborus orientalis*, frente a cuatro líneas celulares: carcinoma de células escamosas (HSC-2), melanoma de células humanas (A375), hepatoma humano (HepG2) y células normales

humanas. Los glicósidos bufadienólidos exhibieron potente citotoxicidad frente a HSC-2 y A375 (mostrando particular sensibilidad), pero resistente a HPG2 ⁽³⁸⁾.

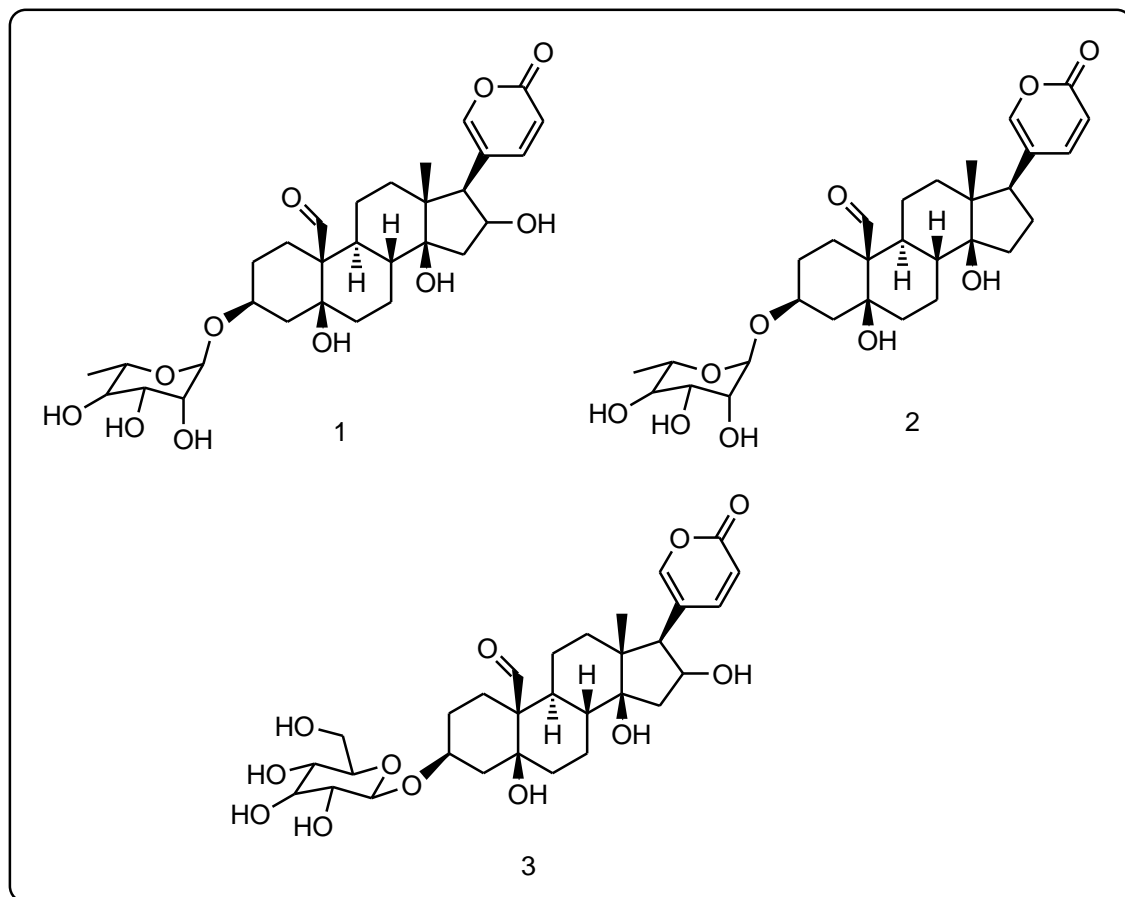


Figura N° 7. Glicósidos bufadienólidos tipo rhamnósido (**1-3**), obtenidos de los rizomas de *Helleborus orientalis*.

De las raíces y partes aéreas de *Asclepias curassavica*, se aislaron 18 glicósidos cardenólidos, la mayoría de estos mostraron pronunciada citotoxicidad frente a cuatro líneas celulares (IC_{50} de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$). Las líneas celulares ensayadas fueron carcinoma de pulmón A549, dos carcinoma humanos de mama MCF-7 y MDA-MB-231 y hepatoma humano HepG2. Entre

los cardenolidos, la calactina mostro la más potente actividad con un IC_{50} de 2.9 $\mu\text{g/mL}$ ⁽³²⁾.

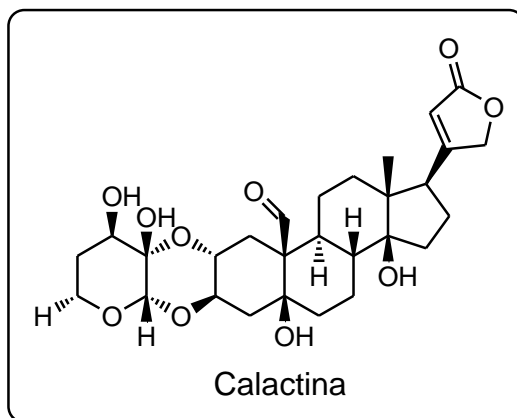


Figura N° 8. Estructura de la Calactina.

Del análisis realizado al extracto etanólico de la corteza de raíz de ***Calotropis procera***, se aisló un nuevo cardenolido denominado 2"-oxovuscharina; además se obtuvieron por hemisíntesis, veintisiete compuestos cardenólidos; los productos naturales y de hemisíntesis fueron ensayados frente a 57 líneas celulares. El producto 23 mostró una actividad antitumoral *in vitro* similar al taxol y mayor que el SN-38 (metabolito más activo del irinotecan), dos de los fármacos más potentes utilizados en el combate del cáncer ⁽²⁹⁾.

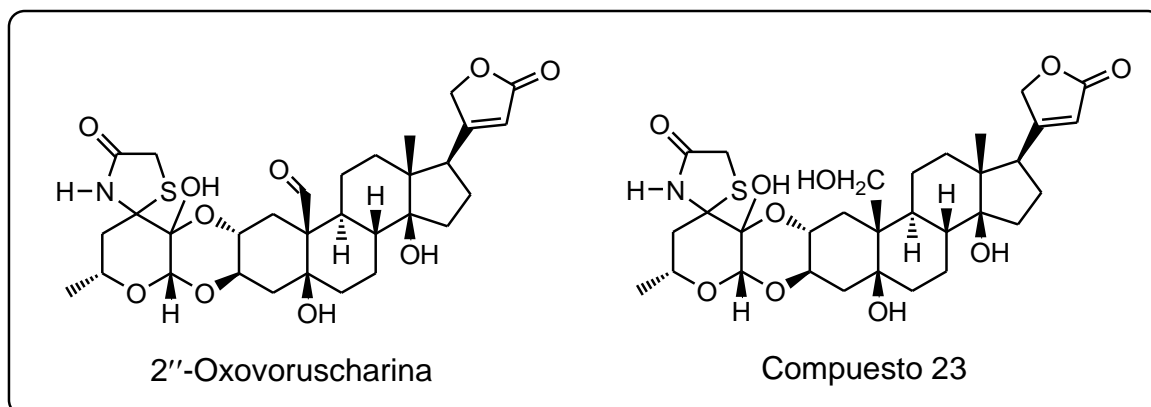


Figura N^o 9. Glicósidos cardiotónicos aislados de la corteza de las raíces de ***Calotropis procera***.

Recientemente, se aislaron del tallo y brotes de ***Nerium oleander***, cuatro nuevos cardenólidos (N-1 a N-4), además de ocho conocidos cardenólidos. Estos compuestos fueron evaluados frente a tres líneas celulares humanas, células normales de fibroblastos humanos (WI - 38), células de tumor maligno inducidos por WI-38 (VA-13) y células de hepatoma humano (HepG2). Los compuestos **12** y **13** exhibieron una actividad citotóxica de 0.16 y 0.17 μM frente a las células VA-13, respectivamente; el compuesto **1** (n-1) presentó un efecto inhibitorio de 0.14 μM frente a las células HepG2 ⁽⁴⁰⁾.

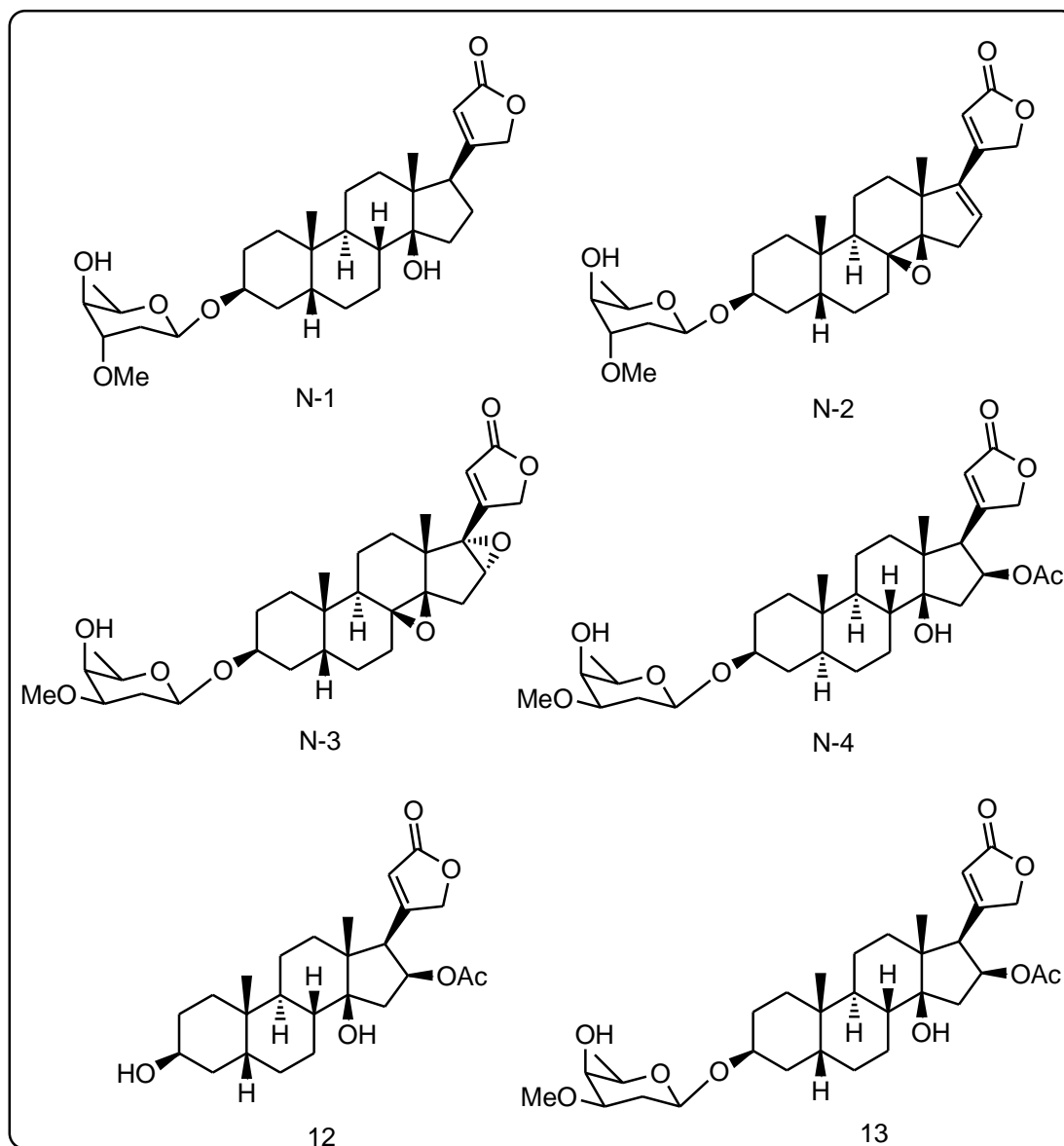


Figura N° 10. Compuestos aislados de los tallos y brotes de *Nerium oleander*.

3.4 GENERALIDADES DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, FRACCIONAMIENTO Y SEPARACIÓN DE PRODUCTOS NATURALES.

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 (15 36).

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:

- Composición química.
- La búsqueda de una actividad biológica concreta.
- Basada en la combinación de criterios.

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 activos.

- d) Deseccación 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 ^{(15,}

³⁶⁾•

3.4.1 MÉTODOS EXTRACTIVOS A PARTIR DE LA DROGA.

Se parte la droga y se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos. Existen varios métodos extractivos, 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 poner en contacto 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 ^(15, 36)•

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

1. Característica de la droga:

- Drogas desecadas y molidas para facilitar el máximo contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente ^(15, 36).

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, y los extractos ácidos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados ^(15, 36).

3. Temperatura:

- El aumento de la temperatura favorece la extracción de los metabolitos secundarios (se debe tener precaución con los metabolitos 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) (15, 36).

- 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 (15, 36).



Figura N° 11. Proceso de maceración de raíces de *Ambrosia cumanensis*.

Digestión:

- Es un método extractivo similar a la maceración pero que se trabaja a temperaturas más elevadas (no llegando a temperatura de ebullición) ^(15, 36).



Figura N° 12. Aparato de digestión. Macro Kjeldahl.

3.4.2 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 ⁽³⁶⁾.

La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación. ⁽³⁶⁾

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.

- a) Dependiendo de la naturaleza de la fase móvil y la estacionaria se clasifican:
 1. Cromatografía sólido-líquido.

2. Cromatografía líquido-líquido.
3. Cromatografía líquido-gas.
4. Cromatografía sólido-gas ⁽³⁶⁾.

b) Clasificación según el mecanismo de separación:

1. Cromatografía de adsorción.
2. Cromatografía de reparto.
3. Cromatografía de intercambio iónico.
4. Cromatografía de exclusión.
5. Cromatografía de afinidad.
6. Cromatografía de capa fina.
7. Cromatografía en columna ⁽³⁶⁾.

3.4.2.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF).

La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1 - 0.2 mm), sobre una placa de vidrio, plástico, o una lamina metálica. 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 (figura 6). 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. Si el compuesto es activo a la luz ultravioleta, visualizar la placa en una lámpara Ultravioleta. Marcar con un lápiz el contorno de las manchas observadas, en caso contrario, utilizar un agente revelador ⁽²²⁾.

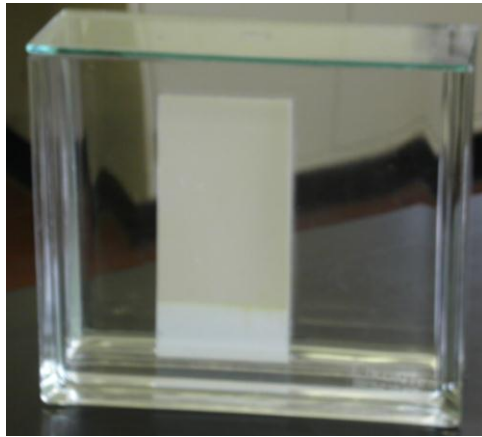


Figura N° 13. Cromatografía en capa fina: cámara de separación.

