

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



IDENTIFICACION, CUANTIFICACION Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE LOS GLICOSIDOS CARDIOTONICOS PROCEDENTES DE LAS RAICES Y FLORES DE ***Plumeria rubra*** (FLOR DE MAYO), ***Stemmadenia donnell-smithii*** (COJON DE PUERCO) Y ***Thevetia ahouia*** (COJON DE COSTA DE HOJAS LARGAS) DE LA FAMILIA APOCYNACEAE.

TRABAJO DE GRADUACION
PRESENTADO POR:
CARLOS ALBERTO ABREGO URBINA
JIMMY HONLES CASTRO

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA.

FEBRERO DE 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR. CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Ing. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

Dra. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

Licda. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

Lic. REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Coordinadora 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

Agradecimientos del grupo:

Este trabajo de graduación no sería una realidad sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que deseamos agradecerles sinceramente por su colaboración en esta campaña. A nuestros docentes directores, Dr. Marvin J. Núñez y Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, por toda la ayuda, paciencia, tiempo y dedicación. Por brindarnos la oportunidad de trabajar con ellos y 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 nuestra gratitud al Lic. Henry Hernández, Dr. Néstor Orellana Velado y Dr. Luis Parada Gómez por instruirnos tan valiosamente en los análisis espectroscópicos.

A la Dra. Laila Moujir y su equipo de colaboradores, Lic. Jorge Monterrosa, Ing. Planas por compartir sus inigualables conocimientos en sus áreas. A Lic. María Elisa Vivar de Figueroa y al equipo de trabajo de química agrícola, por siempre apoyarnos en las decisiones más importantes en nuestra especialización. A la sección de estadística del ministerio de salud pública y asistencia social, gracias por su valioso aporte. A todos nuestros docentes durante la carrera, gracias por sus consejos, ayuda y conocimientos. A los amigos y amigas así como a los compañeros y compañeras que hemos conocido en todos estos años y con los que hemos compartido trabajo y amistad. Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en esta investigación. Nuestros más sinceros agradecimientos.

Agradecimientos Carlos Abrego:

Son muchas las personas que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada. A mis docentes directores, Dr. Marvin J. Núñez y Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos, por todo el tiempo que me han brindado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la 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 paciencia y por la dirección de este trabajo. También expresar gratitud al Dr. Néstor Orellana, Dra. Laila Moujir y Dr. Parada por sus consejos, ayuda y conocimientos. No puedo olvidar a mis compañeros, amigos dentro y fuera del salón de clase con los cuales he compartido espacio e incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme. Gracias Shane Dheming, David Lemus, Fernando Menjivar, Jeannete Romero y Jorge Dennis Martinez, Osmin Palma y Lilly Santos por su amistad y ayuda que no tiene precio.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional de mi familia, mis padres y mis hermanos que me acompañaron en esta aventura que significó la superación y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Esto también es vuestro premio. Gracias totales.

Agradecimientos Jimmy Honles:

A mis padres Ing. Guillermo Alfonso Honles y Gloria Castro, por estar allí con sus consejos oportunos, por su amor y apoyo incondicional. Gracias por sus oraciones que han llegado a la misericordia de Dios. A Paola Garcia, tú fuiste quien siempre me alentó a seguir adelante, gracias por creer en mí y estar siempre a mi lado, para mi eso no tiene precio. A mi hermano Lic. Mario Alfonso Honles, su esposa Ligia de Honles, a mis sobrinos Bryan Honles, Deborah Honles y Mario Alfonso Honles Jr., gracias por todo su respeto, cariño, apoyo y comprensión que cada uno me ha brindado de corazón. A todas las personas importantes que fueron parte esencial para realizar este trabajo: Alejandra Alvarado, Zonia de Garcia, N. Honles, Carlos Rodriguez, Daniel Palomo, Marlon Recinos, Renato Mejía , José María Rivera, José Estebes, Edmundo Lazo, Josue Adonay Cruz, Ever Miranda, Marcos Alvarado, Alexander Guerrero, Daniel Marinero, Francisco Iraheta, Javier Romero, Javier Soriano, Samael Osorio, Oscar Navarro, Gerardo Ramirez y sus hijas, Ivonne Garcia, gracias por su respaldo y contribución en mi formación.

A mis compañeros (as) y amigos (as) del sector estudiantil del Consejo Superior Universitario y a las autoridades universitarias de la gestión 2009-2011. Al Lic. Salvador Castillo y a la Ing. Estela Carbajal, gracias por instruirme en mi carrera así como en mi vida y brindarme su sincera amistad, estare por siempre agradecido. A mis tios, primos, sobrinos y demás familia, y a cada uno de los docentes que formaron parte activa en mi formación académica; Daniel Serrano, Wilmer Flamenco, Marvin Orantes, Carlos Ventura, William Galan, Emerson y Dennis Martinez y demás compañeros(as) de la facultad de Química y Farmacia, amigos(as) y seres queridos que colaboraron con mi persona de forma directa o indirecta dentro o fuera del Alma Mater. Gracias infinitas.

DEDICATORIA

Dios siempre cuida de sus criaturas, pero lo hace a través de los hombres. Si alguna persona muere de hambre, no es que Dios no lo haya cuidado; es porque nosotros no hicimos nada para ayudarla, no supimos reconocer a Cristo bajo la apariencia de ese hombre desamparado.

Madre Teresa de Calcuta

PRIMERO A DIOS: El omnipotente, en quien todo es posible, es Él quien concede la sabiduría y el entendimiento. Gracias a su infinita misericordia por otorgarnos la vida ya que fue Él quien nos dio la fortaleza, la salud y la paciencia para poder culminar nuestra carrera con éxito.

A veces, cuando considero las tremendas consecuencias de las cosas pequeñas... me siento tentado a pensar...que no hay cosas pequeñas. Así el hombre es un proceso continuo, en ningún momento está acabado, es un ser que se está haciendo, que se está construyendo a cada instante; se le puede llamar "Hombre" en cuanto va creciendo y va madurando. Somos lo que hacemos día a día. De modo que la excelencia no es un acto, sino un hábito.

Aristoteles

A LIC. Q. F. RENE ANTONIO RODRIGUEZ SORIANO (Q.D.D.G.): gracias por compartir sus invaluable conocimientos, por estar allí con sus consejos oportunos, por tender siempre una mano amiga, por su paciencia, entrega y dedicación en nuestra formación académica, nunca lo olvidaremos.

Carlos Alberto Abrego Urbina.

Jimmy Honles Castro.

ÍNDICE.

	Página N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xxii
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	27
3.1 Generalidades sobre glicósidos cardiotónicos.	27
3.2 Actividad anticancerígena de los glicósidos cardiotónicos.	32
3.2.1 Estudios y antecedentes.	32
3.2.1 Aplicabilidad clínica de los glicósidos cardiotónicos.	41
3.3 Generalidades de los procesos cancerígenos.	42
3.3.1 Fundamentos teoricos y farmacologicos	42
3.3.2 El cáncer.	44
3.3.3 Mecanismos propuestos generadores de los efectos antiproliferativos celulares.	49
3.4 Lineas celulares cancerígenas.	54
3.4.1 Cáncer o carcinoma de mama.	54
3.4.2 Cáncer cervicouterino.	58

3.4.3	Cáncer pulmonar.	63
3.5	Generalidades de las especies a estudiar.	69
3.5.1	Generalidades de <i>Thevetia ahouia</i> .	69
3.5.2	Generalidades de <i>Plumeria rubra</i> .	72
3.5.3	Generalidades de <i>Stemmadenia donnell-smithii</i> .	75
3.6	Generalidades de los métodos de extracción, fraccionamiento y separación de productos naturales.	77
3.7	Generalidades de cromatografía.	86
3.7.1	Clasificación de los procesos cromatograficos.	86
3.7.2	Clasificación según el mecanismo de separación.	87
3.7.3	Orden de polaridad de los compuestos orgánicos.	89
3.7.4	Orden de polaridad de los eluyentes más habituales.	89
3.8	Cromatografía en capa fina.	90
3.8.1	Fundamento.	90
3.8.2	Visualización del cromatograma.	92
3.8.3	Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.	92
3.9	Elucidación estructural.	93
3.9.1	Espectroscopia infrarroja (IR).	
3.9.2	Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS).	95
3.10	Cuantificación de glicósidos cardiotónicos.	96
3.11	Determinación de la actividad citotóxica.	97

3.11.1 Generalidades de la actividad citotóxica.	97
3.11.2 Generalidades sobre cultivos celulares.	98
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	102
4.1 Tipo de estudio.	102
4.1.1 Investigación bibliográfica.	102
4.1.2 Investigación de campo.	103
4.1.3 Investigación de laboratorio.	104
4.1.3.1 Preparación de las muestras a investigar.	104
4.1.3.2 Molienda del material vegetal.	104
4.1.3.3 Pesada del material vegetal.	104
4.1.3.4 Obtención del extractos hidroalcohólicos de las raíces y flores de <i>Thevetia ahouia</i> , <i>Plumeria rubra</i> y <i>Stemmadenia donnell-smithii</i> .	105
4.1.3.5 Fraccionamiento por partición líquido-líquido.	105
4.1.3.6 Identificación de glicósidos cardiotónicos por el método de cromatografía de capa fina.	106
4.1.3.7 Análisis espectroscópico de las muestras positiva para glicósidos cardiotónicos.	107
4.1.3.7.1 Análisis espectroscópico ultravioleta.	108
4.1.3.7.2 Análisis espectroscópico infrarrojo.	109
4.1.3.8 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos.	109
4.1.3.9 Determinación de la actividad citotóxica.	111

CAPITULO V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	116
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	146
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	149
8.0 Bibliografía	151
Glosario	157
Anexos	162

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pagina N°
1. Estructura de la bufalotoxina.	28
2. Clasificación de glicósidos cardiotónicos.	31
3. Estructura de la proscilaridina.	34
4. Glicósidos cardiotónicos que presentaron mayor actividad citotóxica.	35
5. Glicósidos cardiotónicos aislados de las semillas de <i>Cerbera odollam</i> .	36
6. Glicósidos bufadienólidos obtenidos de los rizomas de <i>Helleborus orientalis</i> .	38
7. Glicósidos cardenólidos obtenidos de las raíces y partes aéreas de <i>Asclepias curassavica</i> .	39
8. Glicósidos cardiotónicos aislados de la corteza de <i>Thevetia peruviana</i> .	40
9. a) Microfotografía de células tumorales a través del torrente sanguíneo donde interactúan con linfocitos; la adhesión con las plaquetas favorece a la formación de émbolos tumorales. b) Microfotografía del tejido nervioso especializado que es posible blanco de la extravasificación tumoral donde posiblemente se genere una nueva angiogénesis.	43

10. Ciclo celular donde se determinan las señales genéticas en el organismo humano para el desarrollo de un proceso tumoral	47
11. Mecanismos de acción de glicósidos cardiotónicos en células cancerígenas	53
12. Área anatómica donde se generan los carcinomas de mama localizando los vasos linfáticos	54
13. Estructuras anatómicas donde se desarrolla el carcinoma cervicouterino	58
14. Diagrama de partes anatómicas internas y externas afectadas por tejido canceroso cervico uterino. Vista del cuello uterino visto a través de un espéculo	61
15. Representación de pulmones de un hombre fumador con cáncer diseminado a nivel bronquial y lobular.	63
16. Sustancias que contiene regularmente un cigarrillo. Encerrados en un círculo con la letra C azul, se representan los compuestos carcinogénicos.	65
17. Comparación con vista al microscopio de alveolos pulmonares con enfisema y alveolos normales.	68
18. Thevetia ahouia . A) Detalle de raíz. b) Detalle del fruto y c) Detalle de las flores.	70
19. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de Thevetia ahouia	71
20. Plumeria rubra . A) Detalles de la raíz. b) Detalles del árbol y c) Detalle de flores.	74

21. <i>Stemmadenia donnell-smithii</i> : a) Detalle de raíz, b) Detalle del fruto, y c) Detalle de las flores.	74
22. Aparato de extracción por reflujo.	76
23. Aparato de extracción continua Soxhlet.	82
24. Espectro IR de la digitoxigenina	84
25. a) Cromatografía en capa fina: Cámara UV, b) Cámara de revelado y c) cromatografía de capa fina revelada.	85
26. Espectro de IR de digoxina	91
27. Espectro ultravioleta de la digitoxigenina.	94
28. Espectro de IR de digoxina.	94
29. Espectro ultravioleta de la digitoxigenina.	96
30. Esquema de trabajo (a)	113
31. Esquema de trabajo (b).	114
32. Resultado del fraccionamiento líquido-líquido de los extractos hidroalcohólicos de flor y raíz de <i>Thevetia ahouia</i>	121
33. Placa cromatográfica reveladas con Baljet	122
34. Espectro UV de la digitoxigenina (testigo).	124
35. Espectro UV de la digoxina (testigo).	125

36. Espectro UV de fracción 1 (Ta-1), flor de <i>T. Ahouia</i> en AcOEt	125
37. Espectro UV fracción 2 (Ta-2), raíz de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂ .	126
38. Espectro UV de fracción 3 (Ta-3), flores de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	126
39. Espectro IR de digitoxigenina (testigo).	128
40. Espectro IR de fracción 1 (Ta-1), Flor de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	128
41. Espectro IR de fracción 2 (Ta-2), Raíces de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	129
42. Espectro IR de fracción 3 (Ta-3), Flores de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	129

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°	N° de Página
1. Factores de riesgo que elevan las probabilidades de desarrollar carcinoma de mama.	57
2. Peso del material vegetal seco inicial de flores y raíces de <i>Plumeria rubra</i> , <i>Stemmadenia donnell-smithii</i> y <i>Thevetia ahouia</i>	117
3. Comportamiento de las densidades de los disolventes orgánicos frente a la densidad del extracto hidroalcohólico	119
4. Resultado de la evaluación cromatográfica, de las diferentes fracciones procedentes de las flores y cortezas de raíces de <i>Thevetia ahouia</i>	123
5. Absorbancia y longitud de onda máxima en la región ultravioleta de cada una de las fracciones y testigo	127
6. Bandas de absorción en Infrarrojo, más característica en glicósidos cardiotónicos presentes en cada una de las fracciones y testigos	130
7. Descripción del estándar de digoxina	131
8. Interpretación de medidas estadísticas de dispersión	134
9. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones hidroalcohólicas	138
10. Porcentaje de glicósidos cardiotónicos de cada fracción	139

11. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en flor y corteza de raíz de <i>T. ahouia</i> , en base a material vegetal seco	140
12. Resultados de la actividad citotóxica <i>in vitro</i> de las fracciones de <i>Thevetia ahouia</i>	143

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo N°	N° de Página
1. Documento de identificación de especies en estudio, concedido por la Sección Técnica científica del Jardín Botánico La Laguna.	162

RESUMEN

Varias especies de la familia Apocynaceae son fuentes reconocidas de glicósidos cardiotónicos, los cuales son un grupo de metabolitos 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, con el fin de incrementar la fuerza de contracción del corazón.