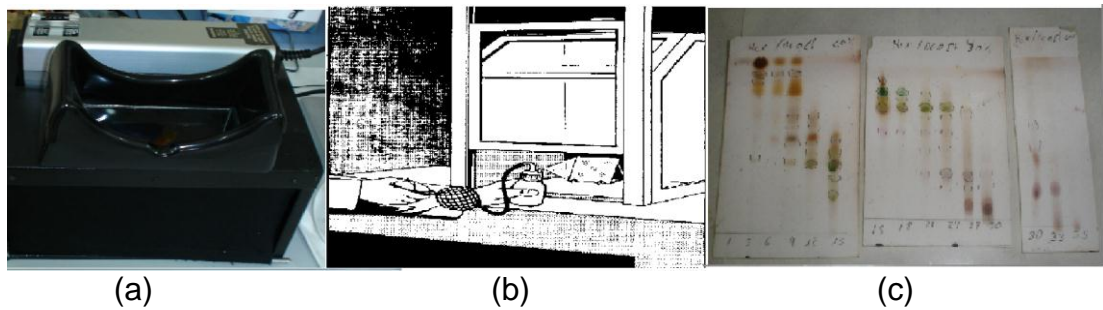


Figura N° 14. (a) Cámara UV, (b) Cámara de revelado y (c) cromatografía de capa fina revelada

3.5 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Cuando se pretenda conocer la composición química de los sub-extractos procedentes de una especie vegetal, se recurre a técnicas espectroscópicas y espectrométricas, que se describen a continuación:

3.5.1 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 ⁽²²⁾.

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 ⁽²²⁾.

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 ⁽²²⁾.

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 (19, 26, 29, 32, 39).

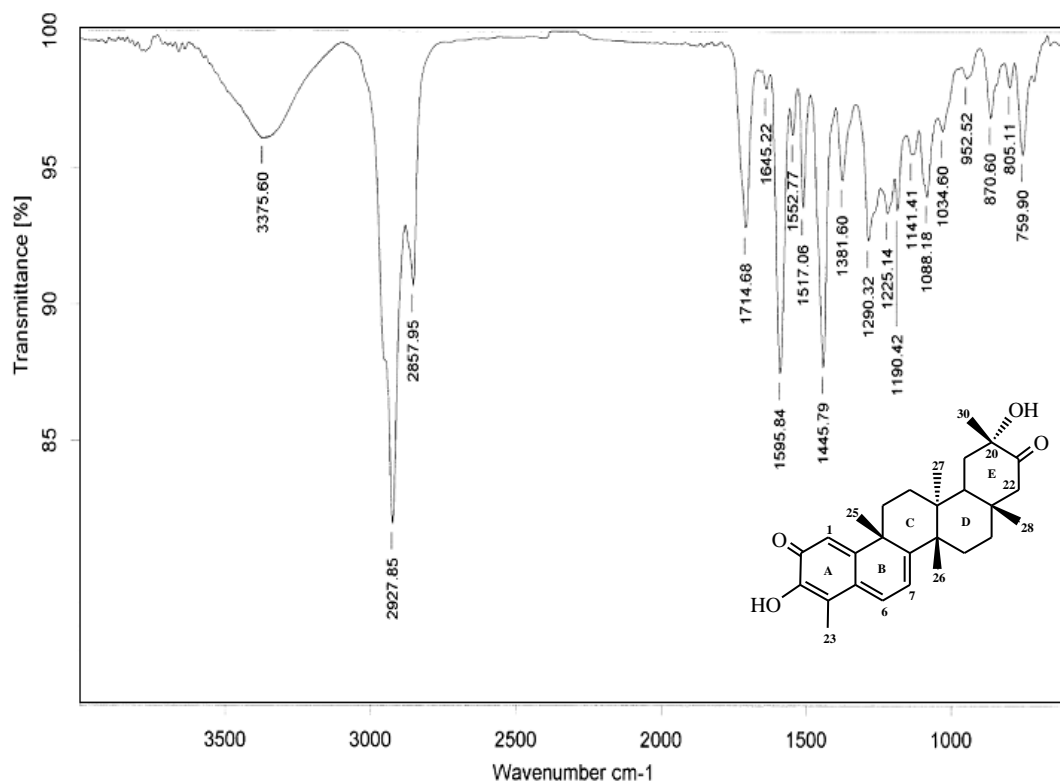


Figura N^o 15. Espectro IR de la 20- α -hidroxitingenona.

3.4.2 ESPECTROSCOPÍA 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 ⁽²²⁾.

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 ⁽²¹⁾; particularmente los glicósidos cardiotónicos absorben entre los 200 a 300 nm (ϵ 5000-10000) ^{(19, 26, 31,}

32, 39).

En contraste con las técnicas RMN e IR, las señales en el espectro U V son muy anchas debido a los múltiples cambios de estados vibracionales y rotacionales que acompañan a las transiciones electrónicas ⁽²²⁾.

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 ⁽²²⁾.

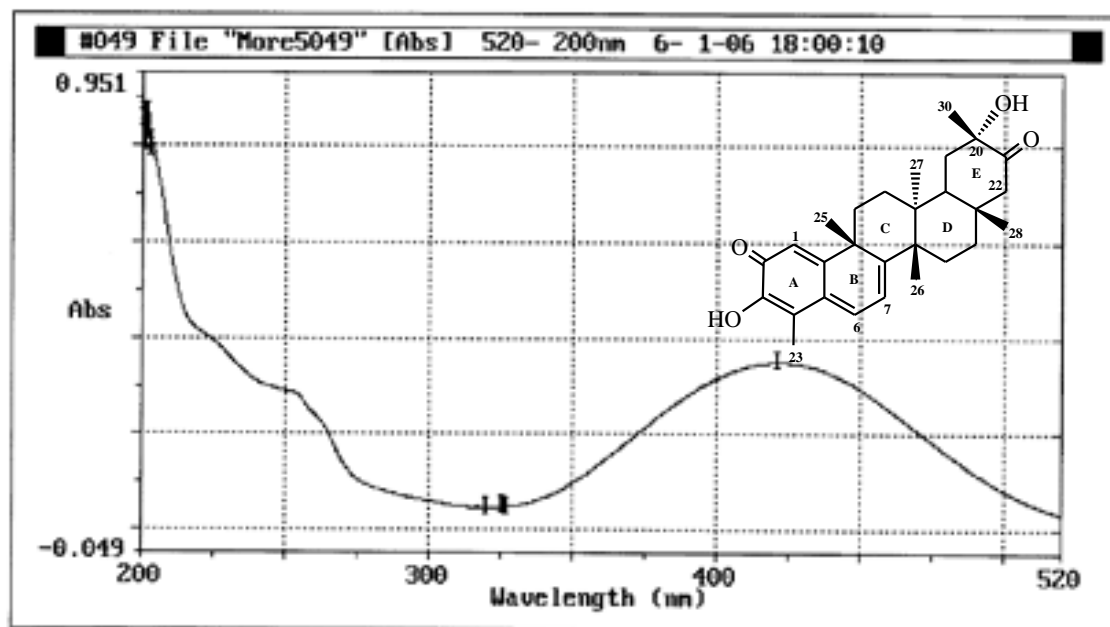


Figura N^o 16. Espectro ultravioleta-visible de la 20- α -hidroxitingenona.

3.5.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

La RMN se basa en la absorción de energía por cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. Es el método más importante y de mayor utilidad para la elucidación estructural de los productos naturales ⁽²²⁾.

El análisis del espectro de RMN ofrece evidencias bastante explícitas sobre las características de los núcleos que conforman una molécula dada, y los más frecuentemente analizados son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , siendo los dos primeros utilizados en análisis de rutina ⁽²²⁾.

Los desplazamientos químicos de las señales en RMN de ^1H (0-20 ppm) y de ^{13}C (0-230 ppm) dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y heteroátomos, etc.) y de carbonos (en dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, unidos a oxígeno, etc.).

Por la integración de las señales y el acoplamiento espín-espín (multiplicidad de la señal y magnitud de la constante de acoplamiento) que se observa en el espectro de protón, se deduce el número de hidrógenos y el modo de distribución en la molécula; por otro lado, el número de señales presentes en el espectro de carbono (registrado por la técnica de desacoplamiento de protones) indica el número de átomos de carbono presentes en la molécula ⁽²²⁾.

Las técnicas bidimensionales, entre las cuales podemos destacar los experimentos homonucleares (H, H-COSY, NOESY, ROESY, INADEQUATE, etc.) y heteronucleares (HSQC, HMBC, TOCSY, etc.) ofrecen información estructural mucho más directa y presentan ventajas enormes cuando se trata de esqueletos nuevos, poco relacionados a los ya conocidos ⁽²²⁾. Una de las ventajas de la técnica es su carácter no destructivo, por lo que la muestra puede recuperarse si se desea ⁽²²⁾.

El RMN se puede utilizar en un amplio intervalo de aplicaciones, siendo las más importantes: el estudio e investigación de productos naturales, en la síntesis orgánica, el análisis de fluidos corporales (sangre, orina, bilis, etc.), establecimiento de interacciones (Proteína-Ligando, Droga-ADN, etc.), control de calidad de materias primas en la industria farmacéutica, análisis de derivados del petróleo y quizá una de las aplicaciones de mayor empleo en la actualidad es en el área de imágenes diagnósticas en medicina ^(11, 12, 22, 23).

3.5.3.1 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹H).

El experimento más común de Resonancia Magnética Nuclear, es el de protón, RMN-¹H. El espectro que se obtiene proporciona información del tipo y el número de hidrógenos (por integración) que contiene una molécula (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y/o unidos a heteroátomos, etc.), permitiendo elucidar su estructura. El rango de desplazamiento químico típico es de 0–20 ppm y las señales por lo general son finas. Los cálculos de la constante de acoplamiento entre núcleos vecinos ayudan a identificar a los hidrógenos conectados a través del esqueleto molecular ⁽²²⁾.

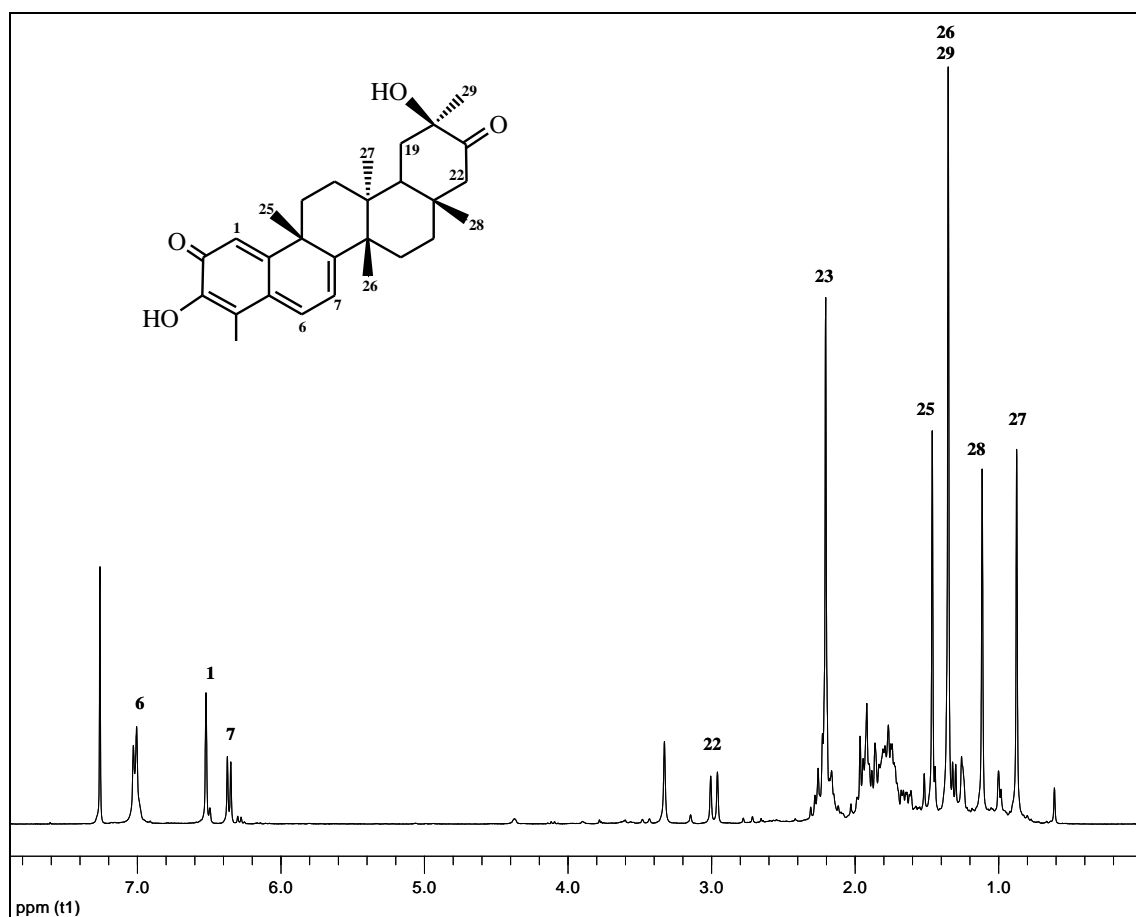


Figura N° 17. Espectro de RMN-¹H de la 20β-hidroxitengenona.

CUADRO N° 1. Desplazamiento químico más representativo en RMN-¹H para glicósidos cardiotónicos (10, 16, 20, 22, 23).

Protón	Desplazamiento Químico δ (ppm)			
	CD3OD	C5D5N	CDCI3	CDCI3-C5D5N
H-3	≈ 4.12 (1H, s a)	≈ 4.13 (1H, s a)	≈ 4.03 (1H, s a)	≈ 3.14 (1H, ddd, $J=13.0, 12.0, 5.0$ Hz)
H-17	≈ 2.834 (1H, m)	≈ 2.82 (1H, m)	—	≈ 2.62 (1H, dd, $J=9.6, 4.8$)
Me-18	≈ 0.92 (3H, s)	≈ 1.08 (3H, s)	≈ 0.87 (3H, s)	≈ 0.69 (3H, s)
Me-19	≈ 0.82 (3H, s)	≈ 0.90 (3H, s)	≈ 0.93 (3H, s)	—
H-21a	≈ 5.02 (1H, dd, $J=18.8, 1.7$ Hz)	≈ 5.31 (1H, dd, $J=18.5, 1.5$ Hz)	≈ 4.97 (1H, d a, $J=18.1$ Hz)	≈ 4.90 (1H, dd, $J=18.0, 2.0$ Hz)
H-21b	≈ 4.91 (1H, dd, $J=18.8, 1.7$ Hz)	≈ 5.09 (1H, dd, $J=18.5, 1.5$ Hz)	≈ 4.81 (1H, d a, $J=18.1$ Hz)	≈ 4.67 (1H, dd, $J=18.0, 2.0$ Hz)
H-22	≈ 5.89 (1H, s a)	≈ 6.14 (1H, s a)	≈ 5.87 (1H, s a)	≈ 5.73 (1H, s)

3.6 GENERALIDADES SOBRE CULTIVOS CELULARES.

Se conoce por cultivo celular o cultivos de tejidos al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (18, 28, 30).

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular como son, la actividad intracelular, flujo intracelular, ecología celular, interacciones celulares, etc (18, 28, 30).

Como ejemplo de áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular están: virología, investigación del cáncer, inmunología, ingeniería de proteínas, estudios de interacción y señalización celular, aplicaciones diagnósticas, aplicaciones médicas, aplicaciones industriales, agronómicas y otras muchas (18, 28, 30).

Ventajas y desventajas de los cultivos celulares.

Los cultivos celulares tienen una serie de ventajas innegables, pero al mismo tiempo tiene desventajas que hay que tener en consideración. Como ventajas podemos citar:

- a) Permiten un control preciso y fino del medio ambiente. En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: Físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial...), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular).
- b) Caracterización y homogeneidad de la muestra. Las células en cultivo de una línea celular, o de una línea continua son homogéneas, con morfología y composición uniformes. Se pueden obtener con facilidad un número elevado de réplicas idénticas.
- c) Economía. Suponen una economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que las utilizadas en ensayos *in vivo* (18, 28, 30).

En cuanto a las desventajas del cultivo celular:

- a) Técnica sensible. El crecimiento de las células animales es mucho más lento que el de los contaminantes más habituales (hongos, levaduras, bacterias, micoplasmas, etc) y además dado que proceden de organismos pluricelulares son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma o el fluido intersticial. Esto supone la necesidad de mantener las condiciones de asepsia en todo momento.
- b) Cantidad y costo. El costo de producción de 1 g de tejido en cultivo es más de 10 veces superior al obtenido en el animal.
- c) Inestabilidad (18, 28, 30).