En la actualidad existen varios estudios que reportan a los glicósidos cardiotónicos como prometedores agentes anticancerígenos. Tomando en cuenta dichos antecedentes, se realizó el presente trabajo, cuyo objetivo principal es investigar la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de tres especies de Apocynaceae: ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***.

En el análisis fitoquímico se determinó la presencia de glicósidos cardiotónicos, por medio de técnicas cromatográficas (capa fina) y espectroscópicas (ultravioleta e infrarrojo), detectándose en tres fracciones, obtenidas de las flores y raíces de ***Thevetia ahouia***, resultando las otras dos especies en estudio negativas en las pruebas de detección de estos metabolitos. A las fracciones positivas se les determinó el contenido de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, obteniéndose mayor porcentaje de estos metabolitos en las flores de ***Thevetia ahouia***. A la vez se determinó la actividad anticancerígena *in vitro*, frente a tres líneas celulares: MCF-7 (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.

De las tres fracciones ensayadas la más activa fue la de raíces de ***Thevetia ahouia*** en diclorometano especialmente frente a la línea celular A-549, cuyos valores resultaron ser incluso menores que la mercaptopurina, utilizada como control positivo presentando también toxicidad media y débil, frente a las líneas HeLa y MCF-7 respectivamente.

Sin embargo, resulto ser muy toxica para las células normales al igual que la fracción de flores de ***Thevetia ahouia*** en diclorometano, la cual no posee actividad citotóxica en contra el adenocarcinoma humano de mama (MCF-7). En cuanto a la fracción de flores de ***Thevetia ahouia*** en acetato de etilo resulto no poseer actividad citotóxica tanto para las tres líneas cancerígenas como para las células Vero, ya que no fue capaz de inhibir el 50% del crecimiento celular. Se logro comprobar que las fracciones diclorometánicas de raices y flores de ***Thevetia ahouia*** mostraron actividad frente el carcinoma humano de cuello uterino (HeLa) con valores de IC₅₀ muy buenos.

La fracción de raíces de ***Thevetia ahouia*** en diclorometano presento actividad significativa frente al adenocarcinoma humano de mama (MCF-7). Sin embargo, frente a las células Vero ambas fracciones mostraron una muy alta toxicidad convirtiéndose éstas en sustancias muy poco viables para un posterior estudio como agentes anticancerígenos, frente a estas líneas celulares.

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.

El uso de productos naturales como agentes terapéuticos humanos se remonta a más de dos mil años. Los glicósidos cardiotónicos así como otros metabolitos biológicos de las plantas han sido utilizados para muchos fines; los usaron como venenos en flechas (***Strophanthus***) y como drogas para el corazón (***Digitalis***). Se descubrió que las hojas de ***Digitalis purpurea*** eran útiles para tratar la hidropesía. Así se comenzó a utilizar los extractos de dicha planta para el tratamiento de enfermedades cardíacas.

Los glicósidos cardiotónicos, son un grupo de compuestos naturales, que derivan biogénicamente del colesterol y han sido extensamente utilizados en el tratamiento de algunas enfermedades cardíacas (3). Estos metabolitos tienen efectos inhibitorios específicos sobre la bomba de Na^+/K^+ ATPasa (19).

Los glicósidos cardiotónicos se clasifican según la aglicona cardiotónica que esta posea en cardenólidos, por ejemplo: digitoxigenina de la ***Digitalis purpurea*** y bufadienólidos como la hellebrigenina de la ***Helleborus niger***. Los cardenólidos se encuentran frecuentemente en las Familias Apocináceas, Asclepiadaceas, Scrophulariaceas y Liliáceas. Los bufadienólidos se han encontrado en la piel de los sapos del género ***Bufo***, aunque también se han aislado de algunas especies de Liliáceas (***Urginea***) y Ranunculáceas (***Helleborus***). Además se han encontrado glicósidos cardiotónicos en algunas tipos de insectos, como mariposas y luciérnagas, además de serpientes. Estos glicósidos son capaces de modular el funcionamiento del corazón, actuando sobre la contractibilidad del músculo cardíaco. Se prescriben en la insuficiencia cardíaca congestiva (incapacidad de expulsar un volumen de sangre adecuado).

Además de la acción sobre el musculo cardiaco, hoy en día se ha demostrado, que presentan actividad anticancerígena, dirigiéndose los nuevos estudios hacia esta actividad.

En el presente trabajo se analizaron las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, procedentes de los extractos hidroalcohólicos de las raíces y flores de ***Plumeria rubra*** (Flor de mayo), ***Stemmadenia donnell-smithii*** (Cojon de puerco) y ***Thevetia ahouia*** (Huevo de gato), en la búsqueda de glicósidos cardiotónicos, los cuales se determinaron por cromatografía de capa fina (CCF) utilizando el agente revelador de Baljet.

Las fracciones que presentaron glicósidos cardiotónicos fueron analizadas por espectroscopia infrarroja (IR) y ultravioleta (UV) y la cuantificación de los glicósidos cardiotónicos se realizo por el método de la farmacopea italiana y fue expresado como digoxina. La actividad citotóxica fue determinada en tres líneas celulares: carcinoma humano de cuello uterino (HeLa), cáncer humano de pulmón (A-459) y adecarcinoma humano de mama (MCF-7).

Este trabajo es la continuación de varios estudios fitoquímicos realizados a diferentes Familias de plantas (España, México, etc.) con la intención de buscar nuevos agentes terapéuticos más potentes y con menos efectos secundarios adversos. El Salvador cuenta con especies prometedoras en la búsqueda de nuevos agentes citotóxicos y anticancerígenos, lo cual habré las puerta - - futuras investigaciones en el campo farmacéutico y de la medicina.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

Identificar, cuantificar y determinar la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de *Plumeria rubra* (Flor de Mayo), *Stemmadenia donnell-smithii* (Cojón de puerco) y *Thevetia ahouia* (Cojón de costa de hojas largas) de la Familia Apocynaceae.

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Realizar los extractos hidroalcohólicos de las raíces y flores de *Plumeria rubra* (Flor de Mayo), *Stemmadenia donnell-smithii* (Cojón de puerco) y *Thevetia ahouia* (Cojón de costa de hojas largas).

2.2.2 Obtener las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo, a partir de los extractos hidroalcohólicos de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia*.

2.2.3 Identificar los glicósidos cardiotónicos en las diferentes fracciones.

2.2.4 Realizar la cuantificación los glicósidos cardiotónicos contenidos en las diferentes fracciones.

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

CAPITULO III
MARCO TEORICO.

3.0 MARCO TEORICO.

3.1 GENERALIDADES SOBRE GLICÓSIDO CARDIOTÓNICOS.

Muchos factores son los que afectan a la compleja regulación del corazón por ello no es sorprendente que exista un amplio grupo de drogas que, a su vez, actúan en el funcionamiento cardíaco, no siempre de manera directamente asociada al miocardio.

Sin embargo, el uso terapéutico de drogas para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca está limitado a un pequeño grupo de heterósidos vegetales que actúan directamente sobre el miocardio o músculo cardíaco.

Un número considerable de plantas, distribuidas a lo ancho del reino vegetal, contiene heterósidos de C₂₃ a C₂₄, los cuales ejercen sobre el corazón enfermo un efecto de enlentecimiento y fortificación dependiendo de la dosis.

El enlentecimiento cardíaco que produce estos heterósidos también los hizo eficaces como veneno de flechas y, por ello, numerosas plantas tropicales son mejor conocidas en este sentido que por su uso medicinal.

Hallazgos recientes, sugieren señalar la acción sobre la bomba Na⁺/K⁺ATPasa y diferentes mecanismos de los glicósidos cardiotónicos en la regulación de diversos procesos celulares importantes que muestran un elevadísimo potencial en el tratamiento terapéutico de muchas enfermedades (6).

Quizás lo más notable es que pueden aumentar la susceptibilidad de la célula cancerosa, lo cual permite el uso clínico de la primera generación de fármacos anticancerígenos basados en estos glicósidos.

Además, los resultados inesperados de estudios epidemiológicos que describen de manera significativa una disminución de tasas de mortalidad en los pacientes con cáncer que reciben glicósidos cardiacos; lo cual despertó el interés de nuevo en las propiedades anticancerígenas de estos fármacos (25).

Los glicósidos cardiotónicos son una clase de compuestos que comparten una estructura en común que consiste en una o varias unidades de azúcar y un aglicón que tiene un núcleo esteroideo, unido a un anillo lactónico insaturado.

Existen bufadienólidos en algunos géneros de Liliáceas como por ejemplo la *Urginea*, y en algunas Ranunculaceas como el *Helleborus*.

En los venenos de sapos específicamente del género *Bufo*; estos bufadienólidos de origen animal el OH en C-3 esta esterificado con un ácido dicarboxílico conjugado con un aminoácido, por ejemplo la bufalitoxina cuya genina: bufalina se une a la suberilarginina (8, 27).

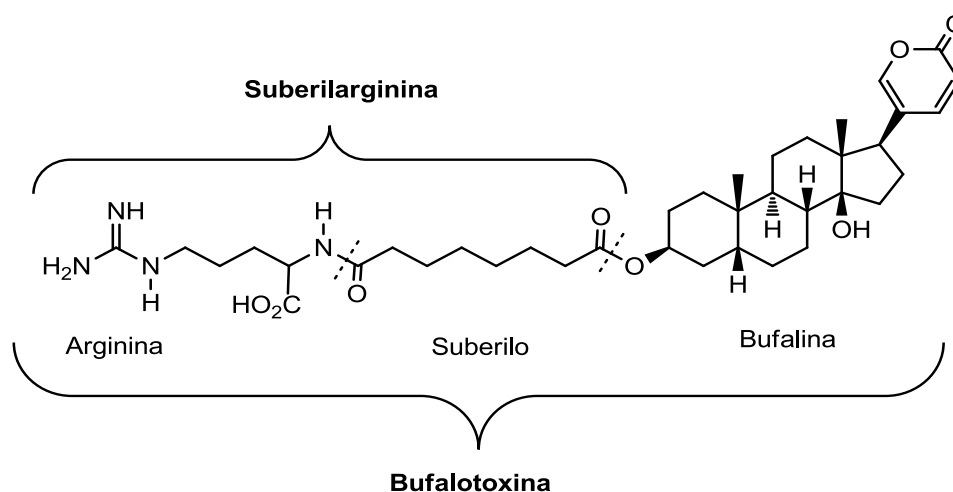


Figura N^o 1. Estructura de la bufalotoxina (8).

El sistema tetracíclico del aglicón, posee dos grupo OH en posición beta en carbonos 3 y 14, 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 el C-17, define la posición de los subgrupos de los glicósidos cardiotónicos (cardenólidos y bufadienólidos) (27).

Los cardenólidos (C-23), poseen una lactona insaturada de cinco miembros (pentagonal) en la posición 17 del núcleo esteroideo; mientras que los bufadienólidos (C-24): poseen una lactona insaturada de seis miembros (hexagonal).

La cadena glicosada unida a la genina a través de de C-3 están constituida por varias moléculas de azúcar, como 6-desoxiazúcares (rhamnosa, mucosa y digitalosa).

Entre estos desoxiazúcares, se citan 2,6-didesoxihexosas (digitoxosa) o sus 3-O-éteres metílicos (cimarosa).

Los cardenólidos son los más comunes y abundan particularmente en las Apocináceas y Asclepiadáceas, pero también se encuentra en algunas especies de Liliaceas, Moráceas, Crucíferas, Esterculiáceas, entre otras (12).

La eficacia farmacológica depende tanto de la genina como de los azúcares a ellas unidos; la actividad inherente reside en la genina, pero los azúcares hacen a los compuestos más solubles e incrementa el poder de fijación al músculo cardíaco, permitiendo una inhibición de la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ dependiente, aumentando la contractilidad intrínseca de la fibra muscular (efecto inótrofo positivo) y el volumen minuto, lo que conduce a la supresión de la hipertonia simpática.

Parece ser que la clave para la unión de la molécula a través de un enlace de hidrógeno al receptor fosforilado enzimático es la función α,β -carbonílica de la lactona.

Todas las geninas activas presentan hidroxilos en C-3 y C-14 mientras que la presencia de un tercer hidroxilo (C-12 ó C-16) puede modificar la actividad y toxicidad del compuesto. Los requerimientos estereoquímicos para la actividad cardiotónica comprenden:

- Un anillo de lactónico α,β -insaturado.
- Anillos A y B en disposición *cis*.
- Grupo hidroxilo en la posición 3 (3β -OH).
- Anillos C y D en disposición *cis*.
- Grupo hidroxilo en la posición 14 (14β -OH).
- Anillos B y C en disposición *trans* (27).

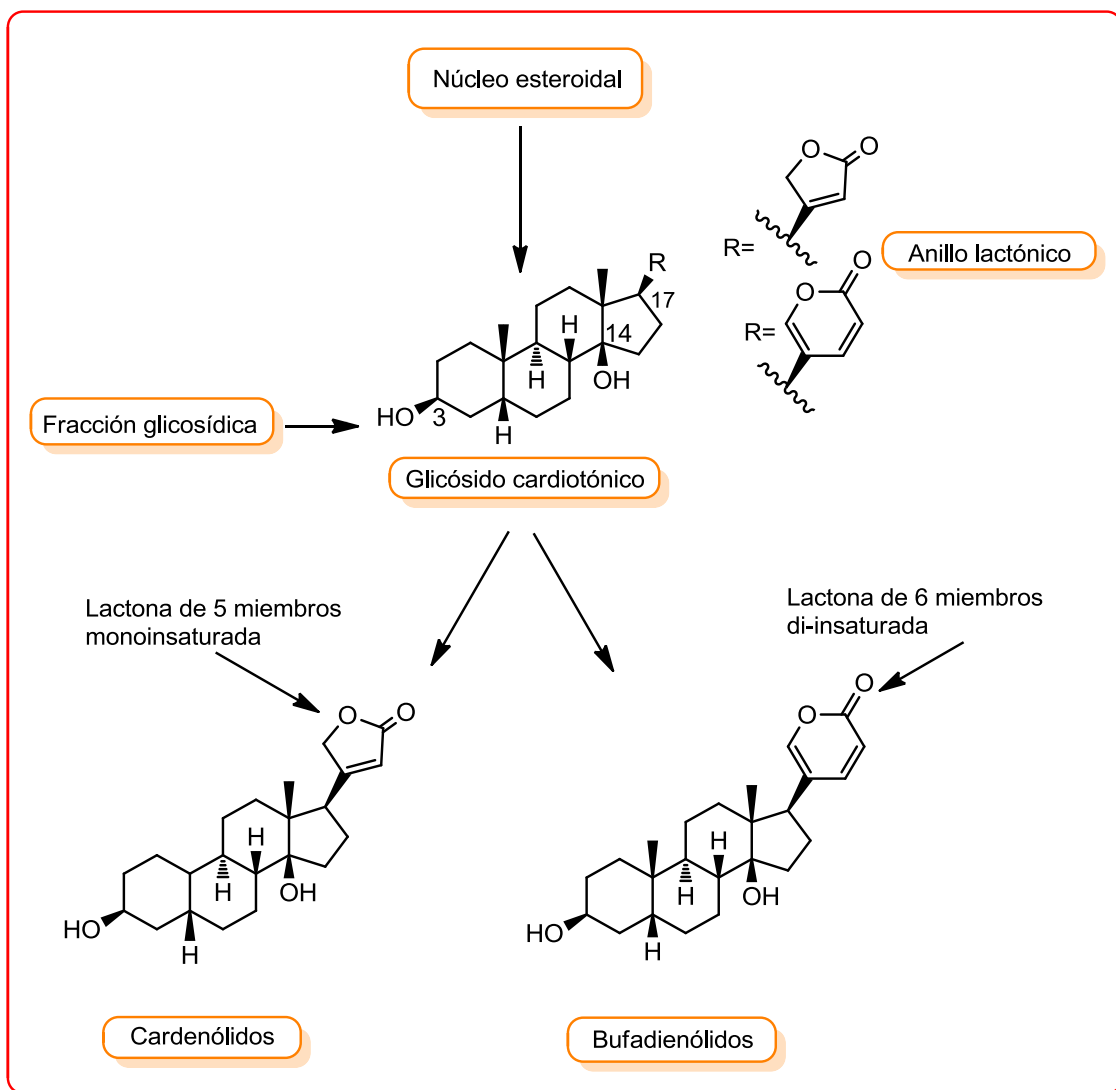


Figura N° 2. Clasificación de glicósidos cardiotónicos (13).

3.2 ACTIVIDAD ANTICANCÉRIGENA DE LOS GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

3.2.1 ESTUDIOS Y ANTECEDENTES.

Se dice que para encontrar una cura hay que entender el comportamiento de la enfermedad en el organismo, así mismo como sus síntomas comunes para lograr reconocerla. El cáncer consiste en líneas generales en el crecimiento anormal de las células. Cuando las células de un tejido realizan una división celular desordenada y acelerada, cabe la posibilidad de que éstas invadan otros tejidos sanos del organismo, provocando su destrucción en muchos casos (5).

En lugar de realizar una muerte celular controlada y programada (apoptosis), las células cancerosas siguen proliferando. Pueden formar una inflamación en un órgano, denominado tumor, que puede ser benigno o maligno. Los síntomas más comunes aunque no siempre son indicadores de cáncer son el sangrado inusual, cambios inexplicables de peso, indigestión y dificultades para tragar ⁽³⁴⁾.

Desde los años 80's el uso de glicósidos cardiotónicos en la terapias anticancerígenas se puso de manifiesto; Stenkvist y *col.*, reportaron la disminución en la proliferación celular de una mujer con cáncer de mama en terapia con digitalicos comparando el resultado con células control de otros pacientes (19).

Al cabo de algunos años se presento una segunda confirmación de los efectos citotóxicos de los glicósidos cardiotónicos y la ventaja en su uso en terapias para combatir el cáncer; Goldin y *col.*, estudiaron los efectos de los digitalicos en 127 pacientes con cáncer. Se demando un estudio mas profundo por la novedad e importancia que representaban los cardiotónicos en dichas terapias

y fue así que Haux y *col.*, sometieron a un análisis de respuesta los efectos potenciales de estos compuestos; la población en estudio fue de 9,271 pacientes, utilizando una terapia con digitoxina se obtuvieron buenos resultados en la disminución considerable de leucemias y cánceres del tracto urinario (19).

Investigaciones recientes implican a los glicósidos cardiotónicos en la regulación de varios procesos celulares y poner en manifiesto su potencia y nuevas funciones contra el cáncer.

Los glicósidos cardiotónicos además de su acción cardiovascular, se le a demostrado su acción citotóxica inhibiendo la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ ocasionando un aumento de Ca^{2+} intracelular dando lugar a la disminución de células cancerígenas y la apoptosis a concentraciones más bajas que las utilizadas en el tratamiento cardiovasculares (35).

Aunque el mecanismo por el cual los glicósidos cardiotónicos vuelven susceptible a las células cancerosas no se ha logrado elucidar por completo y se sugieren varias vías de aniquilación de la célula.

Curiosamente, las marcadas diferencias caracterizan el potencial de estos compuestos de estructura similar.

Por ejemplo, Johansson y *col.*, evaluaron los perfiles citotóxicos por medio de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de siete glicósidos cardiacos en células tumorales, utilizando un panel de 93 líneas celulares humanas.

Así encontraron que la Proscillaridina fue el más potente, seguido por digitoxina, ouabaína, digoxina, lanatosido C y digitoxigenina (19).

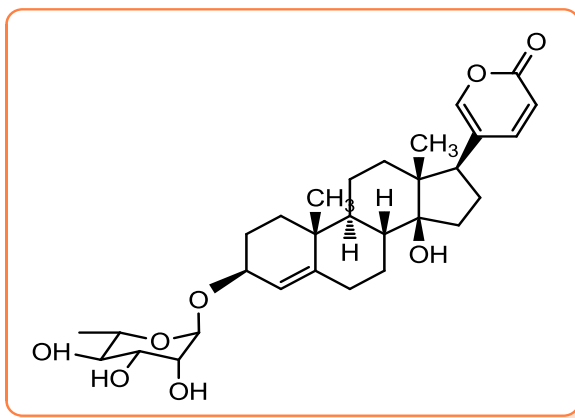


Figura N° 3. Estructura de la Proscillaridina (15).

Muchos son los informes científicos que respaldan la teoría que los glicósidos cardiotónico son una nueva esperanza en el combate de los procesos neoplásicos y cancerígenos. Sin embargo, por lo menos un informe sugiere que estos glicósidos también pueden ejercer una función quimiopreventiva para este tipo de agentes. Se ha sugerido que la oleandrina podría servir como un agente eficaz para la prevención o el tratamiento de cáncer de piel (1).

Lixin Li, y *col.*, 2004 lograron aislar cuatro compuestos biotrasformados de resibufogenina que se obtuvieron después de cuatro días de incubación con suspensiones celulares de *Platycodon grandiflorum*. Por medio de técnicas espectrales, sus estructuras fueron determinadas como 3-*epi*-resibufogenina, marinofagina, 1 β -hidroxi-resibufogenina y 3-*epi*-marinobufagina. Estos compuestos exhibieron actividad citotóxica frente a cuatro líneas celulares Bel-7402 (hepatoma de células humano), BGC-823 (células humanas de cáncer gástrico), HeLa (células humanas de leucemia) y HL 60 (carcinoma humano de cuello uterino).

De las cuales los compuestos marinofagina y 1 β -hidroxi-resibufogenina presentaron una alta actividad citotóxica, mientras que los compuestos 3-*epi*-resibufogenina y 3-*epi*-marinobufagina no mostraron actividad alguna (22).

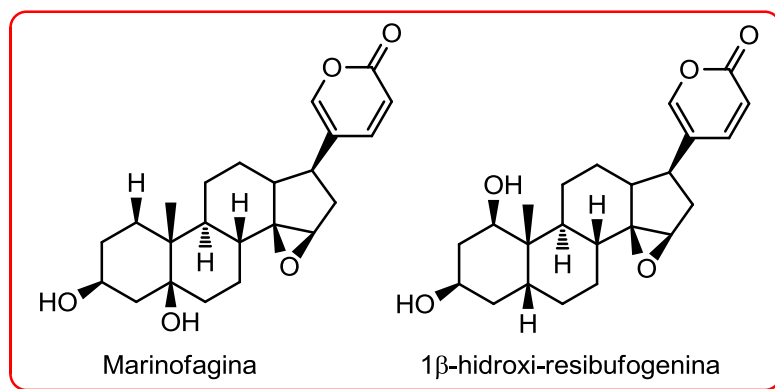


Figura N° 4. Cardiotónicos que presentaron mayor actividad citotóxica (23).

Del análisis realizado a los extracto de semillas de *Cerbera odollam*, se aisló un nuevo cardenólido denominado 3- β -(2'-O-acetil-L-thevetosil)-15-(14 \rightarrow 8)-abeo-5 β -(8*R*)-14-oxo-card-20(22)-enolido (2'-O-acetil cerleasido A), junto con cuatro compuestos: cerleasido A, 17- α -neriifolina, 17 β -neriifolina y cerberina. Todos los compuestos a excepción de cerleasido A, exhibieron citotoxicidad frente a tres líneas celulares: células de carcinoma epidermoide (KB), células de cáncer de mama (CM) y células de cáncer de pulmón (NCL-H187).

Los compuestos 17- α -neriifolina (DE_{50} de 0.032-0.078 mg/mL), 17 β -neriifolina (DE_{50} de 0.017-0.076 mg/mL) y cerberina (DE_{50} de 1.24-1.92 mg/mL); mostraron mayor citotoxicidad frente a tres líneas celulares con valores de (DE_{50} de 0.017 a 1.92 mg/mL) (18).