Entre algunas de las células más comúnmente utilizadas son:

- a) Líneas celulares humanas
 - 1. Hep-G2(cáncer de hígado)
 - 2. DU145 (cáncer de próstata)
 - 3. Lncap (cáncer de próstata)
 - 4. MCF-7 (cáncer de mama)
 - 5. MDA-MB-438 (cáncer de mama)
 - 6. PC3 (cáncer de próstata)
 - 7. T47D (cáncer de mama)
 - 8. THP-1 (leucemia mieloide aguda)

9. U87 (glioma)

10. SHSY5Y células de neuroblastomas humano, clonadas a partir de mieloma múltiple

11. Saos-2 cells (cáncer óseo) (18, 28, 30).

b) Líneas celulares de Primates

1. Vero (células epiteliales de riñón de mono verde Africano *Chlorocebus*).

c) Líneas celulares de tumor de Rata

1. GH3 (tumor de hipófisis)

2. PC12 (feocromocitoma) (18, 28, 30).

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4. O DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La presente investigación tiene un tipo de estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, debido a que dicha investigación se basa en estudios realizados anteriormente y a la vez que 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 del epicarpo y las semillas de los frutos de *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*, poseen actividad anticancerígena frente al carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón y adenocarcinoma humano de mama.

La metodología del presente estudio se divide en tres etapas:

4.1.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- Se realizaron consultas en libros, trabajos de graduación, manuales etc. En la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- Revistas científicas, Ej.: *Journal of Natural Products*, *Journal of Organic Chemistry*, *Phytochemistry*, entre otras.
- SciFinder Scholar (base de datos del American Chemical Society).
- Internet.

4.1.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

El universo de la investigación es la Familia *Apocynaceae*, en donde las muestras utilizadas son *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*; las cuales fueron recolectadas en:

- Calle Washington, residencial Simón Bolívar, San Salvador, El Salvador, para *Thevetia ahouia*, durante los meses de diciembre de 2007, enero, febrero y marzo de 2008.
- Avenida Morazán y calle las violetas, residencial Santa Fe, San Salvador, El Salvador, para *Thevetia peruviana*, en los meses de enero y febrero de 2008.

4.1.3 INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

4.1.3.1 PARTE EXPERIMENTAL.

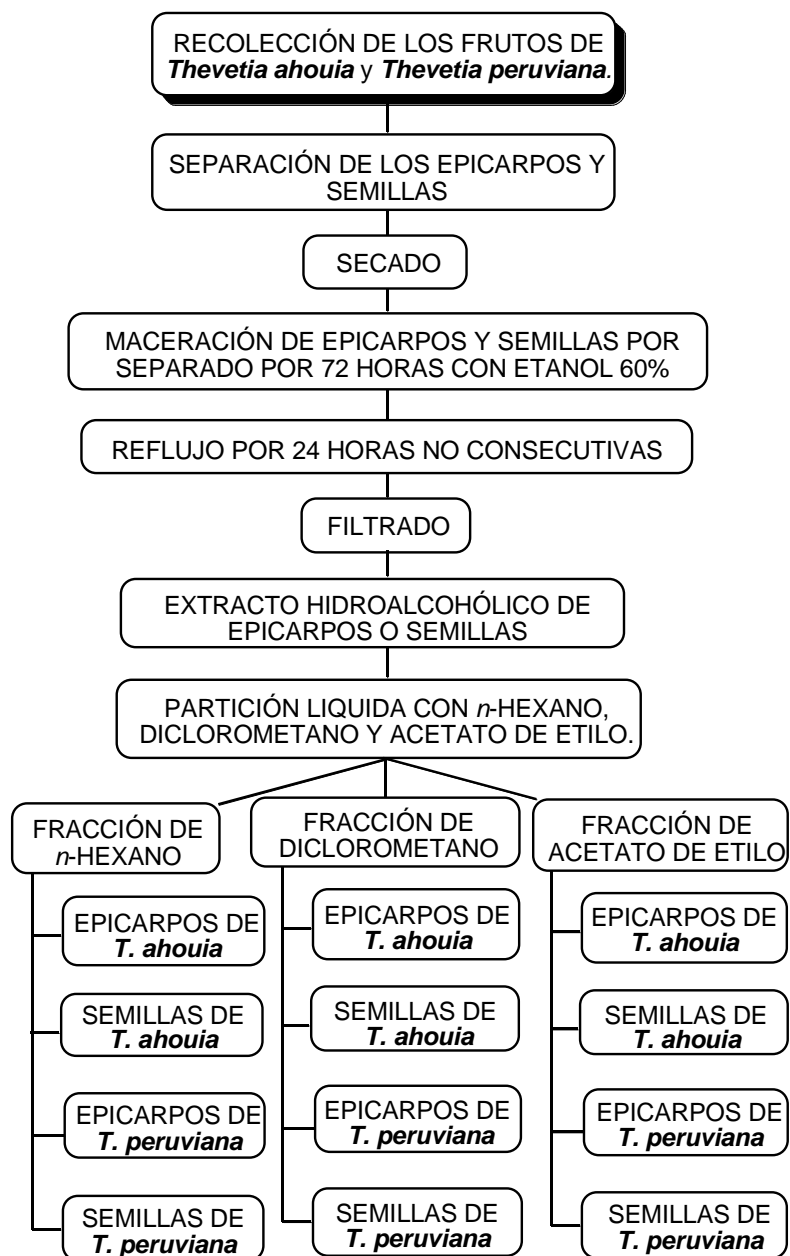


Figura N° 18. Esquema de trabajo

Continuación del esquema de trabajo.

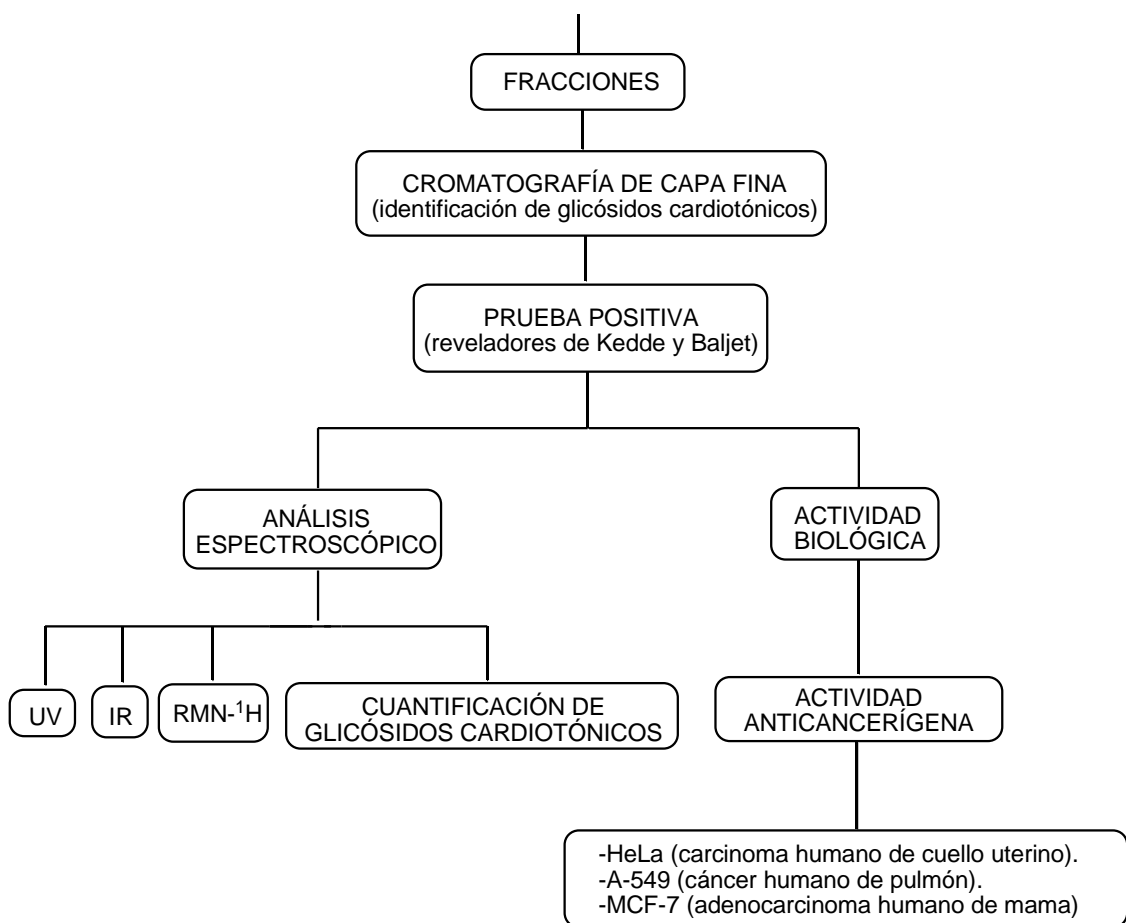


Figura N° 18 Esquema de trabajo.

4.1.3.1.1 Preparación de las muestras a investigar.

A continuación de la recolección de los frutos maduros, estos fueron lavados para eliminar cualquier contaminante externo. Posteriormente fueron separados en epicarpos y semillas; en los caso de los epicarpos estos fueron fraccionados para así obtener un mejor secado del material vegetal. A las semillas de *Thevetia ahouia* se les eliminó el endocarpo del fruto, éstas se secaron a

temperatura ambiente, posteriormente fueron fraccionadas antes de su utilización para lograr una mejor extracción de los componentes.

4.1.3.1.2 Obtención de los extractos hidroalcohólicos tanto de los epicarpos y semillas por separado de *Thevetia ahouia* como epicarpo y semillas de *Thevetia peruviana*.

Las muestras previamente secadas y pesadas; fueron extraídas por separados, macerándolas durante 72 horas y luego colocándolas a reflujo por 24 horas, utilizando como disolvente etanol al 60%, obteniéndose así el extracto hidroalcohólico.

4.1.3.1.3 Obtención de las fracciones

A cada uno de los extractos hidroalcohólicos, se le 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 al final un total de doce fracciones.

4.1.3.1.4 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, procedentes de los extractos hidroalcohólicos de epicarpos, y de semillas de ***T. ahouia*** y ***T. peruviana***; se realizaron con el objetivo de identificar los glicósidos cardiotónicos presentes en cada fracción; para lo cual se utilizaron reveladores específicos para estos metabolitos, esta se realizó sobre una placa de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor, donde se utilizaron 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: fracciones *n*- hexánica, diclorometánica y de acetato de etilo, de los extractos hidroalcohólicos de los epicarpos, y semillas de ***Thevetia ahouia*** y ***Thevetia peruviana*** (12 fracciones en total).

Testigo: digitoxigenina (calidad reactivo).

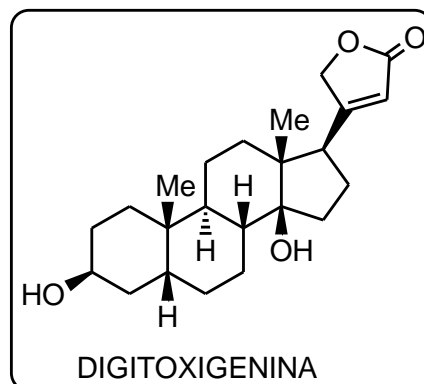


Figura N° 19. Estructura de la digitoxigenina.

Reveladores:

- Reactivo de Kedde:

a: 2.0 g de ácido 3,5-dinitrobenzoico en 100 mL de metanol.

b: 5.7 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.

Mezclar *a* y *b* en proporciones iguales, y rociar ⁽¹⁵⁾.

- Reactivo de Baljet:

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

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

Mezclar *a* y *b* en proporciones iguales, y rociar ⁽¹⁵⁾.

4.1.3.1.5 Análisis espectroscópico.

Dentro de los análisis espectroscópicos realizados están:

- Espectroscopia Infrarroja: Avatar 330 FT-IR, marca Thermo Nicolet.
- Espectroscopia Ultravioleta: PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu
- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de 500 MHz, marca Bruker.

4.1.3.1.6 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos.

La determinación de los glicósidos cardiotónicos fue expresado como digoxina ⁽⁷⁾

($C_{41}H_{64}O_{14}$); la técnica utilizada es detallada a continuación:

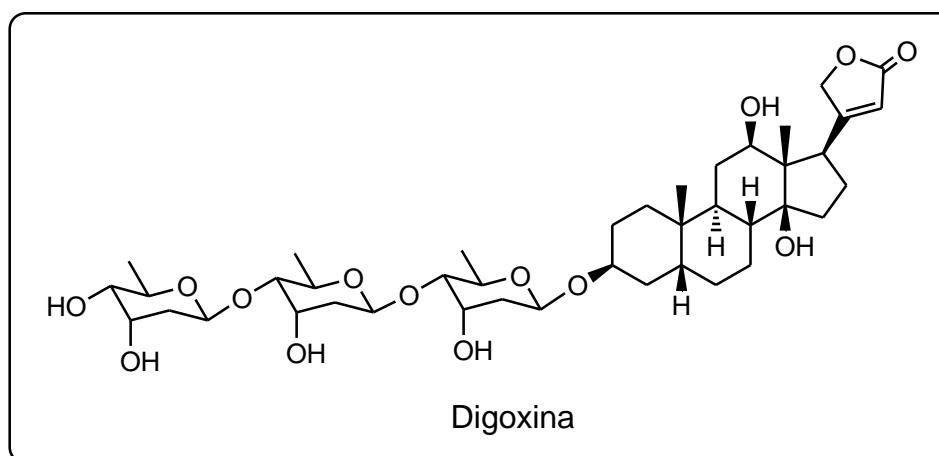


Figura N° 20. Estructura de la digoxina.

- Disolver 40 mg de muestra en alcohol *R* y diluir con el mismo solvente a 50 mL. Diluir 5.0 mL de la solución a 100 mL con alcohol *R*. Preparar una solución referencia de igual manera, usando 40 mg de digoxina *CRS*. A 5.0 mL de cada solución agregar 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio, protegerlo de la luz por 30 minutos 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 ⁽⁷⁾.

Calcular el contenido de $C_{41}H_{64}O_{14}$ de la determinación de la absorbancia y la concentración de la solución.

4.1.3.1.7 Determinación de la actividad anticancerígena.

La determinación de la actividad anticancerígena de las diferentes fracciones con presencia de glicósidos cardiotónicos fueron realizadas en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España, por la Dra. Laila Moujir; utilizando una técnica validada por el laboratorio, por tal razón la técnica no es detallada en esta investigación.

Las líneas celulares ensayadas fueron:

- HeLa (carcinoma humano de cuello uterino).
- A-549 (cáncer humano de pulmón).
- MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama)

Las líneas celulares se cultivaron en monocapas, en medios Dulbecco Eagle modificado, DMEM (Sigma), suplementado con 5% de suero fetal de bovino (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 anticancerígena se evaluó a través del colorimétrico de 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) se incubaron en una placa con 96 pocillos; las fracciones positivas a las pruebas para glicósidos cardiotónicos, se disolvieron a diferentes concentraciones 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 después de la disolución de la MTT formazan con DMSO. El porcentaje de viabilidad (IC₅₀) se calculo por medio de una curva. Todos los experimentos se repitieron tres veces.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Tras la recolección de los frutos, estos fueron separados en epicarpos y semillas, de donde posteriormente se obtuvo cada uno de los extractos hidroalcohólicos.