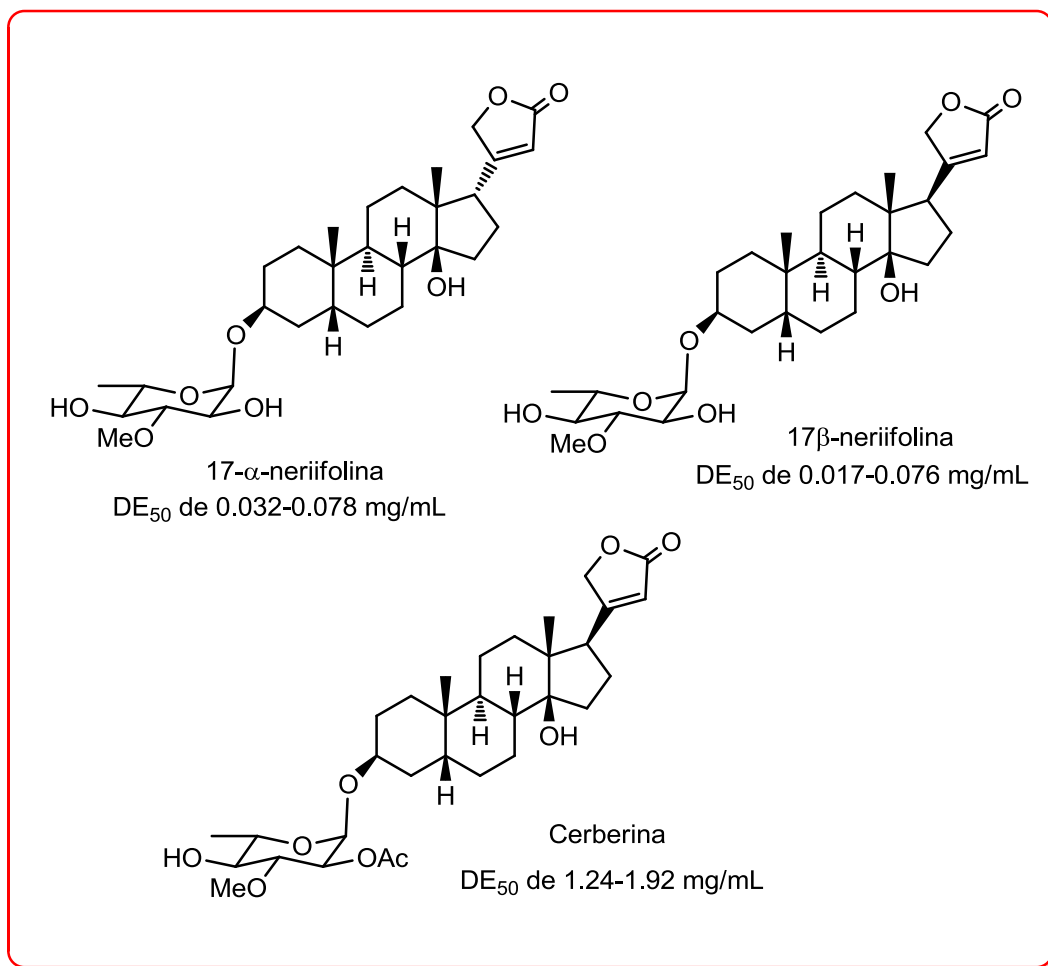


Figura N° 5. Glicósidos cardiotónicos aislados de las semillas de ***Cerbera odollam*** (18).

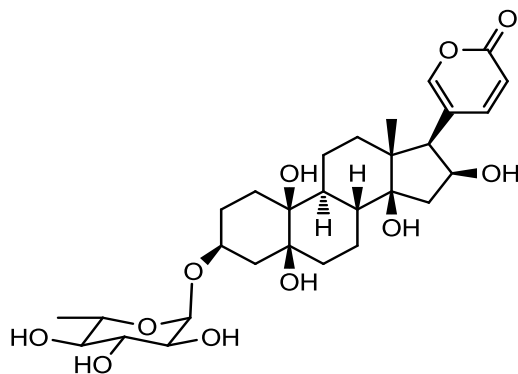
Cabe destacar que en los glicósidos cardiotónico existen marcadas diferencias de citotoxicidad entre ellos, tanto en la potencia y la selectividad. Según resultados de un estudio practicado por Winnicka y *col.*, demostraron que la digitoxina y digoxina expresaba toxicidad selectiva contra las células tumorales (tumores sólidos) de los pacientes en estudio, mientras que la Proscillaridina no expresó ninguna toxicidad selectiva contra los tumores de células sólidas o de las células tumorales hematológicas (34).

Watanabe y *col.*, aislaron de los rizomas de *Helleborus orientalis* un nuevo bufadienólido denominado: 5 β ,14 β ,16 β -trihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -L-rhamnopiranosil)oxi]]bufa-20,22-dienolido, junto con dos bufadienólidos conocidos: 5 β ,14 β -dihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -L-rhamnopiranosil) oxi) bufa]-20,22-dienolido y 5 β ,4 β -dihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -D-glucopiranosil) oxi)] bufa-20,22-dienolido.

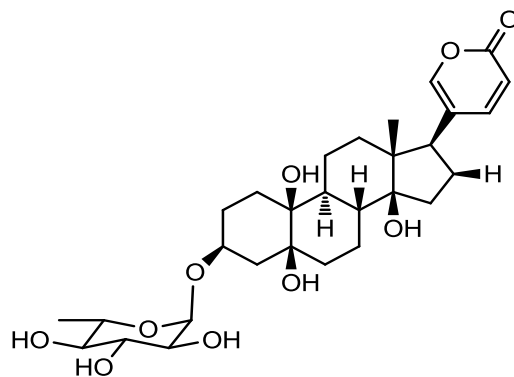
A los compuestos aislados se les realizó ensayos de citotoxicidad frente a cuatro líneas celulares: carcinoma de células escamosas (HSC-2), melanoma de células humanas (A375) (mostrando particular sensibilidad), pero el hepatoma humano (HepG2) fue relativamente resistente a ellos.

El bufadienolido: 5 β ,14 β ,16 β -trihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -L-rhamnopiranosil) oxi]] bufa-20,22-dienolido fue citotóxico tanto para las células tumorales como para las células normales, en cambio los bufadienólidos: 5 β ,14 β -dihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -L-rhamnopiranosil) oxi) bufa]-20,22-dienolido y 5 β ,4 β -dihidroxi-19-oxo-3 β -[(α -D-glucopiranosil) oxi)] bufa-20,22-dienolido, tuvieron mayor especificidad sobre líneas celulares, mostrando débil citotoxicidad contra células normales.

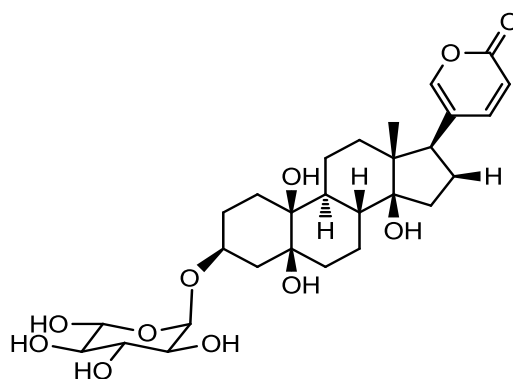
Estos resultados sugieren que los monosacáridos adjuntos a estos bufadienolidos contribuyen a la especificidad en las células cancerígenas (24).



5β,14β,16β-trihidroxi-19-oxo-3β-[(α-L-rhamnopiranosil)oxi]bufa-20,22-dienolido



5α,14β-dihidroxi-19-oxo-3β-[(α-L-rhamnopiranosil)oxi]bufa-20,22-dienolido



5β,4β-dihidroxi-19-oxo-3β-[(β-D-glucopiranosil)oxi]bufa-20,22-dienolido

Figura N° 6. Glicósidos bufadienólidos obtenidos de los rizomas de *Helleborus orientalis* (24).

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 (CI_{50} de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/mL}$). Las líneas celulares ensayadas fueron carcinoma de pulmón A-549, dos carcinomas de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y un hepatoma humano (HepG2). Entre los cardenólidos, la calactina mostro la más potente actividad con un (IC_{50} de 2.9 $\mu\text{g/mL}$).

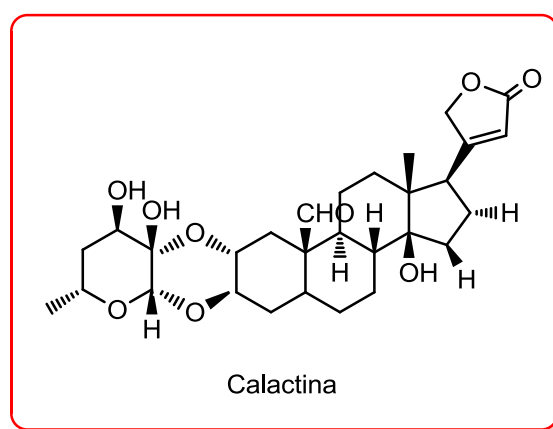


Figura N° 7. Glicósido cardenólido obtenido de las raíces y partes aéreas de *Asclepias curassavica* (9).

Estudios de sensibilidad realizados en base a la utilización de un complejo proteínico relacionado con los factores de necrosis tumoral (TNF) el cual se conoce como ligando de muerte inductor a la apoptosis (TRAIL), al cual se le comprobó el efecto a la inducción de apoptosis por dicha proteína en células tumorales. Se llevo a cabo la obtención de extractos de la corteza de *Thevetia peruviana*; aislando cuatro glicósidos cardenólidos: neriifolina, thevefolina, peruvosido y (20S)-18,20-epoxidigitoxigenina- α -L-thevetosido. En particular, los glicósidos cardenolidos neriifolina y thevefolina demostraron tener un efecto significativo en combinación con la proteína TRAIL en células humanas de adenocarcinoma gástrico.

Los compuestos neriifolina y thevefolina mostraron una disminución de 36% y 46%, respectivamente, de la viabilidad celular en presencia de TRAIL. Lo que implica que neriifolina y thevefolina tenía un efecto sinérgico en combinación con TRAIL contra las células AGS (células de carcinoma gástrico). También se examinó el efecto de thevefolina sobre la expresión del ARNm de receptores de muerte celular (DR4) y (DR5) en tiempo real por análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (26).

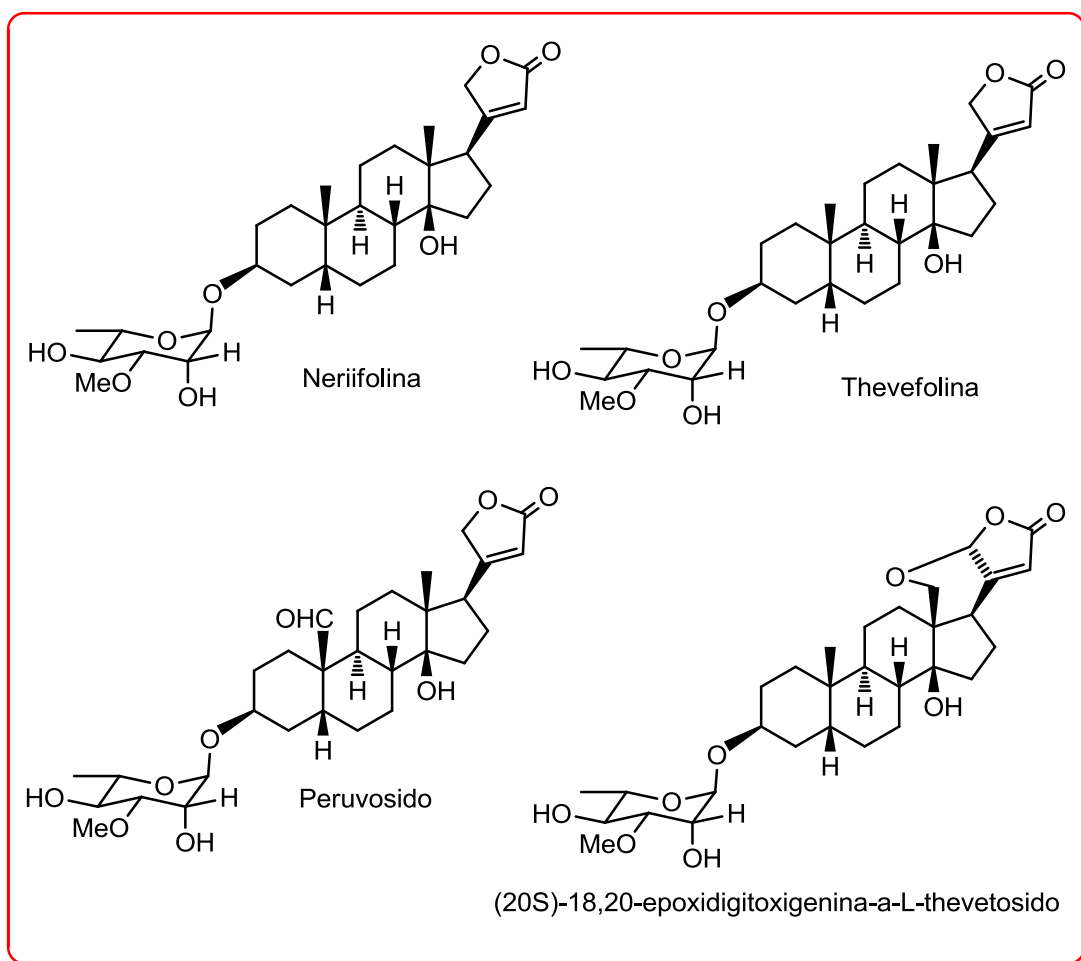


Figura N° 8. Glicósidos cardiotónicos aislados de la corteza de *Thevetia peruviana* (26).