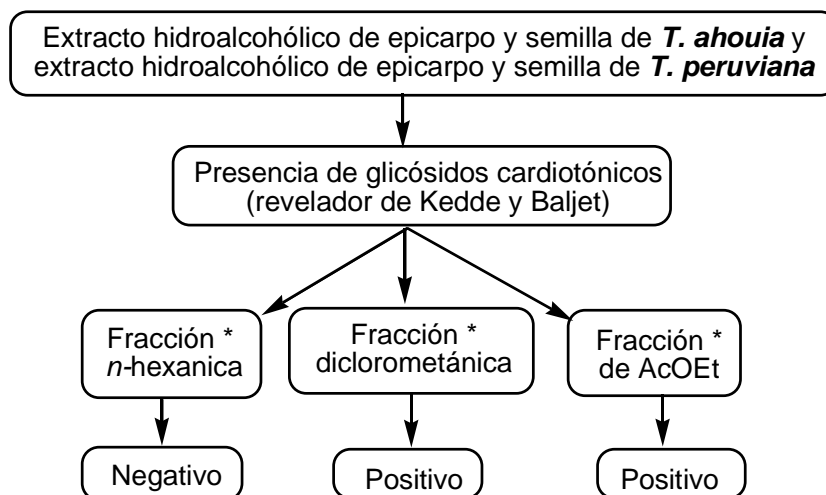
A continuación se presenta el peso del material vegetal seco del que se partió para obtener los respectivos extractos hidroalcohólicos y las subsiguientes fracciones, estos pesos fueron utilizados para determinar el contenido total de glicósidos cardiotónicos en cada parte del fruto.

Especie	Parte de la planta	Peso del material vegetal
<i>Thevetia ahouia</i>	Epicarpo	57.8g
	Semilla	200.3 g
<i>Thevetia Peruviana</i>	Epicarpo	389.0 g
	Semilla	302.4 g

CUADRO N° 2 Peso del material vegetal seco.

5.1 RESULTADOS DEL ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

Este análisis fue utilizado para determinar la presencia de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones, mediante la utilización de reactivos reveladores (reactivo de Kedde y de Baljet) propios para estos metabolitos; para la cual fue utilizada una fase móvil compuesta por acetato de etilo : metanol : agua (8:1:1) y como testigo la digitoxigenina.



* Tanto para epicarpo y semillas de *Thevetia ahouia* como para epicarpo y semillas de *Thevetia peruviana*.

Figura N° 21. Fracciones con presencia de glicósidos cardiotónicos.

A través de la realización de la cromatografía de capa fina se identificó la presencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones diclorometánica y de acetato de etilo, obtenidas a partir del extracto hidroalcohólico de epicarpos y del extracto hidroalcohólico de semillas de cada una de las especies en estudio; debido a esto la fracción *n*-hexánica no será tomada en cuenta para los análisis espectroscópicos ni para la realización de la prueba anticancerígena *in vitro*.

De los reveladores utilizados, el que presentó mejor resultado en la investigación de glicósidos cardiotónicos es el reactivo revelador de Baljet; ya que con éste solo se presentan las manchas características de estos metabolitos (manchas color naranja); mientras que el reactivo revelador de Kedde muestra otras manchas además de las características para glicósidos

cardiotónicos (manchas color violetas), por lo que se puede confirmar que el reactivo más selectivo para estos metabolitos es el reactivo revelador de Baljet (Ver anexo 2).

CUADRO N° 3. Resultado de la evaluación cromatográfica, de los diferentes fracciones procedentes de los epicarpes y semillas de *Thevetia ahouia* y *T. peruviana*.

Fracción N°	Fracción	R _f de la mancha (revelada con Baljet)	Fracción N°	Fracción	R _f de la mancha (revelada con Baljet)
1	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.15 0.38	5	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	0.33 0.36 0.46 0.50 0.60 0.69 0.73 0.79
2	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	0.26 0.50	6	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en AcOEt	0.23 0.36 0.48
3	Semillas de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.14 0.20 0.26 0.30 0.68 0.74 0.85	7	Semilla de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	0.10 0.14 0.19 0.25 0.30 0.60 0.70 0.81
4	Semillas de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	0.10 0.15 0.21	8	Semillas de <i>T. peruviana</i> en AcOEt	0.13 0.20 0.25

Digitoxigenina como testigo con un R_f de 0.80

Fase móvil: Acetato de etilo: Metanol: Agua (8:1:1).

Es evidente la similitud en el perfil cromatográfico entre las especies de ***Thevetia ahouia*** y ***T. peruviana***, con la única excepción de las fracciones de epicarpo extraídas con diclorometano, donde se presentó una mayor cantidad de manchas en la fracción de epicarpo de *T. peruviana* en CH₂Cl₂ que las obtenidas en la fracción de epicarpo de *T. ahouia* en el mismo solvente.

Debido a la afinidad polar entre los solventes utilizados y los diferentes cardiotónicos, se observó un mayor número de manchas en las fracciones extraídas con diclorometano que en las extraídas con acetato de etilo.

Comparando el R_f del testigo (Digitoxigenina) con los diferentes R_f de las fracciones, se observa la presencia tanto de cardiotónicos en forma de glicósidos ($R_f < 0.5$) y en forma de genina ($R_f > 0.6$). (Ver anexo N°2).

La presencia de la genina cardiotónica, puede deberse al proceso de secado o a que éstas se encuentran de forma natural en el vegetal.

5.2 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

5.2.1 Espectroscopía Infrarroja.

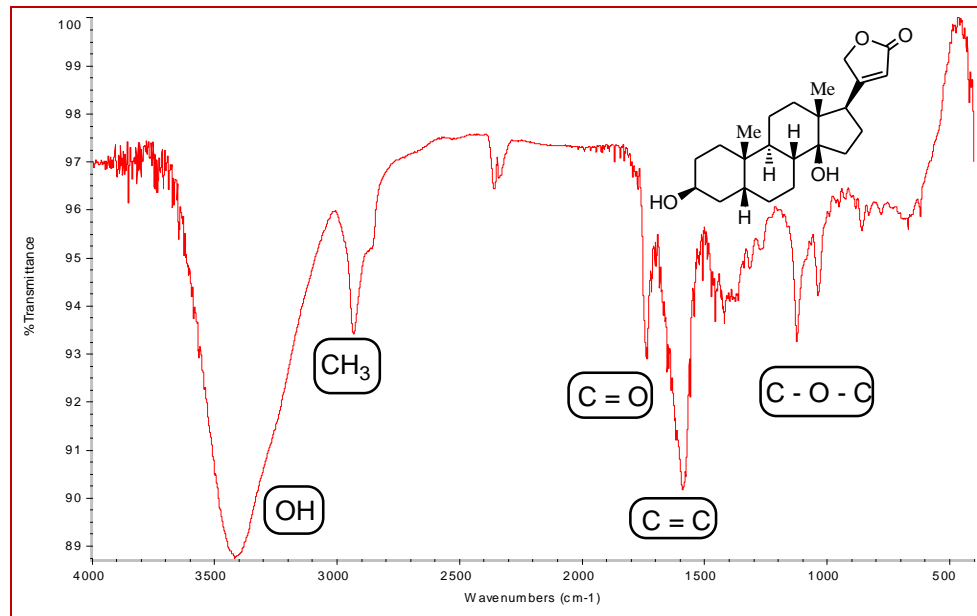


Figura N° 22. Espectro IR de digitoxigenina (testigo).

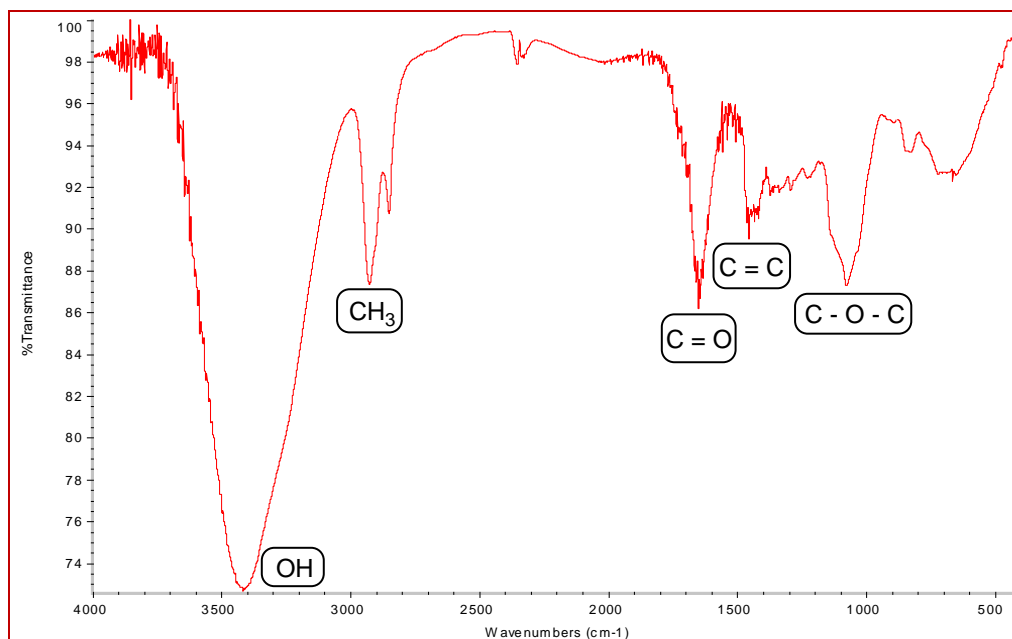


Figura N° 23. Espectro IR de fracción 1, Epicarpo de *T. ahouia* en CH₂Cl₂.

Las ocho fracciones examinadas por espectroscopía infrarroja mostraron glicósidos cardiotónicos al ser comparados con los testigos (digitoxigenina y digoxina). Así, se observó la presencia del grupo hidroxilo correspondiente al OH del carbono 14 o 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° 3).

CUADRO N°4. Bandas de absorción en Infrarrojo, más característica en glicósidos cardiotónicos presentes en cada una de las fracciones y testigos.

Fracción N°	Bandas de absorción (cm^{-1})				
	OH	CH3	C=C	C-O-C	C=O
	3600-3700	2870-2960	1450- 1635	1020-1270	1735
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	-
Digitoxigenina	+	+	+	+	+
Digoxina	+	-	+	-	-

+ = Presencia positiva de la banda de absorción.

- = No se presenta la banda de absorción.

5.2.2 Espectroscopia ultravioleta.

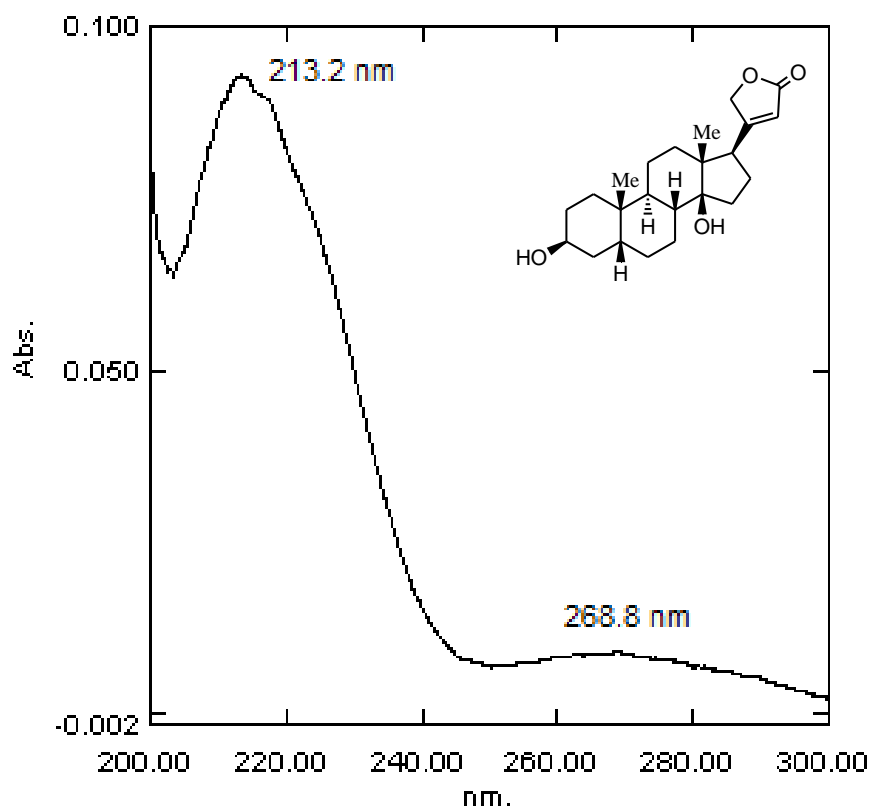


Figura N° 24. Espectro UV de la digitoxigenina (testigo).

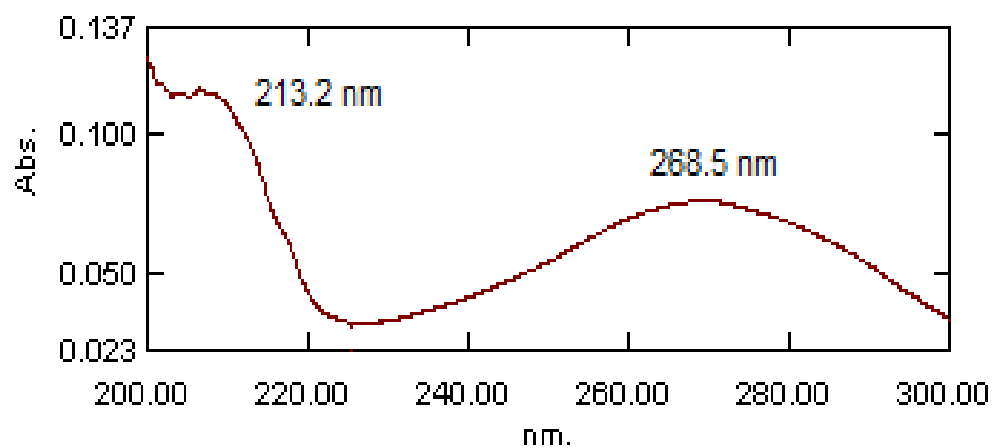


Figura N° 25. Espectro UV fracción 1, Epicarpo de *T. ahouia* en CH_2Cl_2 .

Todas las fracciones presentaron un máximo de absorbancia entre 200 a 300 nm, que comparados con los testigos nos indica la presencia de lactonas α - β -insaturada típica de glicósidos cardiotónicos. (Ver anexo N° 4)

CUADRO N° 5. Absorbancia y longitud de onda máxima en ultravioleta de cada una de las fracciones y testigo.

¡Error! No se pueden crear objetos modificando códigos de campo.

5.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

CUADRO N° 6. Desplazamiento químico de los protones más característico para glicósidos cardiotónicos de las fracciones y testigos en los espectros de RMN-¹H.

Protón	Desplazamiento Químico δ (ppm)		
	Fracciones ¹ (1 – 8)	Digitoxigenina ²	Digoxina ³
H-3	3.15 - 3.82 (m)	2.80 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)	3.25 (1H, d, $J = 5.0$ Hz)
H-17	2.29 (1H, s)	2.15 (1H, m $J = 4.8$ Hz)	2.03 (1H, m)

Me-18	0.86 (3H, s)	0.9 (3H, s)	0.98 (3H,s)
Me-19	0.79 (3H, s)	0.98 (3H,s)	0.83 (3H, s)
H-21	4.88 (2H, m)	H-21a, 5.06 (1H, d, $J = 18.1$ Hz) H-21b, 4.82 (1H, d, $J = 18.1$ Hz)	4.95 (2H, m)
H-22	5.85 (1H, s)	5.87 (1H, s)	5.94 (1H, s)
OH-OA _z	3.15 - 3.82 (m)		

¹ Espectro de RMN-¹H (D₂O, 500 MHz)

² Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 500 MHz)

³ Espectro de RMN-¹H (MeOD, 500 MHz)

En los espectros de RMN-¹H (D₂O, 500 MHz) de las fracciones se observaron señales a δ_H 0.79 (3H, s, Me-19), 0.86 (3H, s, Me-18), 2.29 (1H, s, H-17 β), 3.15 - 3.82 (m, H-3, OH-OA_z), 4.88 (2H, m, H-21) y 5.85 (1H, s, H-22). Todos estos datos y la comparación con los espectros de RMN-¹H de la digitoxigenina y la digoxina (testigos), nos permitió establecer que las fracciones presentan glicósidos cardiotónicos. (Ver anexo N° 5).

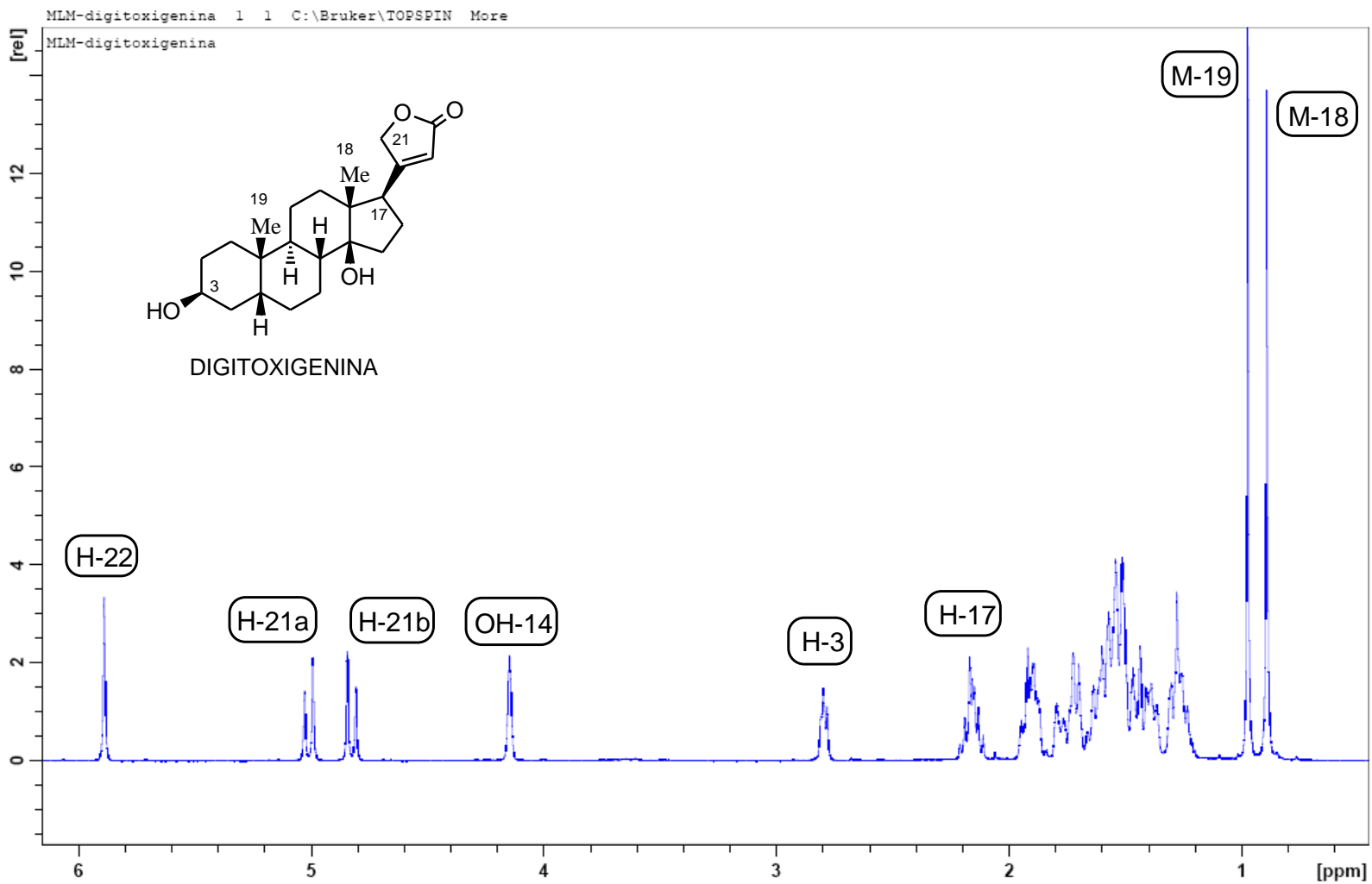


Figura N° 26. Espectro de RMN-¹H de la digitoxigenina (COCl₃, 500 MHz).

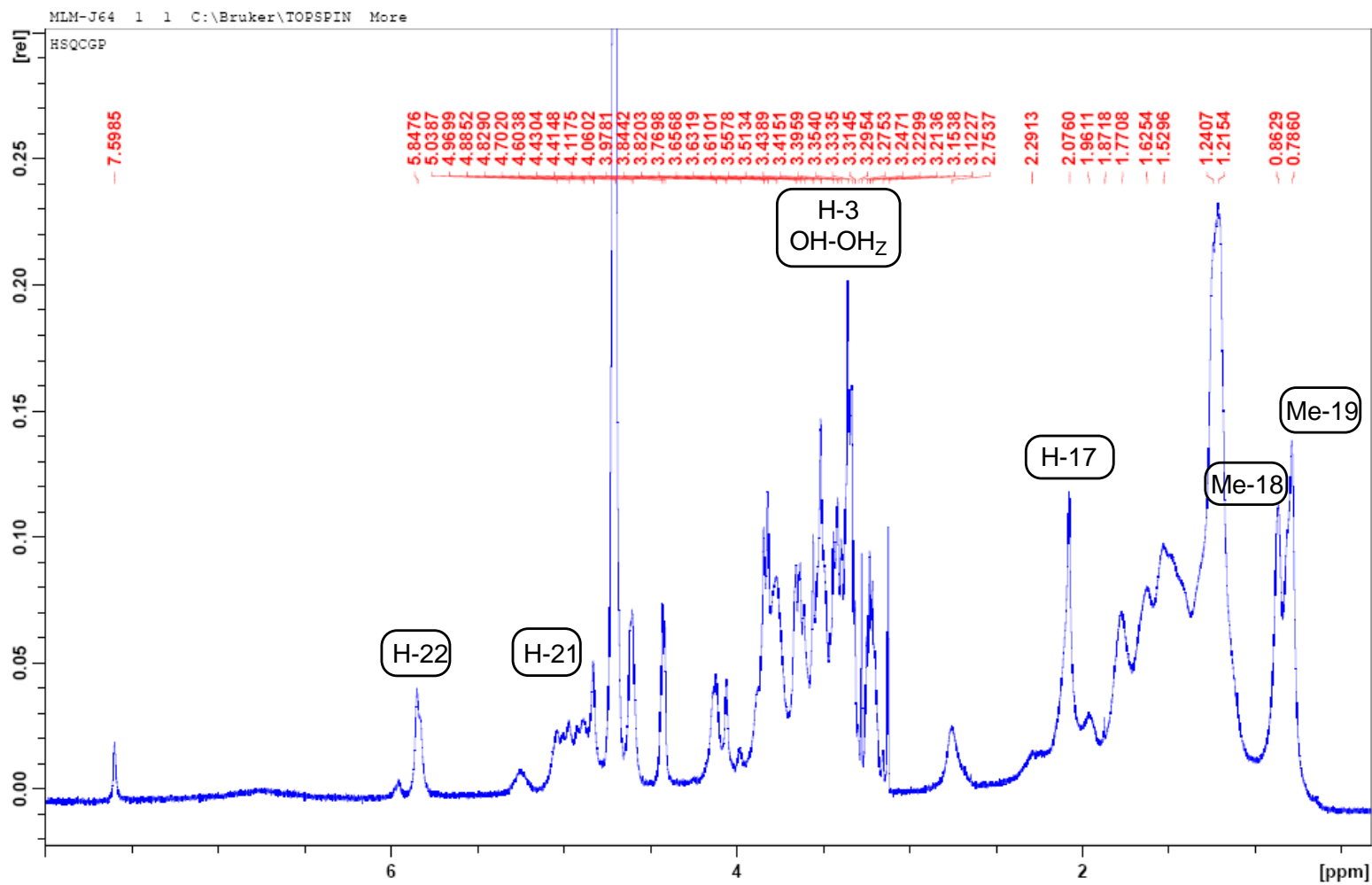


Figura N° 27. Espectro de RMN-¹H de fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH₂Cl₂ (D₂O, 500 MHz)

5.3 RESULTADO DE LA PRUEBA DE CUANTIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

Ejemplo de cálculos para la determinación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina ⁽⁷⁾.

CUADRO N° 7 Datos del estándar.

Estándar	Peso	valoración	Factor de dilución	Concentración	Absorbancia
Digoxina	0.010 g	99.6 % (para uso)	200	49.8 µg/mL	0.512

Formula usada:

$$C \text{ Mx} = \frac{(C \text{ St})(A \text{ Mx})}{A \text{ St}} \cdot FD$$

Donde:

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 de la muestra.

Ejemplo: cantidad de glicósidos cardiotónicos obtenidos en la fracción 1, epicarpo de *T. ahouia* en CH₂Cl₂ (prueba realizada por triplicado).

$$C. \text{ fracc.1.1} = \frac{(49.8 \mu\text{g /mL})(0.522)}{0.512} \cdot 100 \quad C \text{ fracc.1.2} = \frac{(49.8 \mu\text{g /mL})(0.556)}{0.512} \cdot 100$$

$$C \text{ fracc. 1.1} = 5.08 \text{ mg}$$

$$C \text{ fracc. 1.2} = 5.41 \text{ mg}$$

$$C \text{ fracc.1.3} = \frac{(49.8 \mu\text{g /mL})(0.539)}{0.512} \cdot 100$$

$$C \text{ fracc.1.3} = 5.24 \text{ mg}$$

Contenido promedio de fracción 1 = 5.24 mg de glicósidos cardiotónicos.

- Intervalo de confianza de la medida para muestras pequeñas al 95% de confianza ⁽³⁾.

Formula a usar:

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

Donde:

$$\bar{X} = \text{Media aritmética} \quad \bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

t_{n-1} = Valor de tabla

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

n = Numero de muestras

Para muestra 1:

Media:

$$\bar{X} = \frac{5.08 + 5.41 + 5.24}{3} \quad \bar{X} = 5.24 \text{ mg}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{(5.08 - 5.24)^2 + (5.41 - 5.24)^2 + (5.24 - 5.24)^2}{3-1}} \quad S = 0.165$$

Para t_{n-1} los grados de libertad son: $3 - 1 = 2$; por tanto el valor de t_{n-1} en tabla es de 4.30 para dos grados de libertad al 95% de confianza ⁽³⁾.

$$IC(\mu) = 5.24 \pm 4.30 (0.165/\sqrt{3})$$

$$LS = 5.65 \text{ mg}$$

$$LI = 4.83 \text{ mg}$$

Obteniendo un resultado para la muestra uno de 5.24 ± 0.41 mg con un intervalo de confianza del 95% ⁽³⁾.

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

Fracción N°	Tipo de muestra	Peso de la fracción (g)	Peso de las muestra (mg) ^a	Contenido de Glicósidos Cardiotónicos, expresado como digoxina. ^a	
				Muestras (mg) ^b	Fracción (g)
1	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	14.050	32	5.24 ± 0.41	2.3
2	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en AcOET	0.142	35	7.36 ± 1.25	0.03
3	Semillas de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	4.998	35	32.34 ± 4.59	4.62
4	Semillas de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	2.083	63	33.66 ± 1.34	1.11
5	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	1.566	71	9.21 ± 0.32	0.20
6	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en AcOET	0.229	56	4.42 ± 0.33	0.02
7	Semillas de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	4.353	74	7.61 ± 0.46	0.45
8	Semillas de <i>T. peruviana</i> en AcOEt	0.422	66	11.48 ± 0.97	0.07

a. Datos promedios de análisis realizado por triplicado.

b. Resultados con intervalo de confianza del 95%.

Rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada uno de las fracciones.

Ejemplo de cálculos utilizando datos de la fracción 1 y fracción 2.

- Fracción 1

$$\begin{array}{l} 0.032 \text{ g} \leftrightarrow 0.00524 \text{ g} \\ 14.050 \text{ g} \leftrightarrow X_1 \end{array} \quad X_1 = \frac{(0.00524 \text{ g})(14.050 \text{ g})}{0.032 \text{ g}} \quad X_1 = 2.30 \text{ g}$$

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción 1.

$$\begin{array}{l} 14.050 \text{ g} \leftrightarrow 100\% \\ 2.300 \text{ g} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = \frac{(2.300 \text{ g})(100\%)}{14.050 \text{ g}} \quad X = 16.4 \%$$

- Fracción 2

$$\begin{array}{l} 0.350 \text{ g} \leftrightarrow 0.00761 \text{ g} \\ 0.142 \text{ g} \leftrightarrow X_2 \end{array} \quad X_2 = \frac{(0.00761 \text{ g})(0.142 \text{ g})}{0.035 \text{ g}} \quad X_2 = 0.03 \text{ g}$$

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción 2.

$$\begin{array}{l} 0.142 \text{ g} \leftrightarrow 100\% \\ 0.030 \text{ g} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = \frac{(0.030 \text{ g})(100\%)}{0.142 \text{ g}} \quad X = 21.1 \%$$

- Contenido de glicósido cardiotónicos en el epicarpo de *Thevetia ahouia*

(fracción 1 y 2)

$$\sum X_1 + X_2 \quad \rightarrow \quad 2.30 \text{ g} + 0.03 \text{ g} = 2.33 \text{ g}$$

Porcentaje en el epicarpo de *T. ahouia*.

$$\begin{array}{l} 57.80 \text{ g} \leftrightarrow 100\% \\ 2.33 \text{ g} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = \frac{(2.33 \text{ g})(100 \%) }{57.8 \text{ g}} \quad X = 4.03 \%$$

CUADRO N° 9. Porcentaje de glicósidos cardiotónicos de cada fracción.

Fracción N°	Peso de la fracción (g)	Porcentaje de Glicósidos Cardiotónicos (%)
1	14.050	16.4
2	0.142	21.1
3	4.998	92.4
4	2.083	53.3
5	1.566	12.8
6	0.299	8.7
7	4.353	10.3
8	0.422	16.6

CUADRO N° 10. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en epicarpo y semilla de *Thevetia ahouia* y *T. peruviana*, en base a material vegetal seco.

Especie	Parte de la planta	Peso del material vegetal	Contenido de glicósidos cardiotónicos, expresados como digoxina	Porcentaje (%)
<i>Thevetia ahouia</i>	Epicarpo	57.8g	2.33 g	4.03
	Semilla	200.3 g	5.73 g	2.86
<i>Thevetia peruviana</i>	Epicarpo	389.0 g	0.22 g	0.06
	Semilla	302.4 g	0.52 g	0.17

Los resultados obtenidos durante la determinación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina ⁽⁷⁾, indican una presencia considerable de glicósidos cardiotónicos dentro de cada una de las fracciones obtenidas y por tanto un porcentaje significativo en cada una de las partes del fruto.

Tomando como base los resultados obtenidos durante el análisis, es necesaria la utilización de diclorometano y de acetato de etilo durante el proceso de extracción, para obtener un buen rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones.

De las fracciones obtenidas, la que presentó mayor porcentaje de glicósidos cardiotónicos fueron las procedente de las fracciones de semillas de ***Thevetia ahouia*** tanto en diclorometano (92.4%) como en acetato de etilo (53.3%); sin embargo en el contenido total de glicósidos cardiotónicos, a partir del material seco, se obtuvo en mayor porcentaje en el epicarpo de ***Thevetia ahouia*** que de las semillas; mientras que en los frutos de ***Thevetia peruviana*** se obtuvo una mayor presencia en las semillas que lo encontrado en los epicarpos de esta misma especie. Presentándose un mayor porcentaje de glicósidos cardiotónicos en los frutos de ***Thevetia ahouia***.