3.2.2 APLICABILIDAD CLINICA-TERAPEUTICA DE LOS GLICOSIDOS CARDIOTONICOS.

Medicamentos basados en glicósidos cardiotónicos contra el cáncer en la clínica han permitido conocer la farmacodinamia y la farmacocinética ya bien establecida, los cuales proveen una mejor vía de dosificación y menor número en ensayos clínicos.

En abril del año 2000, la Administración de drogas y alimento de los Estados Unidos de América conocida por sus siglas en inglés (FDA) aprobó la Fase I en el estudio del fármaco Anvirzel en pacientes con tumores sólidos. Anvirzel es un medicamento el cual consiste en un extracto acuoso de la planta ***Nerium oleander***.

Contiene una variedad de compuestos incluidos los polisacáridos, proteínas, azúcares y glicósidos cardiotónicos, oleandrin principalmente y su aglicona oliandrigenina. Se ha demostrado que Anvirzel inhibe la proliferación de FGF2 de las células cancerosas de la próstata a través de la bomba de sodio-potasio.

En cuanto al carcinoma bronquio-pulmonar se sabe que se forma una inflamación profunda del pulmón de naturaleza quística que se caracteriza por una marcada fibrosis la cual se atribuye principalmente a una producción excesiva de IL8 en el pulmón. Curiosamente, la oleandrina ha demostrado inhibir la respuesta biológica mediada IL8, en diversos tipos de células mediante la modulación de receptores IL8 por medio de la alteración de fluidez de la membrana plasmática (19).

3.3 GENERALIDADES DE LOS PROCESOS CANCERÍGENOS.

3.3.1 FUNDAMENTOS TEORICOS Y FARMACOLOGICOS.

Uno de los componentes más importantes del desarrollo es el crecimiento celular, el hombre puede llegar a tener 10^{15} células aproximadamente a partir de las sucesivas divisiones que tienen lugar en un simple huevo fertilizado. Mientras es joven, la multiplicación celular predomina sobre la muerte celular, lo cual se traduce en un aumento de tamaño, en el adulto, el proceso de división celular y el de muerte celular se encuentran en equilibrio dando lugar a un estado estacionario, donde el número de células permanece relativamente constante.

En el organismo adulto, no todas las subpoblaciones celulares se comportan de la misma manera, existen células que abandonan el ciclo celular para diferenciarse y su renovación es escasa o nula, como sucede con las neuronas, otras como las de la piel son de manera constante sustituidas pasando de un proceso de mitosis al otro.

Un tercer grupo de células se encuentran en un estado quiescente o período "Go" del cual ellas pueden salir y volver a tomar parte del ciclo celular si fuese necesario, esto le ocurre a las células encargadas de restablecer los linajes hematopoyéticos, o las células hepáticas.

Todos éstos, constituyen ejemplos concretos del riguroso control al que se encuentra sometido el crecimiento celular, el cual responde siempre a las necesidades específicas del organismo.

Si estos controles que regulan la multiplicación celular no funcionan de manera adecuada, la célula comienza a crecer y a dividirse aunque no sea necesario. Cuando la descendencia de éstas hereda la tendencia proliferar sin control, el resultado es un clon que se expande indefinidamente y se forma el tumor. Estos tumores pueden ser benignos o llegar a malignizarse si son capaces de invadir y diseminarse hasta llegar a la metástasis (25).

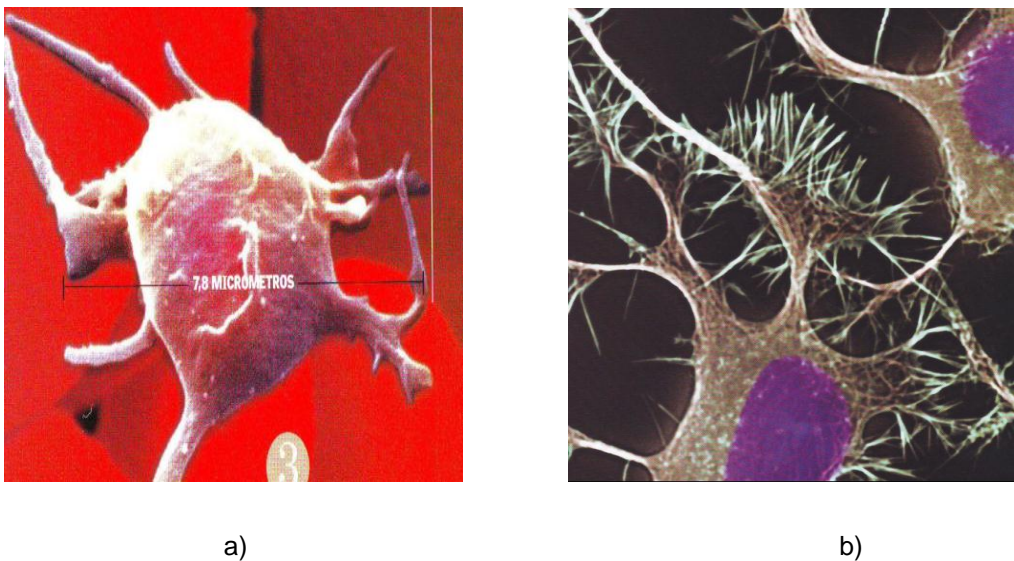


FIGURA Nº 9. a) Microfotografía de células tumorales a través del torrente sanguíneo donde interactúan con linfocitos; la adhesión con las plaquetas favorece a la formación de émbolos tumorales. b) Microfotografía del tejido nervioso especializado, el cual es posible blanco de la extravasificación tumoral donde se lleve posiblemente a cabo una nueva angiogénesis.

La metástasis es el proceso que se refiere al pasaje de células cancerosas del lugar original de proliferación a otro con el que no está en contacto directo (por ejemplo, del pulmón al cerebro). Para lograr esta migración, las células construyen su propio sistema circulatorio y de alimentación de nutrientes (angiogénesis) (25).

Esto les sirve para penetrar en los vasos sanguíneos (intravasificación), y para sobrevivir luego de la extravasificación (25). A pesar de que 1 de cada 1,000 células pueden sobrevivir los complejos intermediarios, de llegar a ocurrir la metástasis, es casi irreversible, y sus daños, irreparables.

3.3.2 EL CÁNCER.

El cáncer es una familia de enfermedades caracterizada por la proliferación celular descontrolada con formación de tumores. Se conocen más de 100 tipos de cáncer aunque los más frecuentes son los de pulmón, mamas y colon rectal que juntos corresponden al 44% del total de casos. Cada tipo de cáncer tiene su curso clínico, pronóstico y tratamiento característicos.

Los tumores originados en la proliferación celular descontrolada pueden ser benignos o malignos. Los benignos se localizan en un tejido y carecen de la capacidad para invadir a otros (metástasis). Los malignos invaden el tejido adyacente y pueden metastatizarse a otros lugares del cuerpo. Los cánceres se clasifican según el tejido y el tipo celular.

Los carcinomas provienen de tejidos derivados del ectodermo o el endodermo, los sarcomas provienen de tejidos derivados del mesodermo y las leucemias y linfomas aunque son también derivadas del mesodermo se clasifican por separado porque su tratamiento clínico es muy diferente, afectando a células del sistema hematopoyético. Las leucemias y linfomas corresponden a casi el 50% de los cánceres infantiles (21).

El proceso de formación definitiva del cáncer comprende dos fases o periodos previos no cancerosos: la hiperplasia y la displasia. En la hiperplasia aunque la estructura celular permanece normal, se da un aumento de tamaño del tejido.

La hiperplasia es reversible. En la displasia el tejido pierde su apariencia normal. Al igual que la hiperplasia, este estado se detecta con una biopsia. La tercera fase es el cáncer propiamente dicho en el cual las células realizan un crecimiento descontrolado y se asientan en un lugar. Si estas células migran se produce la metástasis. El volumen celular va aumentando a medida que las células realizan la división celular sin control. Esta proliferación se puede detectar a partir de estudios realizados con tejido vivo al microscopio (biopsia).

El desarrollo de cáncer comprende varios pasos y la posibilidad de adquirirlo aumenta con la edad como vimos anteriormente son los factores ambientales los que predominan en la iniciación de esta transformación maligna al provocar activación de oncogenes y/o mutaciones en genes supresores tumorales (GST) y genes que promueven la formación de tumores por efecto secundario sobre otros; aunque pueda haber predisposición por herencia de alelos mutados de GST el factor ambiental es determinante.

Los cambios esenciales que transforman las células normales en cancerosas se deben más que nada a mutaciones celulares somáticas. La teoría corrientemente aceptada para explicar la patogenia de esta enfermedad propone que se necesitan varias mutaciones celulares somáticas para producir cáncer (16). Se necesitarían entre 2 y 7 mutaciones somáticas una célula para el inicio y la progresión de tumores malignos (15, 21).

En su inicio, el cáncer da comienzo cuando la acumulación de mutaciones en una sola célula hace que ésta prolifere descontroladamente, por lo que todas las células de un tumor derivan de una sola célula madre. La progenie de la célula transformada tiende a incrementar su malignidad con aumento del número progresivo de cariotipos anormales, aumento de la tasa de crecimiento celular y tendencia a la metástasis.

La aceleración de la proliferación permite que se acumulen nuevas mutaciones somáticas adicionales por fallo o falta de tiempo para la reparación, esto torna a las células más agresivas y proliferan aún más rápido, pudiendo volverse resistentes al tratamiento (progresión) (21).

Esta teoría se llama: teoría del multiescenario de la carcinogénesis. Las células cancerosas son células transformadas y manifiestan cambios en su membrana plasmática, alteraciones en la permeabilidad, alteraciones en las propiedades de transporte, adherencia alterada, aumento de la proporción de lectinas, alteración de la actividad de muchas enzimas, alteración de la carga eléctrica de superficie, aparición de neoantígenos con pérdida de antígenos normales y cambios en la composición glucídica de las glicoproteínas (21).

Alteraciones en la composición lipídica. Cualquier tipo de célula cancerosa habitualmente produce altas cantidades de lactato, lo que se denomina efecto Warburg.

Las células tumorales expresan una forma fetal de Fosfofructoquinasa que no es sensible a la inhibición por ATP y citrato de modo que la glucólisis está activada en forma permanente, favoreciendo la producción de lactato. Estas células transformadas pueden secretar factores angiogénicos (que inducen el desarrollo de vasos sanguíneos para alimentar el tumor) (16).

Este es el caso del Factor de Crecimiento de Fibroblastos, producido normalmente por fibroblastos y en forma controlada que es secretado por una gran variedad de células tumorales sin responder a ningún tipo de regulación. (Las células con tasas de crecimiento más alta tienen mayor ventaja selectiva, es decir mejor supervivencia) (5, 1).

Las células en crecimiento rápido tienden a maximizar sus procesos anabólicos (transcripciones y replications) bloqueando catabolismos como el de las purinas y pirimidinas.

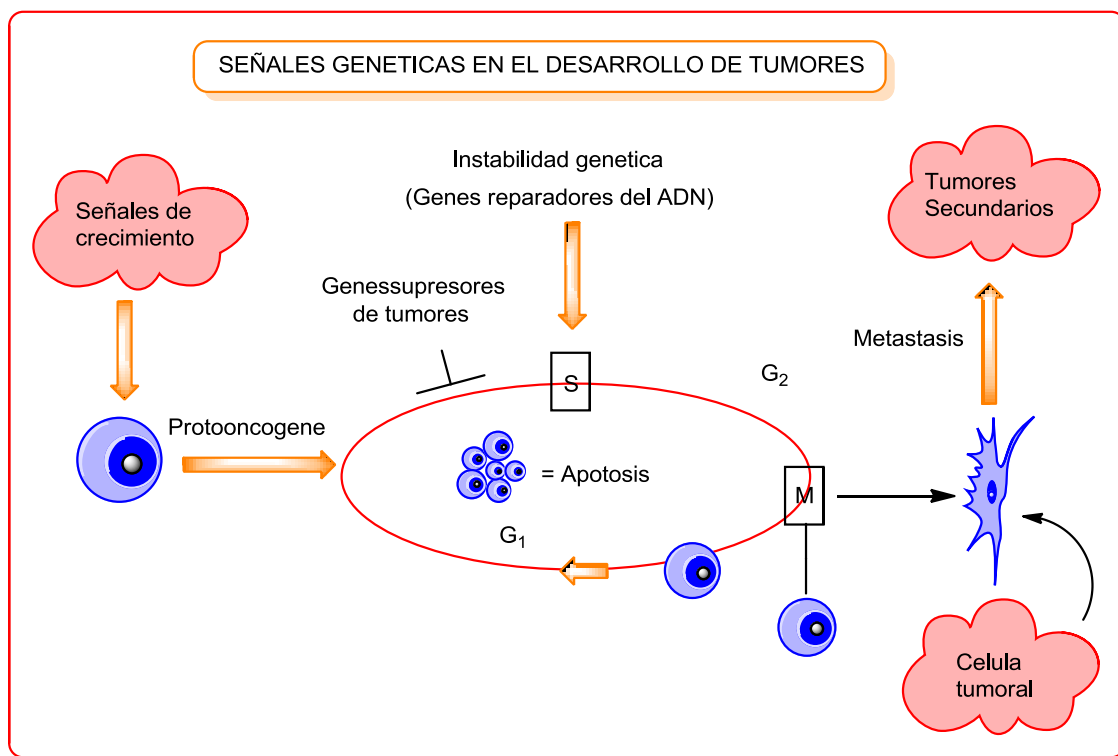


FIGURA N^o 10. Ciclo celular donde se determinan las señales genéticas en el organismo humano para el desarrollo de un proceso tumoral.