5.4 RESULTADO DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERIGENA *in vitro*.

CUADRO N° 11. Resultado de la actividad anticancerígena en cada unas de las fracciones.

Nº	FRACCIÓN	HeLa IC ₅₀ (µg/mL)	A-549 IC ₅₀ (µg/mL)	MCF-7 IC ₅₀ (µg/mL)	Vero* IC ₅₀ (µg/mL)
1	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> (CH ₂ Cl ₂)	>100	>100	>100	>100
2	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> (AcOEt)	>100	>100	>100	98.83
3	Semillas de <i>T. ahouia</i> (CH ₂ Cl ₂)	1.54	0.15	1.02	0.6
4	Semillas de <i>T. ahouia</i> (AcOEt)	2.54	1.62	4.02	3.64
5	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> (CH ₂ Cl ₂)	1.59	0.14	0.99	0.53
6	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> (AcOEt)	>100	>100	>100	>100
7	Semillas de <i>T. peruviana</i> (CH ₂ Cl ₂)	0.41	0.03	0.23	0.21
8	Semillas de <i>T. peruviana</i> (AcOEt)	8.92	3.87	14.55	13.64
G.C.**	Digoxina	0.5	0.53	0.27	0.18
G.C.**	Digitoxigenina	0.13	0.055	0.12	0.19
Control Positivo	Mercaptopurina	0.5	8	0.24	11.5

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

** **G.C.:** Glicósido cardiotónico.

IC₅₀ : Porcentaje de viabilidad.

>100 : No presenta actividad frente a la línea celular.

Entre las fracciones que mostraron actividad anticancerígena están: fracción de semillas de *T. peruviana* (CH₂Cl₂), frente a las líneas HeLa (carcinoma humano de cuello uterino) y MCF-7 (adenocarcinoma Humano de mama) ; fracciones de semillas de *T. ahouia* (CH₂Cl₂), semillas de *T. ahouia* (AcOEt), epicarpo de *T. peruviana* (CH₂Cl₂), semillas de *T. peruviana* (CH₂Cl₂) y semillas de *T. peruviana* (AcOEt) frente a la línea celular A-549 (cáncer humano de pulmón); cuyos valores de IC₅₀ resultaron incluso menores que la mercaptopurina, utilizada como control positivo, ya que se necesita una menor concentración de la fracción para que ejerzan mejor acción anticancerígena. Sin embargo, solo las fracciones de semillas de *T. ahouia* en AcOEt (IC₅₀ = 3.64) y semillas de *T. peruviana* en AcOEt (IC₅₀ = 13.64) presentaron toxicidad media y débil frente a las células Vero (células normales) ⁽³⁹⁾, comparando este valor con el resultado obtenido a partir de la mercaptopurina (IC₅₀ = 11.50) utilizada como control positivo, ya que con valores con mayor IC₅₀ son menos citotóxicas, siendo las demás fracciones altamente tóxicas frente a las células normales ya que IC₅₀ de cada una de estas son menores a uno.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

1. En el análisis por cromatografía de capa fina de los epicarpos y semillas de los frutos de *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*, muestra 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 esta no presentó manchas características para estos metabolitos frente a los reactivos reveladores propios para glicósido cardiotónicos (reactivo de Kedde y de Baljet).
2. De los reveladores utilizados en el análisis por cromatografía de capa fina (reactivo de Kedde y de Baljet), el que presenta mejor selectividad para glicósidos cardiotónicos fue el del reactivo de Baljet; debido a que este solamente presenta las manchas correspondiente a estos metabolitos.
3. Se comprobó la similitud en el perfil cromatográfico entre los epicarpos y semillas de *T. ahouia* y *T. peruviana*, excepto en la fracciones de epicarpos extraídas con diclorometano, donde se presentó un mayor número de manchas en la fracción de epicarpo de *T. peruviana*, que de la fracción de epicarpo *T. ahouia* en el mismo solvente.

4. Se demostró la presencia de cardiotónicos tanto en forma de glicósido ($R_f < 0.5$) como de genina ($R_f > 0.6$), esto a partir de los R_f obtenidos durante el análisis de cromatografía por capa fina tanto de las fracciones como del testigo utilizado en el análisis.
5. 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.
6. Se demostró mediante la prueba de cuantificación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, que la especie que presentó mayor cantidad de estos metabolitos fueron los frutos de *T. ahouia*.
7. En la determinación de la actividad anticancerígena las fracciones de semillas de *T. ahouia* en AcOEt y semillas de *T. peruviana* en AcOEt presentaron actividad frente a la línea celular A-549 (cáncer humano de pulmón) y a la vez mostraron toxicidad media y débil respectivamente frente a las células Vero (células normales); convirtiéndose éstas en las más prometedoras como agentes anticancerígenos, frente a la línea celular A-549.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar la recolección de los frutos en la etapa de maduración; ya que en este período hay mayor presencia de glicósidos cardiotónicos en el fruto.
2. Utilizar diclorometano y acetato de etilo durante el fraccionamiento, para obtener así un mejor rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones, tomando como base los resultados obtenidos durante la cuantificación de glicósidos cardiotónicos.
3. Cuantificar los glicósidos cardiotónicos en cada fracción, expresando estos como digoxina, 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 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.
4. Continuar el fraccionamiento de cada unas de las muestras con presencia de estos metabolitos, con la finalidad de aislar los glicósidos cardiotónicos responsables de la actividad anticancerígena.
5. Continuar la búsqueda de especies vegetales ricas en glicósidos cardiotónicos que sean más potentes como anticancerígenos y menos tóxicos.

6. Dar a conocer a la población sobre los efectos tóxicos de estas especies, ya que estas son usadas principalmente como plantas ornamentales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Angely, J. A. Arboles, arbustos y palmas de Panamá. Panamá. Consultado 10 de diciembre de 2007. En línea disponible en:
<http://ctfs.si.edu/webatlas/findinfo.php?specied=8362&leng=spanish>.
2. Bisset, N.G. y otros. 1962. Cardiac glycosides. IV. Apocynaceae. A preliminary paper chromatographic study of the glycosides from *Thevetia peruviana*. *Annales Bogorienses*. 4(No. 2), 145-52.
3. Bonilla G. 1998. Estadística I “Elementos de estadísticas descriptivas y probabilidad”. Quinta edición. San Salvador, El Salvador. UCA editores. Capitulo 8, P: 299-315.
4. Decosterd, L. y otros. 1994. The differential cytotoxicity of cardenolides from *Thevetia ahouia*. *Journal the Phytotherapy Research*. 8(2): 74 – 77.
5. De la Portillo G., C. y otros. 1954. Chemical study of the seed of *Thevetia peruviana* and isolation of their cardiotonic. *Anales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica*.
6. El Tanbouly, N.D. y otros. 2000. Cytotoxic cardiac glycosides from *Thevetia neriifolia* Juss. Roots. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*. 38(3): 103-106.
7. EMEA (European Medicine Agency Inspections). 2006. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products/ Traditional Herbal Medicinal

Products, CPMP/QWP/2819/00 and EMEA/CVMP/814/00. Committee for Medicinal Products Human Use (CHMP) Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP).

8. Endo, H. y otros. 1997 Cardenolide glycosides from *Thevetia ahouia* (LINN.) A.DC. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 45(9), 1536-1538
9. Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italian. 1972. Ottava edizione. Roma, Italia. Istituto Poligrafico dello Stato P.V. II Volume, P: 390-393.
10. Frerejacque, M. y otros. 1971. Structure of thevefolin. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences Naturelles*. 272(20), 2620-1.
11. Gilles, G.G. 1995. "Application of SNIF-NMR and other isotopic methods for testing the authenticity of food products" *Magnetic Resonance in Food Science. Journal Natural Products* 157: 120 – 126.
12. Herrera F. A y otros. 1995. Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica. 2ª Ed. Vallehermoso, Madrid, España. Editorial síntesis. P. 70 – 142.
13. Instituto nacional del cáncer. Estados Unidos. Consultado 4 de enero de 2008. En línea disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/pdp>
14. Jolad, S. y otros. 1981. 3'-O-Methylevomonoside: a new Cytotoxic Cardiac Glycoside from *Thevetia ahouia*. A.DC (Apocynaceae). *Journal of Organic Chemistry*. 46(9), 1946-7.

15. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia "Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, España. Ediciones Omega. p. 154 – 160.
16. Lagos, J. A. 1987. Compendio de Botánica Sistemática. Tercera edición. Dirección de publicación e impresos del Ministerio de Cultura y Comunicaciones. San Salvador, El Salvador. P: 79, 81, 95.
17. Lang H-Y. y otros. 1964. The cardiac glycosides of *Thevetia peruviana*. II. Isolation and identification of cerberina, ruvosido, and new cardiac glycoside, perusitina. Yaoxue Xuebao. 11(7): 464 – 72.
18. Lehman C. y otros. 2007. MRI evaluation of the contralateral breast in women. Consultado 4 de enero de 2008. En línea disponible en: <http://www.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000913.htm>.
19. Lindsay, L. M. y otros. 2007. Isolation and structural analysis of compound isolated from *Thevetia peruviana* (Yellow oleander). American Chemical Society. Department, Brigham Young University Hawaii, Laie, HI, USA. Abstracts of Papers, 233rd ACS National Meeting, Chicago, IL, United States, March 25-29, 2007.
20. Lixin, L. y otros. 2004. Cytotoxic Resibufogenin Transformation Products from Cell Suspension Cultures of *Platycodon Grandiflorum*. Letters in Organic Chemistry. 1: 176 – 178.

21. Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica. 2ª Ed. España. Pontificia Universidad Católica del Perú. P. 265 y 269.
22. Marcano, D. y otros. 2002. *Fitoquímica Orgánica*, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. P 54 – 57.
23. Miknis, F.P. 2000. “Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Petroleum” Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. USA. John Wiley & Sons. P. 6849 – 6875.
24. Molina, F. 2006, Boletín sobre defunciones por enfermedades. Corte Suprema de Justicia. Dirección General del Instituto de Medicina Legal y Unidad de Estadística Forense.
25. Morales, J.F y otros. 1999. Manual de plantas de Costa Rica (en línea). San José. Consultado 29 de dic. 2007. Disponible en: <http://www.darnis.inbio.ac.cr>.
26. Mukherjee, A. K. y otros. 2001. Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. Current Medicinal Chemistry. 8: 1467 – 1486.
27. Nolasco N. y otros. 2007. Estadísticas 2006. Instituto Salvadoreño del Seguro Social. Departamento Actuario y Estadística, San Salvador, El Salvador. Consultado 20 de febrero de 2008. En línea disponible en: <http://www.iss.gob.sv/estadistica/BOLETIN%202007.pdf>.

28. Pérez A. y otros. 2001. Cultivos Celulares. Bogotá. Colombia. Consultado el 10 de octubre de 2008. En línea disponible en: <http://www.javeriana.edu.com/facultades/ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultrivos.htm>.
29. Quaquebeke, E. V. y otros. 2005. 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*. 48: 849 – 856.
30. Reina M. 2003. Técnicas de estudio de líneas celulares. Introducción al cultivo celular. Consultado 12 de octubre de 2008. En línea Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>
31. Rosa-Torres, C. y otros. 1988. Actividad antiinflamatoria y antifúngica de *Thevetia ahouia*. *Actividades Biológicas*. Volumen 27, suplemento I, 31-34.
32. Roy, M. C. y otros. 2005. Cytotoxic Principles from the Formosan Milkweed, *Asclepias curassavica*. *Journal Natural Products*. 68: 1494 – 1499.
33. Sisa. J. 2001. *Thevetia ahouia*. Ibiza. España. Consultado el 11 de diciembre de 2007. En línea disponible en: <http://www.ecoaldea.com/plmd/cabalonga.htm>.

34. Tubiana M. 2008. Generalities about cáncer. Consultado 4 de enero de 2008. En línea Disponible en:
<http://www.demedicina.com/salud/cancer.html>.
35. Venkata. R. E. 1973. Cardiac glycosides of *Thevetia peruviana* and *Cerbera odollam*. *Indian Journal of Pharmacy*. 35(4), 107-13.
36. Villar del Fresno, Á.. 1999. Farmacognosia General. Vallehermoso, Madrid, España. Editorial Síntesis. P. 33 – 43, 181 – 188 y 335.
37. Voigtlaender, H.W. y otros. 1969. Acetyl cardenolides from *Thevetia peruviana*. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*. 302(7), 538-44.
38. Wang, M. y otros. 1981. Determination of cardiac glycosides in *Thevetia peruviana* Merr. *Yaoxue Xuebao* 16(5), 379-84.
39. Watanabe, K. y otros. 2003. Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*. *Journal Natural Products*. 66: 236 – 241.
40. Zhao, M. y otros. 2007. Bioactive Cardenolides from the Stems and Twigs of *Nerium oleander*. *Journal of Natural Products*. 70: 1098 – 1103.VC

GLOSARIO (16, 32, 40)

– Baya:

Fruto totalmente carnoso y blando, con una o más semillas.

– 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.

– Diurético:

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

– Drupa:

Fruto con mesocarpo carnoso y endocarpo duro (lignificado); contiene solamente una semilla.

– Emético:

Sustancia capaz de estimular el vómito.

- Endocarpo:

Tejido que se forma en el interior de los frutos carnosos del grupo de las drupas y cuya función es proteger a la semilla.

- Espectroscopía:

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

- Febrífugo:

Sustancia o procedimiento capaz de disminuir la fiebre.

- Insuficiencia cardíaca:

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.

ANEXOS

ANEXO N°1

**PLACAS DE CROMATOGRÁFIA EN CAPA FINA REVELADAS CON
EL REACTIVO DE KEDDE Y BALJET**

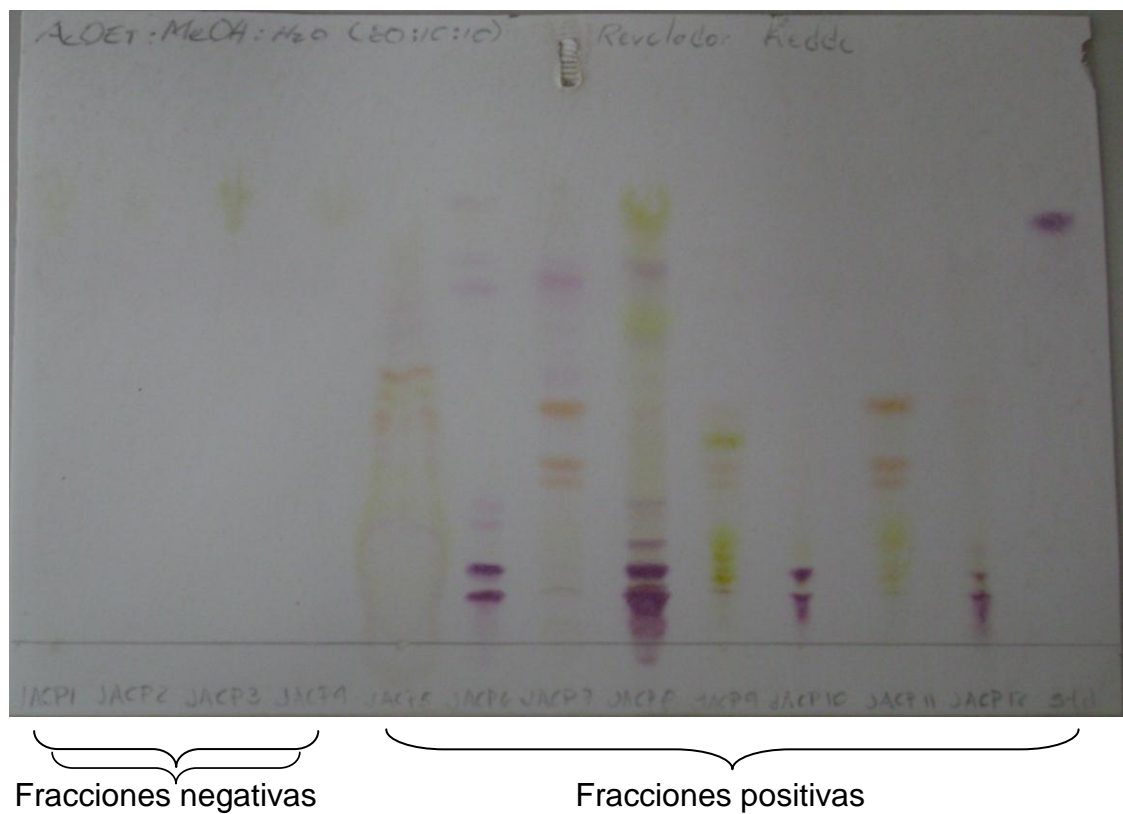


Figura N° 28. Placa cromatográfica revelada con reactivo de Kedde (Manchas de color violeta presencia de glicósidos cardiotónicos).