Se modifica en ellas la expresión genética, con la inducción de síntesis de proteínas fetales que potencian el descontrol del crecimiento, alteración en la composición de las proteínas de membrana de modo de evadir su destrucción por mecanismos inmunológicos normales y la síntesis de factores de crecimiento u hormonas que no responden a los controles del organismo (1).

El fenómeno de la progresión refleja la inestabilidad del genoma de estas células.

Parece posible que las mutaciones en los genes de la maquinaria de reparación del ADN intervengan en este proceso, así como la mutación de genes adicionales (24). Las células transformadas pueden inducir la expresión de una familia de genes llamados genes de resistencia a multidroga (MDR). Una glucoproteína de membrana llamada glucoproteína P (de pleiotrópica) es la mediadora de la actividad de las MDR y puede ser sintetizada en grandes cantidades por células tumorales.

Esta glucoproteína P actúa como una bomba independiente de energía que bombea hacia fuera de la célula las moléculas de las drogas utilizadas en la quimioterapia volviendo la célula resistente al tratamiento (10,20). La transformación maligna también se asocia con elevada actividad de telomerasa en las células tumorales. Esta ribonucleoproteína permite el acortamiento de los extremos 3' del ADN con acortamiento de los cromosomas con cada replicación y la mayor facilidad para perder genes importantes.

Los tumores malignos producen también metaloproteinasas y colagenasas que facilitan la invasión del tejido adyacente. La digestión enzimática del colágeno y la membrana basal, permite la invasión de vasos capilares y linfáticos (25).

El ingreso de las células tumorales a circulación permite su implantación en sitios adecuados, distantes del tumor primario originando metástasis. Algunos tipos de tumor hacen metástasis en sitios específicos por ejemplo: el cáncer de próstata en hueso, los de pulmón y mama en cerebro.

Las características de las células transformadas hacen del cáncer una entidad muy difícil de controlar siendo, de hecho, una de las principales causas de muerte en todo el mundo (11, 5).

3.3.3 MECANISMOS PROPUESTOS GENERADORES DE LOS EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS CELULARES DE LOS GLICOSIDOS CARDIOTONICOS.

La inhibición de la proteína transplasmática $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ se comporta de forma diferente para una célula normal que para una tumoral; todo el proceso se desenvuelve en forma de cascada por la activación de varios factores celulares. La $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ es el mayor complejo de proteínas de la Familia tipo P de las bombas de cationes, que utiliza la energía derivado de la hidrólisis de ATP para impulsar la participación activa del transporte de los iones de potasio y sodio dentro y fuera de las células en una estequiometría 2:3 (19).

La $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, como una bomba de iones de transducción de energía, ha sido estudiada ampliamente desde su descubrimiento en 1957. Esta enzima consta de dos tipos de subunidades, designadas como subunidad α y β , además de constituir una sola proteína transmembranal.

La subunidad α , responsable de la unión de Mg^{2+} , ATP, Na^+ , K^+ , y glicósidos cardiotónicos, se considera la subunidad catalítica de la enzima. La subunidad β es una glucoproteína que parece actuar como una molécula de adhesión que regula las uniones a proteínas; facilita el transporte de la subunidad α de la membrana plasmática y proporciona el mantenimiento de la enzima en la membrana lateral de las células epiteliales. En total se han descubierto 2 variantes subunidades α y 3 variantes de subunidades β , así como 7 tipos de receptores FXD que son específicos para aminoácidos (1).

La función bien establecida la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ es usar el ATP como fuente de energía para conducir el exceso de Na^+ fuera de las células, a cambio de K^+ , lo cual se mantiene en un equilibrio iónico y osmótico.

La unión de las subunidades α a los glicósidos cardiotónicos inhibe la unión al ATP y se altera la capacidad de la enzima para realizar este intercambio de una manera eficiente. Esto, a su vez, da como resultado una entrada mayor de calcio en las células, que, en el caso de las miofibrillas cardíacas, ayuda a producir una contracción del miocardio más eficiente y mejora la actividad cardíaca.

Entonces, ¿cuál es la evidencia que apoya la hipótesis que la Na^+/K^+ ATPasa puede ser un objetivo importante para la terapia contra el cáncer? Durante los últimos diez años, los estudios publicados han sugerido un papel para la Na^+/K^+ ATPasa en la regulación del crecimiento celular y expresión de los genes que van más allá de la del transporte de iones a través de la membrana.

Sin embargo, parece que simplemente ver el contenido de las subunidades de enzimas o actividad relativa en los tejidos malignos y no malignos, no puede proporcionar una visión adecuada del papel de esta enzima en el cáncer. Una explicación del papel de la Na^+/K^+ ATPasa en señalización de vías celulares complejas son diversas, muchas de las cuales son de vital importancia en la proliferación de células malignas.

Se ha demostrado que la unión de glicósidos cardiotónicos como la ouabaina a la Na^+/K^+ ATPasa desencadena una compleja cascada de señalización que se inicia mediante la interacción con proteínas vecinas de la membrana y las cuales organizan la cascada de señalización citosólica molecular. Estos complejos de señalización intracelular evitan enviar mensajes a orgánulos a través de la activación de la proteína tirosina quinasa (Src), lo cual genera transactivación o inhibición del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La activación de estas vías celulares también están vinculadas con la translocación de la Na^+/K^+ ATPasa, a través de la endocitosis, al núcleo de la célula.

Nuevas investigaciones sobre esta enzima, incluida su papel en la regulación de la proliferación celular y la inhibición a través de glicósidos cardiotónicos, está claramente justificada (1).

El estudio de los diversos mecanismos que participan específicamente en el control de la proliferación de células malignas mediada por glicósidos cardiotónicos, esencialmente, sugiere que el tumor se vuelve un objetivo más sensible que el tejido normal en la terapia clínica.

La unión de glicósidos cardiotónicos tales como oleandrina, bufalina y digitoxina por ejemplo por acoplamiento con la bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ se traduce en cambios complejos, los cuales documentan la señalización celular en una serie de eventos.

Se genera el complejo “Señalosoma” o complejo de señalización el cual incluye macromoléculas como la enzima, $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$, así también la proteína Src, fosfoinosítol-3-quinasa (PI3K), y fosfolipasa C, cada uno de los cuales, a su vez, se pone en acción una compleja cadena de eventos de señalización que puede ocasionar la muerte de células tumorales ya sea a través de la apoptosis o la autofagia que son los mecanismos relacionados.

La administración de glicósidos cardiotónicos en un tratamiento clínico del cáncer puede generar las siguientes respuestas fisiológicas:

- a) Aumentar la superficie de la célula tumoral y se refleja en la expresión de receptores de muerte celular DR4 y DR5.
- b) Aumento en la actividad de la enzima caspasa; esto se traduce en el aumento de las concentraciones de calcio intracelular.
- c) El incremento de Ca^{2+} por su parte, reduce la expresión de factores de transcripción como el activador de proteína-1 (AP-1).

- d) Inhiben la activación (es decir, bloquea la fosforilación) de Akt, que normalmente bloquea la apoptosis.
- e) Inhiben la activación del factor de transcripción del factor nuclear-kappa β (NF-k β) (25).
- f) Activan la vía de Ras, que conlleva al aumento de la actividad de la vía Raf-MAPK.
- g) Activación y aumento de Src.
- h) Inhiben el factor de necrosis tumoral (TNF) mediada por la activación de NF-k β por inhibición de la unión del receptor de factor de necrosis tumoral 1-proteína asociada a la muerte de dominio (TRADD) a la membrana celular o muerte programada.
- i) Inhiben el transporte extracelular de los factores de crecimiento tumoral, como factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2).
- j) La inhibición de fibroblastos de la membrana afecta la fluidez que a su vez, pueden inhibir Fas relacionados con la señalización.
- k) Conducen a la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) con las consiguientes lesiones a las mitocondrias.
- l) Producen una disminución del potencial de membrana mitocondrial y una disminución en la cantidad de proteínas anti-apoptóticas Bcl-XL y Bcl-2 y topoisomerasas I y II.
- m) Provocan condensación mitocondrial y la pérdida de la función, que, a su vez, puede conducir a procesos autofágicos y a la muerte celular (1).

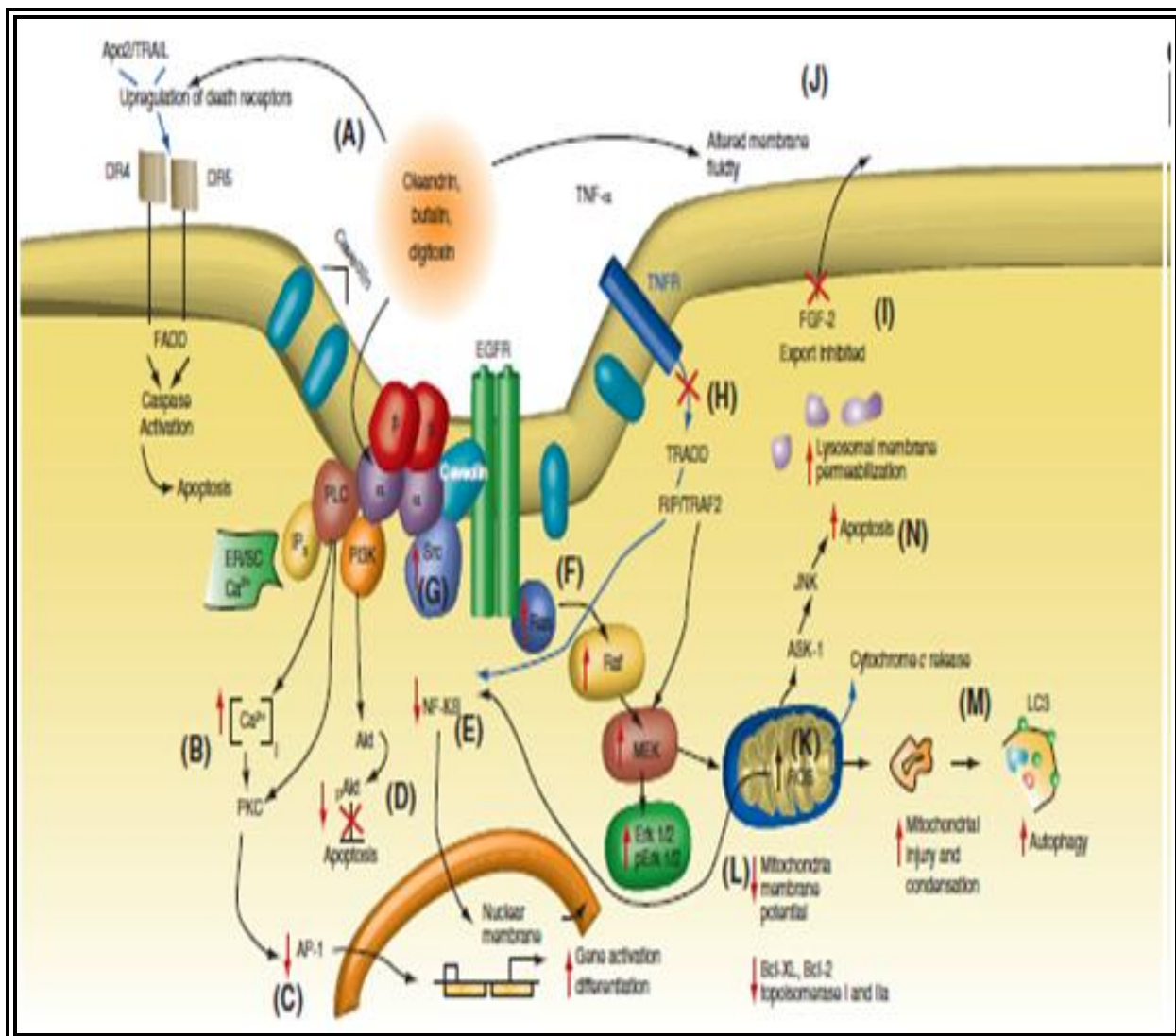


Figura N° 11. Mecanismos de acción de glicósidos cardiotónicos en células cancerígenas (1).

3.4 LINEAS CELULARES CARCINOGENICAS A ESTUDIAR.

3.4.1 CANCER O CARCINOMA DE MAMA.

En muchos países el cáncer de mama es un grave problema sanitario, cuya importancia se ha acrecentado en los últimos años. Las investigaciones realizadas por diferentes centros científicos de las más grandes potencias mundiales, propenden a precisar la magnitud del problema del cáncer de mama en un gran porcentaje de los países en el mundo; a señalar los factores que se consideran de riesgo y a plantear una serie de hipótesis con relación al origen y al mecanismo de producción de esta neoplasia.

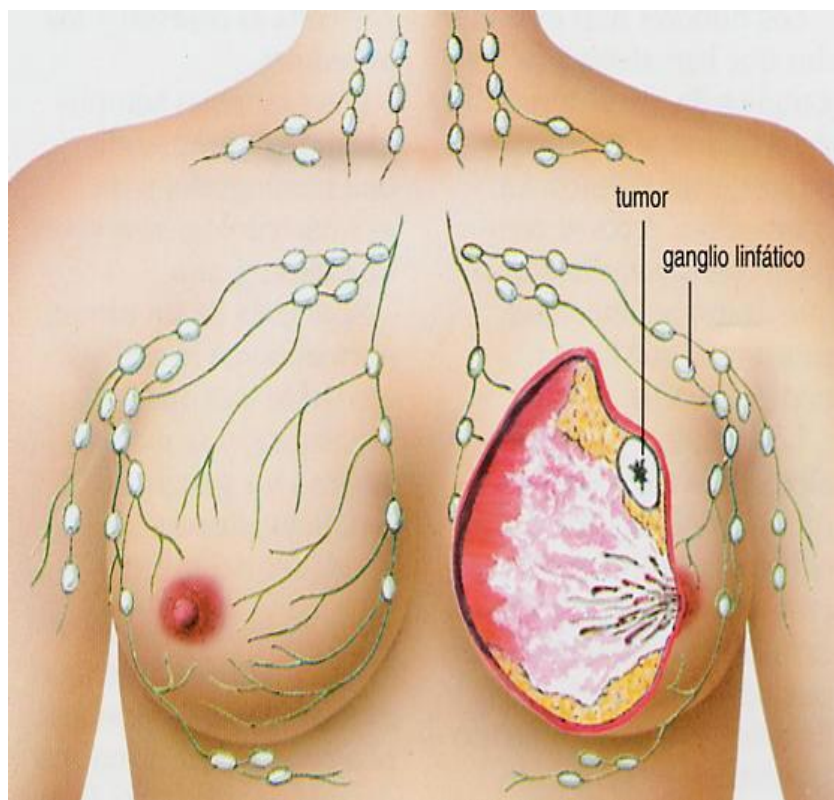


FIGURA N° 12. Área anatómica donde se generan los carcinomas de mama. Se ven localizados los vasos linfáticos (11).

De acuerdo a la información epidemiológica publicada, se ha notado un aumento importante en la incidencia del cáncer de mama, constituyéndose en el cáncer más frecuente en la mujer después de los cánceres de piel. Concomitantemente ha habido un aumento en la mortalidad por cáncer de mama, manteniéndose las dos curvas, morbilidad y mortalidad, paralelas y ascendentes

La tendencia de la mortalidad, francamente ascendente y la incidencia que prácticamente duplica la de pulmón en hombres, hablan de la magnitud de su importancia. La prevalencia de este cáncer en forma asintomática en la mujer poco habituada al autoexamen mamario, también ha de ser alta y justifica, a nuestro entender, la realización de campañas de educación y de detección precoz de esta localización tumoral (11, 21).

Es considerado una enfermedad sistémica por la capacidad de metastizar, existe proliferación anormal, desordenada de las células del epitelio glandular mamario (conductos, lobulillos) y en menor frecuencia del estroma. Según la epidemiología de esta patología; el 60 % se ha atribuido a factores como edad, reproductivos, antecedentes personales y familiares, y 40 % no se han determinado las causas (21).

Es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres, en varones es menos de 1 % de los casos totales, representa el 32 % del total de los cánceres en las mujeres, el riesgo de padecer cáncer de mama es de 8 -12 % y el de morir es de 3.6-4%, 10% a 15 % pueden ser neoplasias familiares, de los cuales 30 % son atribuibles a mutaciones en genes denominados BRCA1 y BRCA 2, cuando se detectan mutaciones en estos genes el riesgo de desarrollar cáncer es de 56 a 85 %, también aumenta riesgo de cáncer de ovario.

La etiopatogenia del carcinoma de mama detalla dos tipos de cánceres (7): tumores epiteliales con el 90% de los casos (cáncer o carcinoma: carcinoma lobulillar 10%, carcinoma ductal 90 %) y tumores no epiteliales con el 10% restante (del estroma de soporte, angiosarcoma, sarcomas primarios, tumor filoides, linfoma raro).

Los factores de riesgo del carcinoma de mama se engloban según algunos autores en dos grupos: los factores preponderantes (existencia de cáncer de mama en la familia, poblaciones migratorias, nutrición y niveles socioeconómicos, etc.) y otros factores o ajenos (fecundidad y lactancia, ciclo menstrual (edad de la menarquía, edad de la menopausia natural, caracteres del ciclo, duración de la actividad menstrual, ooforectomía), enfermedades previas de la mama, edad, riesgo de bilateralidad, factores hormonales, radiaciones, edad , etc (11).

El MINSAL (anteriormente MSPAS) reporta 4 tipos de diagnósticos de procesos tumorales de este tipo como los son: el tumor maligno del pezón y aréola mamaria, tumor maligno de la porción central de la mama, tumor maligno de la prolongación axilar de la mama y tumor maligno de mama en parte no especificada, siendo esta última en el año 2006 la de mayor incidencia siendo la población femenina la más afectada con 14 decesos de 15 casos, obteniendo así una tasa de mortalidad de 0.39 y una tasa de letalidad del 2.33. En el 2007 estas tasas subieron a 0.64 y 4.77 respectivamente obedeciendo a un aumento en las muertes de pacientes con tumor maligno de mama en parte no especificada, cerrando el año con 23 decesos de 482 casos y se atendieron 3,799 mujeres con cuadros clínicos sospechosos. En el 2008 se reportaron 20 muertes, para el 2009 se reportó un leve descenso con 14 defunciones registradas y para el 2010 según datos recopilados hasta el 30 de mayo del presente año se contaban 8 muertes a nivel nacional (29).

Cuadro N° 1. Factores de riesgo que elevan las probabilidades de desarrollar carcinoma de mama.

* Edad a mayor edad mayor riesgo, edad media de aparición 54 años, 45 % aparecen después de los 65 años.	* Antecedente familiar de cáncer de mama: De primer grado, aumenta el riesgo de 2 o 4 veces, si 2 familiares tienen cáncer de mama aumenta a 5-6 veces. El 60% de los cánceres mamarios familiares ocurre antes de la Menopausia contra un 25% de los no familiares.
* Cáncer de mama previo , aumenta el riesgo de cáncer de mama contralateral en 0.5 a 1 % año de seguimiento.	
* Menarquia temprana antes de los 12 años o tardía después de los 15 años.	
* Nuliparidad aumenta el riesgo después de los 50 años, o un menor número de embarazos.	
* Primera gestación tardía , después de los 30-35 años aumenta 5 veces el riesgo.	
* Cambios fibroquísticos aumentan ligeramente el riesgo	
* Aborto inducido	
* Lesiones benignas fibroadenoma complejo, hiperplasia moderada florida (con atipia o sin atipia, adenosis esclerosante y papiloma.	
* Hiperplasia ductal o lobulillar atípica aumenta en riesgo a 4 a 5 veces y 10 veces si hay antecedente familiar de cáncer (de primer grado)	
* Ser portador del gen BRCA1o BRCA2: 5 % de las mujeres con cáncer de mama confiere susceptibilidad al cáncer mamario a edades tempranas, bilateralidad y cáncer de ovario (frecuente BRCA1). Si un familiar de una mujer es portador del gen, tiene riesgo de presentar cáncer de mama del 50 a 85 % casi siempre desarrollan cáncer antes de los 65 años, genes mas frecuentes en judíos askenazis. 5% de todas las mujeres con cáncer de Mama pueden tener mutaciones. Genes Conjuntamente con el síndrome Li-meni (mutación del p53), estas aberraciones genéticas determinarían aproximadamente el 5% de todos los casos de cáncer de mama, Recientemente se ha encontrado que un gen llamado BARD1, cuando está combinado con el gen BRCA2 incrementa el riesgo de cáncer hasta en un 80%.	
* Antecedente de carcinoma de endometrio	* Uso de anticonceptivos orales
* Hormonas ováricas endógenas	* Terapia hormonal con estrógenos y/o progesterona después de la menopausia por 3 años aumenta ligeramente el riesgo , el uso prolongado aumenta el riesgo 7-8 casos por cada 10.000 mujeres por cada año de uso
* Dieta rica en grasas y déficit de vitamina A.	
* Ingesta de alcohol dos unidades de alcohol /día tiene un riesgo 8% mayor de cáncer de mama que una unidad de alcohol/ día. Mayor alcohol , mayor riesgo	* Exposición a radioterapia antes de los 30 años.
	* Obesidad se asocia con mayor riesgo de cáncer de mama, endometrio , ovario y vejiga (obesidad posmenopáusica)
	* Ingesta de tabaco
	* Dieta occidental
	* Vida sedentaria

3.4.2 CÁNCER CERVICOUTERINO.

Los tumores en el cérvix pueden ser *benignos* o *malignos*. Los tumores benignos no son cancerosos. No son tan dañinos como los tumores malignos (cancerosos).

Los tumores benignos (*pólipos, quistes o verrugas genitales*) rara vez son una amenaza para la vida y no invaden los tejidos de su derredor. Los tumores malignos (cáncer cervical) algunas veces pueden poner la vida en peligro, pueden invadir los tejidos y órganos cercanos, así también pueden diseminarse a otras partes del cuerpo. El cáncer de cérvix empieza en las células de la superficie del cérvix o cuello uterino. Con el tiempo, el cáncer cervical puede invadir más profundamente dentro del cérvix y los tejidos cercanos (25).

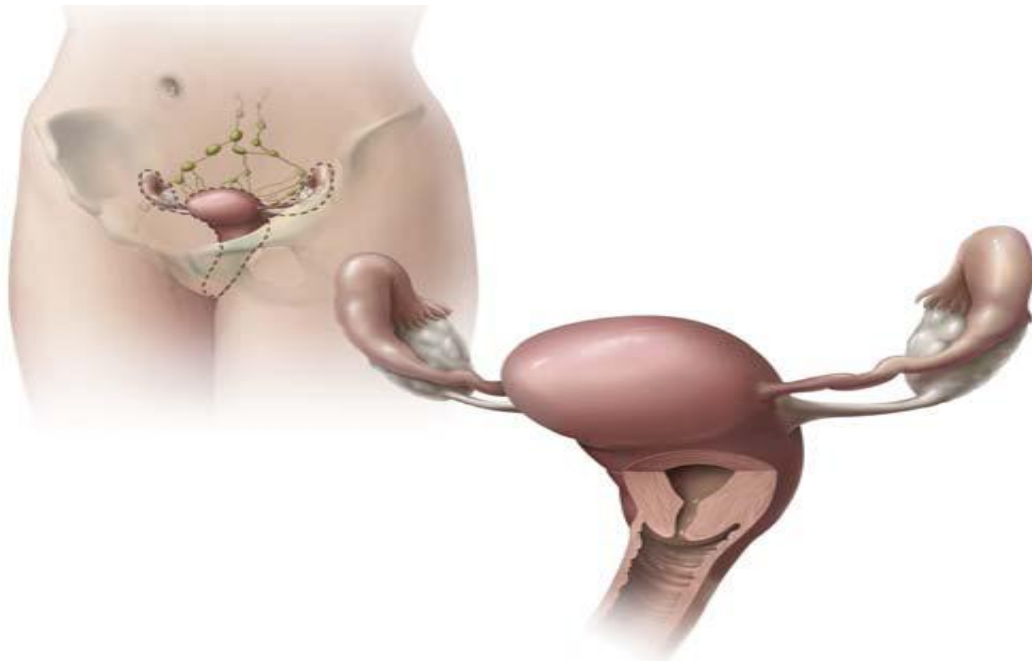


FIGURA N° 13. Estructuras anatómicas donde se desarrolla el carcinoma Cervicouterino (25).

Las células cancerosas pueden diseminarse al desprenderse del tumor original (primario). Entran en los vasos sanguíneos o en los vasos linfáticos, los cuales se ramifican en todos los tejidos del cuerpo. Las células cancerosas pueden adherirse a otros tejidos y crecer para formar nuevos tumores que pueden dañar esos tejidos.

La incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino se relacionan con la pobreza, el acceso limitado a los servicios, la vida en zonas rurales y los bajos niveles de educación (11,16). Las variaciones en la incidencia y la mortalidad del cáncer cervicouterino pueden relacionarse con diferencias en el acceso a los servicios y en la calidad de los mismos. Otros factores que influyen en ellas pueden ser la ubicación geográfica, la situación socioeconómica y la educación, así como aspectos culturales y psicosociales.

Los médicos no siempre pueden explicar por qué el cáncer de cérvix se presenta en una mujer, pero no en otra. Sin embargo, sí sabemos que la mujer que tiene ciertos *factores de riesgo* puede tener más posibilidad que otras mujeres de padecer cáncer de cérvix. Un factor de riesgo es algo que puede aumentar la posibilidad de que una enfermedad se presente. Los estudios han encontrado varios factores que pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer de cérvix. Por ejemplo, la *infección* con el *virus del papiloma humano (VPH)* es la causa principal del cáncer cervical (20,6). La infección del VPH y otros factores de riesgo pueden actuar en conjunto para aumentar aún más el riesgo:

- **Infección de VPH.** Los VPH son un grupo de virus que pueden infectar el cérvix. Una infección de VPH que no se cura puede causar cáncer de cérvix en algunas mujeres. El VPH es la causa de casi todos los cánceres cervicales. Las infecciones por VPH son muy comunes (21). Estos virus se pasan de una persona a otra por contacto sexual.