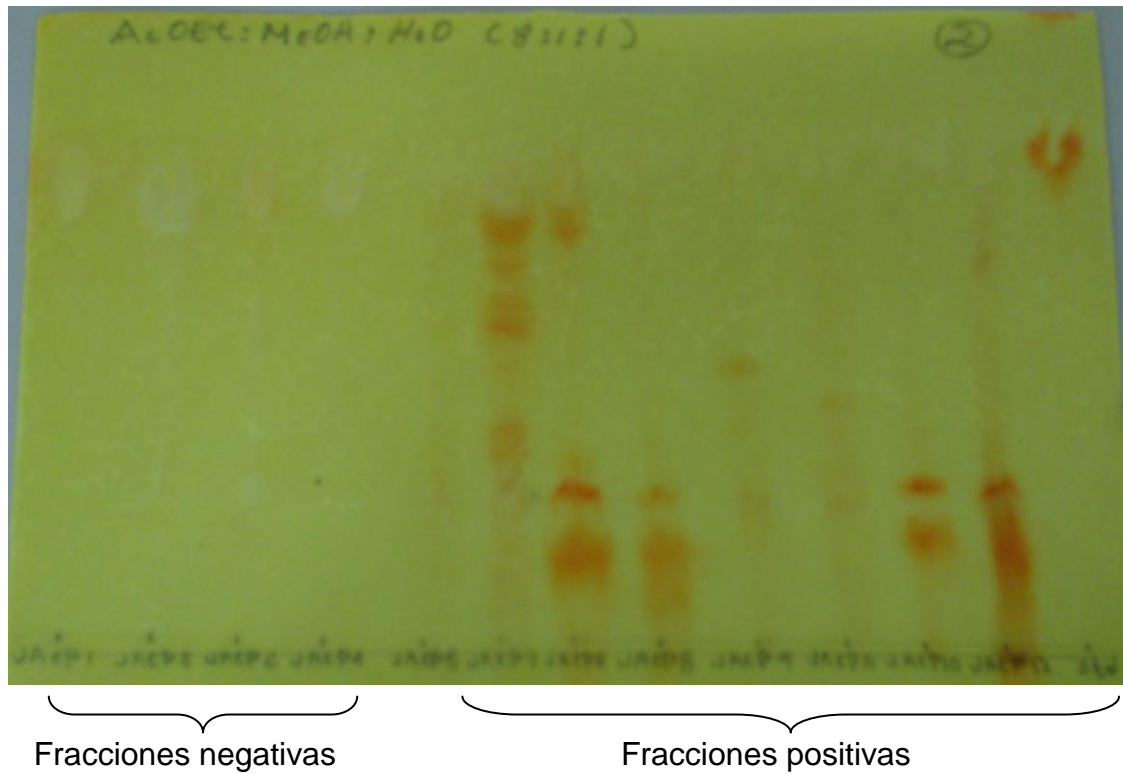


Figura N° 29. Placa cromatográfica revelada con reactivo Baljet (Manchas de color naranja presencia de glicósidos cardiotónicos).

ANEXO N° 2
ESPECTRO INFRARROJO

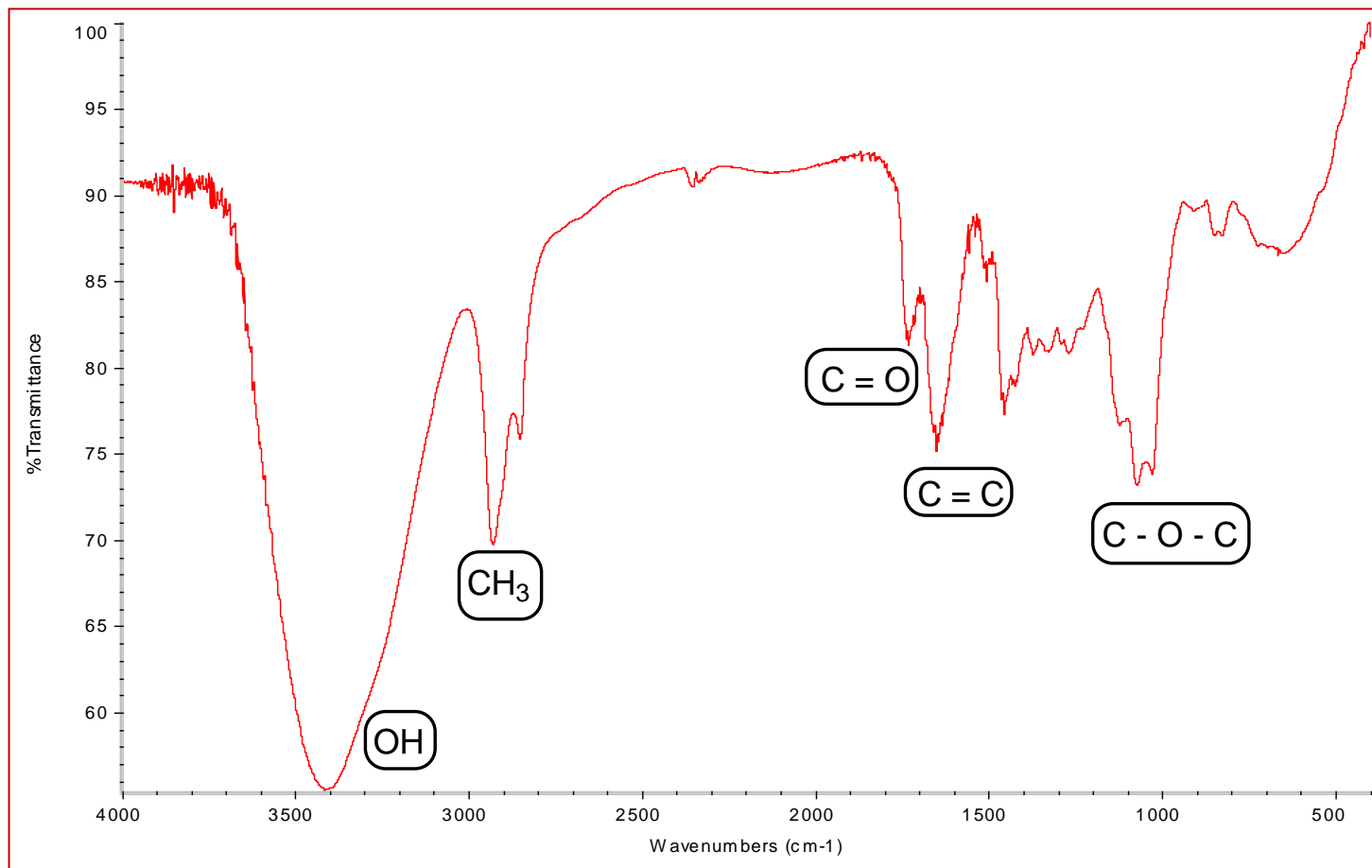


Figura N° 30. Espectro IR de la fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH₂Cl₂.

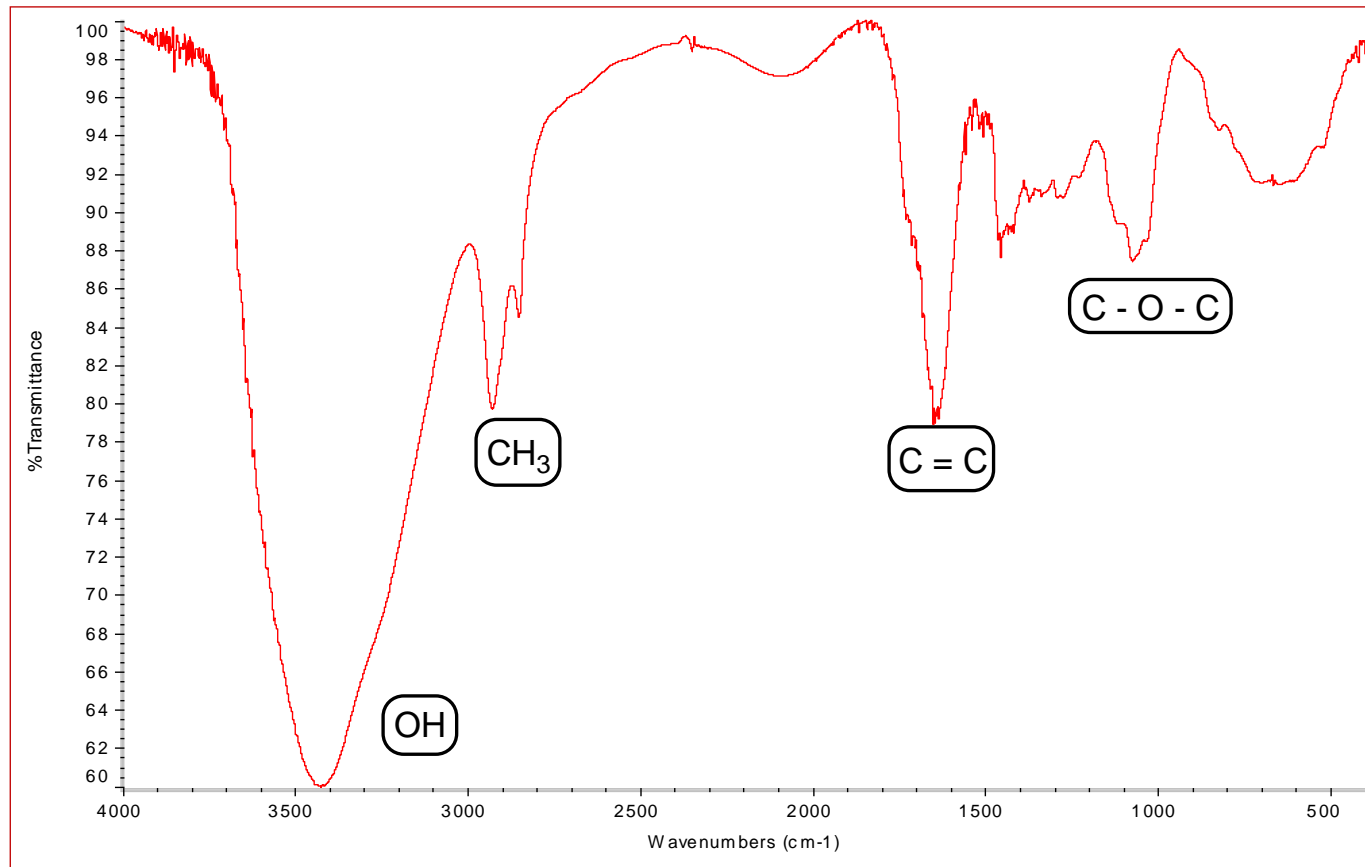


Figura N° 31. Espectro IR de fracción 5, Epicarpo de *T. Peruviana* en CH_2Cl_2 .

ANEXO N° 3
ESPECTRO ULTRAVIOLETA

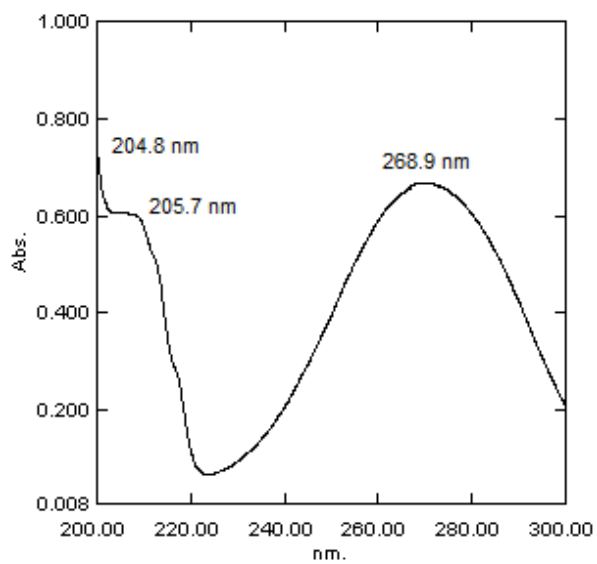


Figura N° 32. Espectro UV de la fracción 3, Semillas de *T. ahouia* en CH_2Cl_2 .

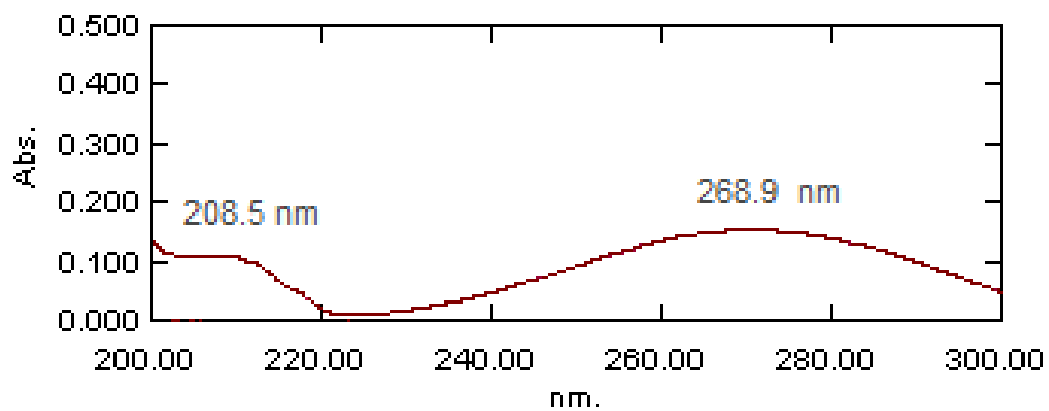


Figura N° 33. Espectro UV de la Fracción 7, Semillas de *T. peruviana* en CH_2Cl_2 .

ANEXO Nº 4

ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN

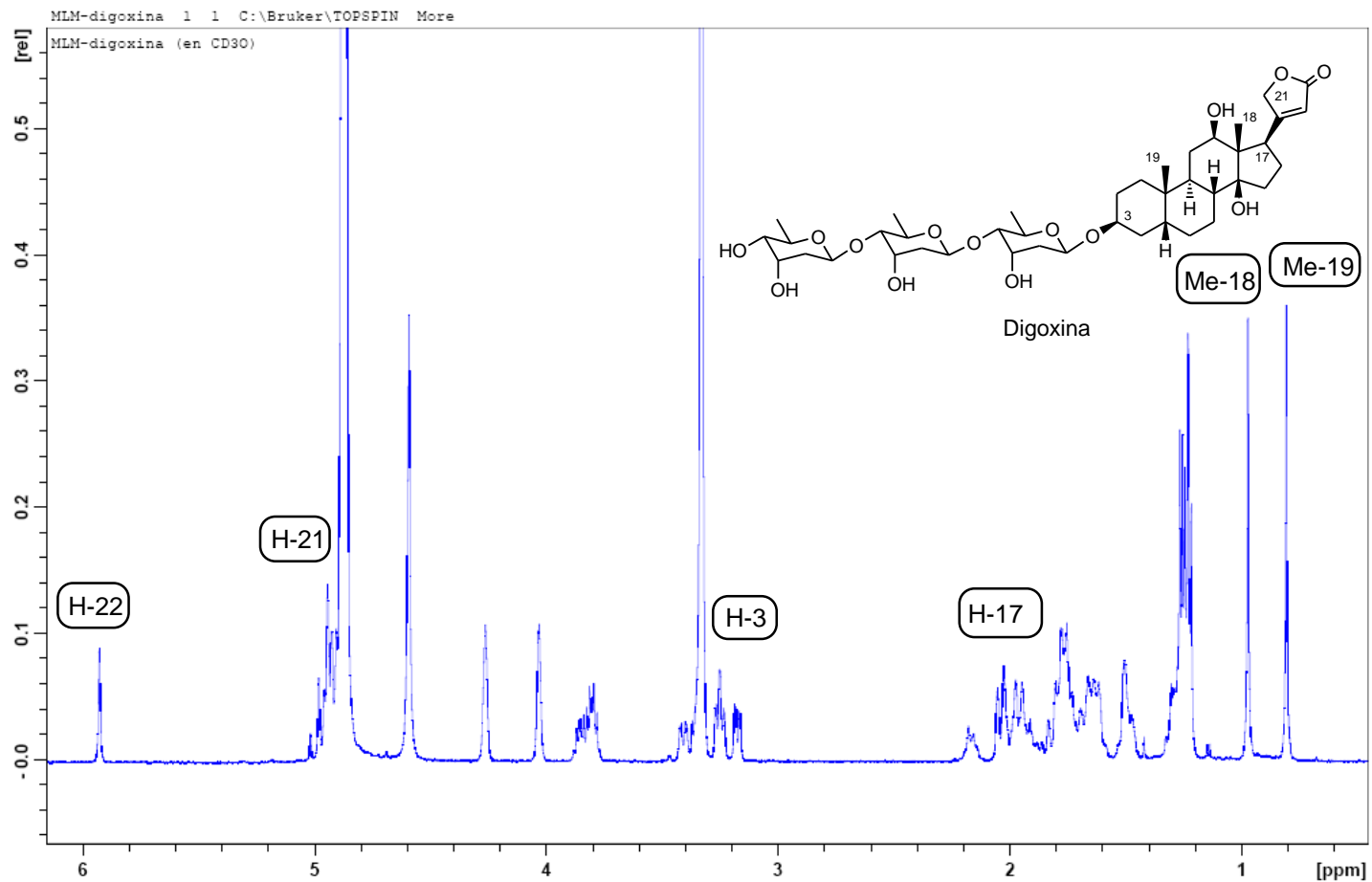


Figura N° 34. Espectro de RMN-¹H Digoxina (MeOD, 500 MHz).

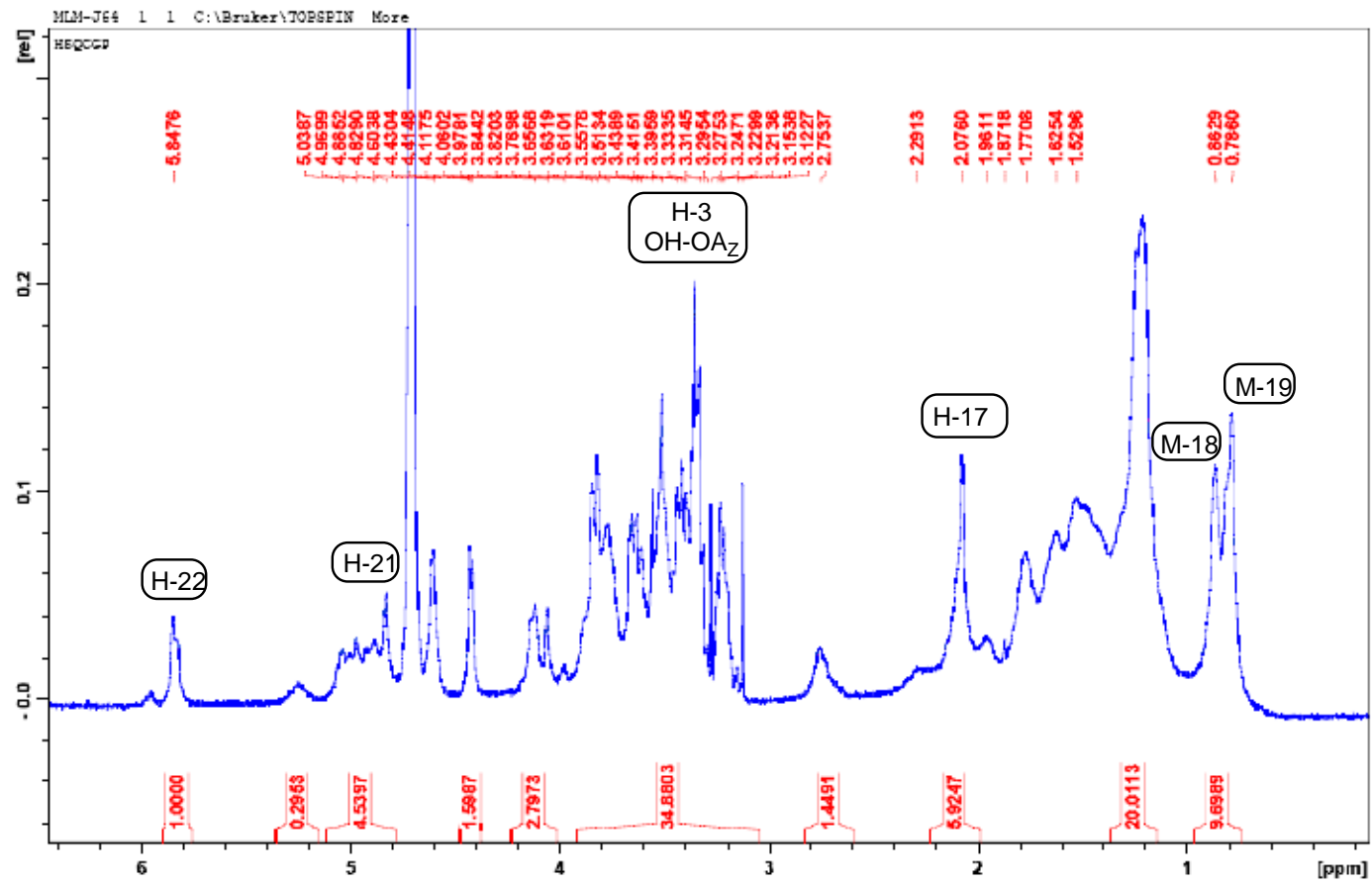


Figura N° 35. Espectro de RMN-¹H de fracción 7, semilla de *T. peruviana* en CH₂Cl₂ (D₂O, 500 MHz).

ANEXO Nº5

**TECNICA MODIFICADA PARA LA DETERMINACION DE
GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS EXPRESADOS COMO DIGOXINA.**

Técnica de análisis modificada.

Disolver una cantidad aproximada a 40 mg de muestra en alcohol *R* y diluir con el mismo solvente a 10 mL. Diluir 1.0 mL de la solución a 10 mL con alcohol *R* (hacer ajuste en las diluciones si es necesario). Preparar una solución referencia de igual manera, usando 10 mg de digoxina *CRS* disolver en alcohol *R* y diluir con el mismo solvente a 10 mL. Diluir 1.0 mL de la solución a 10 mL con alcohol *R*. Diluir 5.0 mL de la solución a 10 mL con alcohol *R*. A 5.0 mL de cada solución agregar 3.0 mL de solución alcalina de picrato de sodio, protegerlo de la luz por 30 minutos 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.

Calcular el contenido de $C_{41}H_{64}O_{14}$ de la determinación de la absorbancia y la concentración de la solución.

ANEXO Nº 6

**RESULTADOS DEL CONTENIDO DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS
EN LAS FRACCIONES, EXPRESADOS COMO DIGOXINA.**

Cuadro N° 12. Resultados de la prueba de contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina.

Fracción N°	Tipo de 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)
1	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	14.050	31 33 32	0.522 0.556 0.539	100	5.08 5.41 5.24	2.3
2	Epicarpo de <i>T. ahouia</i> en AcOET	0.142	38 34 33	0.816 0.735 0.720	100	7.94 7.15 7.00	0.03
3	Semillas de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	4.998	33 35 37	0.627 0.665 0.703	500	30.49 32.34 34.19	4.62
4	Semillas de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	2.083	61 62 66	0.345 0.341 0.352	1000	33.56 33.17 34.24	1.11
5	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	1.566	71 70 72	0.947 0.934 0.960	100	9.21 9.08 9.34	0.20
6	Epicarpo de <i>T. peruviana</i> en AcOET	0.229	55 57 56	0.439 0.461 0.465	100	4.27 4.48 4.52	0.02
7	Semillas de <i>T. peruviana</i> en CH ₂ Cl ₂	4.353	76 73 73	0.804 0.774 0.769	100	7.82 7.53 7.48	0.45
8	Semillas de <i>T. peruviana</i> en AcOEt	0.422	64 69 65	0.114 0.122 0.118	1000	11.09 11.87 11.48	0.07

ANEXO N° 7

MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES

1.1 Material Vegetal

- Frutos de *Thevetia ahouia* y *Thevetia peruviana*

1.2 Líneas cancerígenas ensayadas

- 1 HeLa (carcinoma humano de cuello uterino).
- 2 A-549 (cáncer humano de pulmón).
- 3 MCF-7 (adenocarcinoma humano de mama).

1.3 Material de Laboratorio

- Erlenmeyers (50, 100, 1000 y 5000 mL)
- Embudo de vidrio
- Ampolla de separación (5000 mL)
- Probetas (100, 1000 mL)
- Pipetas volumétricas (1,3 y 5 mL)
- Balón volumétrico (10 mL)
- Pipeteadores
- Aros metálicos
- Trípode
- Aparato de reflujo
- Mortero y pistilo

- Microespátula
- Malla de asbesto
- Baño de María
- Pinzas (extensión y soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Tirros
- Etiquetas
- Papel aluminio

1.4 Equipo

- Balanza analítica metteler: modelo PM400, serie SNR 124297.
- Balanza granataria: marca Cenco Central Scientific Company. Triple Beam
- Hot plane fisher: modelo 75h, serie 557101947.
- Rotavapor: Buchii.
- Hot plane: Corning mode RF 425
- Espectroscopio Infrarrojo: Avatar 330 FT-IR, marca Thermo Nicolet.
- Espectroscopio Ultravioleta-Visble: PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu

1.5 Reactivos y solventes

- *n*-hexano
- Diclorometano
- Acetato de etilo
- Etanol grado reactivo
- Etanol al 60%
- Acetona grado reactivo
- Acetona industria
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Acido Pícrico
- Acido 3,5-dinitrobenzoico.

ANEXO N° 8

**INVESTIGACIÓN DE GENEROS *Thevetia* COMO UNA
FUENTE DE NUEVOS FARMACOS ANTICANCERÍGENOS**



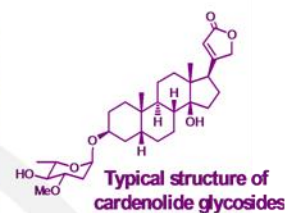
Investigating *Thevetia* Genus as a source of new anticancer drugs



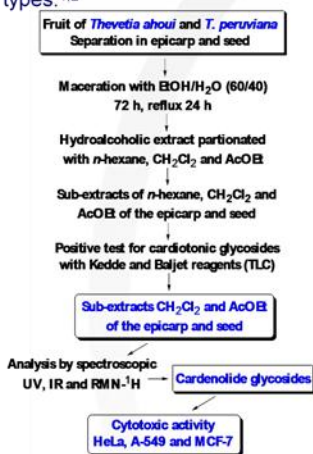
Morena L. Martínez^a, Liliana Araujo^b, Arnoldo Campos^a, Ana Miriam Santamaria^a, Laila Moujir^{b,c}, Marvin J. Núñez^a and Isabel L. Bazzocchi^f

^aFacultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador; ^bDepartamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain; ^cInstituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" and Instituto Canario de Investigación del Cáncer, La Laguna, Tenerife, Spain.

The species *Thevetia ahouia* and *T. peruviana* are ornamental trees of the family Apocynaceae, commonly distributed in many tropical countries. The genus *Thevetia* is well known as a source of cardenolide glycosides, whose basic chemical structures consist of a steroidal (cyclopentanoperhydrophenanthren) ring, 3 β - and 14 β -hydroxyl groups with the glycoside function at C-3, and an α,β -unsaturated five-membered lactone ring attached to 17 β . Cardiac glycosides are a class of natural product that are traditionally used to increase cardiac contractile force in patients with congestive heart failure, but they are also reported as being active against a wide range of cancer types.^{1,2}



In the course of our phytochemical study to search for anticancer agents from Salvadorian plants, eight organic sub-extracts of the epicarp and seed from *Thevetia ahouia* and *T. peruviana*, containing mainly cardenolide glycosides, were screened for *in vitro* anticancer activity against MCF-7 (carcinoma of breast), HeLa (carcinoma of cervix) and A-549 (carcinoma of lung) human cell lines.



Thevetia peruviana: shrub, epicarp, seed and flowers *Thevetia ahouia*: flowers and fruit

Five of the sub-extracts were active against the three cell lines assayed, showing IC₅₀ between 0.03 and 15 μ g/mL. The most active was the dichlorometane sub-extract from the seed of *T. peruviana* with values IC₅₀ ranging from 0.03-0.41 μ g/mL, higher than mercaptopurine used as a positive control.

It has been demonstrated that cardenolide glycosides produces apoptosis and this effect is mediated through inhibition of Na⁺, K⁺, ATPase with resulting increased intracellular calcium, release of mitochondrial cytochrome c, activation of caspase cascade, and Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage.³ Further investigations should be performed in order to establish which cardenolide glycosides are responsible for the anticancer effect.

SUB-EXTRACTS	IC ₅₀ (μ g/mL)		
	HeLa	A-549	MCF-7
Epicarp of <i>T. ahouia</i> (CH ₂ Cl ₂)	> 100	> 100	> 100
Seeds of <i>T. ahouia</i> (CH ₂ Cl ₂)	1,54	0,15	1,02
Epicarp of <i>T. peruviana</i> (CH ₂ Cl ₂)	1,59	0,14	0,99
Seeds of <i>T. peruviana</i> (CH ₂ Cl ₂)	0,41	0,03	0,23
Epicarp of <i>T. ahouia</i> (AcOEt)	> 100	> 100	> 100
Seeds of <i>T. ahouia</i> (AcOEt)	2,54	1,62	4,02
Epicarp of <i>T. peruviana</i> (AcOEt)	> 100	> 100	> 100
Seeds of <i>T. peruviana</i> (AcOEt)	8,92	3,87	14,55
Mercaptopurine	0,50	8,00	0,24

References

- Decosterd, L.; Gustafson K. R.; Cardellina II, J. H.; Cragg, G. M.; Boyd, M. R. The differential cytotoxicity of Cardenolides from *Thevetia ahouia*. *Phytotherapy Research*, 8 (2), 74-77, 1994.
- Mijatovic, T.; Quaquebeke, E. V.; Delest, B.; Debeir, O.; Darro, F.; Kiss, R. Cardiotonic Steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1776 (1), 32-57, 2007.
- Smith, J. A.; Madden, T.; Vijjeswarapu, M.; Newman, R. A. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer. *Biochemical Pharmacology*, 62, 469-472, 2001.

Acknowledgements: We are indebted to the Ministerio de Educación y Ciencia (CTQ2006-13376/BQU), the FICIG-G.I. 05/2008, and FQF-UES/QUIMIOPLAN 08/09 projects for financial assistance.