La mayoría de los adultos han sido infectados con VPH en algún momento de su vida, aunque la mayoría de las infecciones desaparecen por sí solas. Algunos tipos de VPH pueden producir cambios en las células del cérvix. Si dichos cambios se detectan temprano, se puede prevenir el cáncer cervical al extraer o destruir las células alteradas antes de que puedan convertirse en células cancerosas. Una vacuna para las mujeres de 9 a 26 años las protege contra dos tipos de infección por VPH que causan cáncer de cérvix.

- **Irregularidad en hacerse pruebas de Papanicolaou.** El cáncer cervical es más común entre las mujeres que no se hacen pruebas regulares de Papanicolaou. La prueba de Papanicolaou ayuda a que los médicos encuentren células alteradas. Al eliminar o destruir estas células anormales se impide generalmente el cáncer cervical.

- **Tabaquismo.** En las mujeres que están infectadas con VPH, el fumar aumenta levemente el riesgo de padecer cáncer de cérvix (20, 6).

- **Sistema inmunitario debilitado.** La infección con VIH o el tomar medicamentos que inhiben el sistema inmunitario aumentan el riesgo de padecer cáncer cervical.

- **Antecedentes sexuales.** Las mujeres que han tenido muchas parejas sexuales tienen un riesgo mayor de padecer cáncer cervical. También, una mujer que ha tenido relaciones sexuales con un hombre que ha tenido muchas parejas sexuales puede tener un riesgo mayor de padecer cáncer de cérvix. En ambos casos, el riesgo de padecer cáncer cervical es mayor porque estas mujeres tienen un riesgo más elevado de infección por VPH (21).

- **Uso de píldoras anticonceptivas durante mucho tiempo.** El uso de píldoras anticonceptivas durante mucho tiempo (5 años o más) puede elevar ligeramente el riesgo de cáncer cervical en mujeres con infección de VPH. Sin embargo, el riesgo disminuye rápidamente cuando la mujer deja de usar dichas píldoras.

- **Tener muchos hijos:** Los estudios sugieren que tener muchos hijos (5 o más) puede elevar ligeramente el riesgo de padecer cáncer cervical en mujeres con infección por VPH.

- **DES (*diethylstilbestrol*):** El DES puede incrementar el riesgo de un tipo raro de cáncer cervical en mujeres que estuvieron expuestas a este fármaco antes de nacer. El DES ya no se suministra a mujeres embarazadas (21).



Figura N° 14. Diagrama de partes anatómicas internas y externas afectadas por tejido canceroso cervico uterino. Vista del cuello uterino visto a través de un espéculo (6).

El tener una infección de VPH u otro factor de riesgo no significa que la mujer va a padecer cáncer de cérvix. La mayoría de las mujeres que tienen factores de riesgo de cáncer cervical nunca llegan a presentar dicho cáncer. Los cánceres cervicales en etapas iniciales generalmente no causan síntomas.

Cuando el cáncer se agranda, las mujeres pueden notar uno o varios de estos síntomas: sangrado vaginal anormal (sangrado que ocurre entre los períodos menstruales regulares, sangrado después de tener relaciones sexuales, sangrado en un lavado vaginal o del examen pélvico, períodos menstruales más prolongados y más abundantes que antes, sangrado después de la menopausia, etc.), mayor secreción vaginal, dolor pélvico, dolor durante las relaciones sexuales, entre otros (21,35).

En El Salvador los diagnósticos son en especial a cinco tipos de cánceres relacionados: tumor maligno del endocervix, tumor maligno del exocervix, lesión de sitios contiguos del cuello del útero, tumor maligno del cuello del útero y el tumor maligno del cuerpo del útero. La población mayormente afectada son las mujeres entre 20 y 59 años, teniendo también alta incidencia las mayores de 60 años. El MINSAL detalla 26 casos de muertes en el año 2001, 35 muertes en el 2002, 26 decesos en el 2003, para el 2004 aumento el número a 37 muertes y para el 2005 se alcanzó la alarmante cifra de 74 decesos siendo en su mayoría el tumor maligno del cuello uterino la causa de muerte. En el 2006 según la lista internacional de mortalidad por sexo de la Unidad de Información de la Dirección de Planificación del Ministerio de Salud Pública, a nivel nacional se atendieron 744 consultas de las cuales se tuvieron 52 decesos y 692 egresos obteniéndose así una Tasa de Letalidad de 7.51 y una Tasa de Mortalidad de 1.46 por el mismo tipo de tumor. En el 2007 se reportaron 53 muertes en todo el país, en el 2008 y 2009 se produjeron 47 y 51 decesos respectivamente. En el presente año 2010 según datos recopilados hasta el 31 de mayo se contaban 94 muertes causadas por el carcinoma in situ del cuello del útero (29).

3.4.3 CÁNCER PULMONAR.

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en los países occidentales. El factor etiológico responsable de la mayor parte de los casos es el tabaco (5, 33, 25).

Durante este curso, además del efecto de los carcinógenos del tabaco se tratará de los genes alterados en los tumores pulmonares así como de otras anomalías moleculares que tienen lugar durante el desarrollo de este tipo de cáncer (31). El pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón depende claramente del estadio tumoral en que se diagnostica la enfermedad (2). Varios estudios han demostrado que es posible detectar alteraciones genéticas y moleculares en lavados broncoalveolares de pacientes con cáncer de pulmón y se están llevando a cabo trabajos prospectivos que determinarán su posible uso en el diagnóstico precoz de este tipo de cáncer.

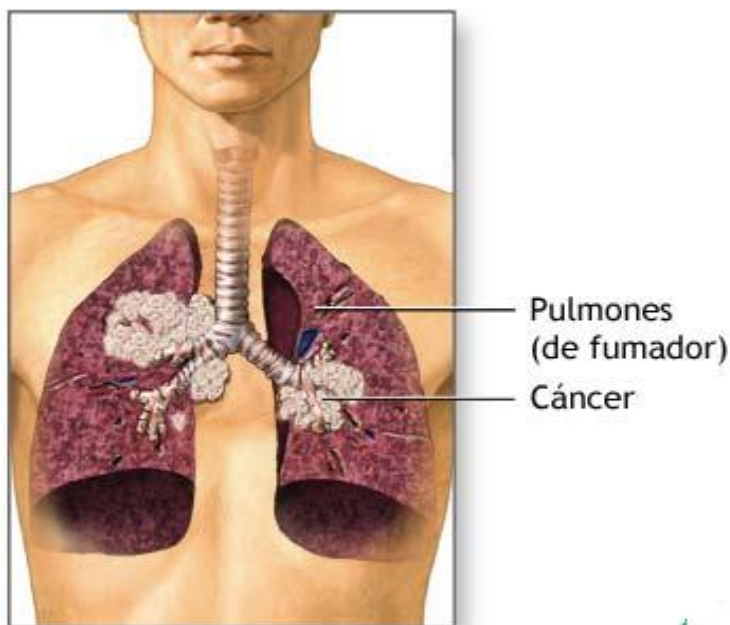


FIGURA N° 15. Representación de pulmones de un hombre fumador con cáncer diseminado a nivel bronquial y lobular.

Otras investigaciones revelan factores moleculares relacionados con la respuesta a la terapia, los patrones de toxicidad y el pronóstico del enfermo de cáncer de pulmón. El término cáncer de pulmón es utilizado para tumores que se desarrollan a partir del epitelio respiratorio (bronquios, bronquiolos y alveolos). El carcinoma de pulmón (CAP) tiene una relación directa con la edad del individuo, se nota un marcado aumento a partir de los 45 años y su pico máximo se presenta en personas mayores de 70 años (5, 21, 33).

Los tipos histológicos que más prevalecen en el caso de los carcinomas pulmonares son: carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grande, carcinoma adenoescamoso, tumor carcinoide, carcinoma del tipo de glándulas salivares y el carcinoma no especificado o inclasificable.

En cuanto a la etiopatogenia se dice que existen múltiples causas documentadas como etiología del CAP. Entre ellas hidrocarburos aromáticos, nitrosamidas, polonio, arsénico, asbesto, clorometiléter, y otros. De estas causas, la principal es el tabaquismo, el cual se presenta reportado en el 87 % de los casos (5,21).

Se han identificado más de 4,800 agentes químicos en el humo del cigarro, de los cuales alrededor de 60 son carcinogénicos. De estos, los encontrados con mayor frecuencia son aldehídos y otros compuestos orgánicos volátiles como el benceno y el butadieno, que tienen concentraciones de 10-100 mg por cigarrillo.

Sin embargo los mayores causantes del cáncer son los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno, las N-nitrosaminas en especial las específicas.

La fase gaseosa contiene moléculas potencialmente carcinogénicas como óxidos de nitrógeno, isopreno, butadieno, benceno, estireno, formaldehído, acetaldehído, acroleína y furano, mientras que la fase de partículas cuenta con carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), nitrosaminas, aminas aromáticas y metales (cromo, níquel, cadmio) (5, 21, 31). Si bien el efecto individual de los carcinógenos del tabaco es difícil de estudiar a nivel molecular ya que estamos tratando un problema de exposición crónica a una mezcla compleja de moléculas carcinogénicas y/o procarcinogénicas, numerosas evidencias experimentales han demostrado la implicación del tabaco en todos los pasos de la carcinogénesis (33).



FIGURA N° 16. Sustancias que contiene regularmente un cigarrillo. Encerrados en un círculo con la letra C azul se representan los compuestos carcinogénicos.

Los compuestos carcinogénicos del tabaco se absorben y son metabolizados en los individuos fumadores, y muchos de estos compuestos reaccionan con el DNA provocando mutaciones, hechos comprobados experimentalmente utilizando diferentes fracciones de condensados de humo de cigarrillos aplicados sobre animales de laboratorio, y también en experimentos de inhalación, donde se inducen alteraciones en el DNA, así como lesiones preneoplásicas (5).

En el humo del tabaco hay importantes cantidades de radicales libres que se generan en la combustión, derivados del nitrógeno, como el óxido nítrico, o derivados del oxígeno, como el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno.

Estas especies altamente reactivas son capaces de oxidar, y por tanto dañar, todo tipo de macromoléculas, entre ellas el DNA. Además, al entrar en contacto el humo del tabaco con los alveolos pulmonares se van a activar los macrófagos alveolares, los cuales liberarán más radicales libres que contribuyen a la inflamación.

La inflamación crónica se considera hoy en día como una situación potencialmente carcinogénica precisamente por la genotoxicidad de las especies oxidantes y también porque induce la activación de rutas moleculares que fomentan la transformación tumoral.

Otros compuestos carcinogénicos son el etilcarbamato, óxido de etileno, níquel, cromo, cadmio, hidrazina, formaldehído, acetaldehído entre otros (5,33). El número total de variantes de cáncer pulmonar es de 46, si bien las que corresponden a más del 95% son siempre de tipo epitelial (carcinomas).

Teniendo en cuenta que el procedimiento diagnóstico y la actitud terapéutica inicial del carcinoma de pulmón distingue solo dos tipos, frecuentemente se habla únicamente de ellos: carcinoma de células pequeñas (microcítico) y carcinoma de células no-pequeñas (no microcítico). La utilización de técnicas inmunohistoquímicas para diagnóstico tumoral ha permitido conocer con más detalle los rasgos de las células del carcinoma (5).

Según datos de la Dirección de Vigilancia Sanitaria, Unidad de Estadística e Información en Salud del MINSAL, en El Salvador el tumor maligno de bronquios y/o pulmón es el más común dejando en segundo lugar al tumor maligno de la laringe (29).

El MINSAL detalla que estos cánceres junto a otros como el tumor maligno del seno maxilar, tumor maligno de la fosa nasal, tumor maligno de la glotis, tumor maligno del seno paranasal, tumor maligno de la región supraglótica y el tumor maligno del cartílago laríngeo cobraron 564 vidas en el año 2000, para el 2001 esta cifra aumentó a 926 muertes. La tendencia al incremento de muertes no varió para los siguientes 2 años ya que para el 2002 y 2003 se registraron 1154 y 1403 decesos respectivamente. En el 2004 fueron 932 víctimas y en el 2005 fallecieron 1173 personas más.

Curiosamente la tendencia al alza en el número de víctimas mortales siempre se conservó en los primeros cinco años de esta última década ya que en el 2004 se trabajó con el 81.3 % de la población correspondiente a 5, 493,773 habitantes, mientras los demás años se trabajó en la base de datos con el 80 % de la población total (29).

En el año 2006 el tumor maligno de pulmón mato a 24 hombres y 16 mujeres, este mismo cáncer liquido en el 2007 a 21 hombres y 17 mujeres, en el 2008 fallecieron 27 hombres y 18 mujeres, en el 2009 las cifras siguieron aumentando y para el 2010 ya se registran 24 victimas entre ambos sexos (29).

Estas técnicas han permitido el estudio de diferentes filamentos intermedios y la localización de proteínas estructurales que han dado como resultado una diversidad de respuesta ante la aplicación de anticuerpos como citoqueratinas.

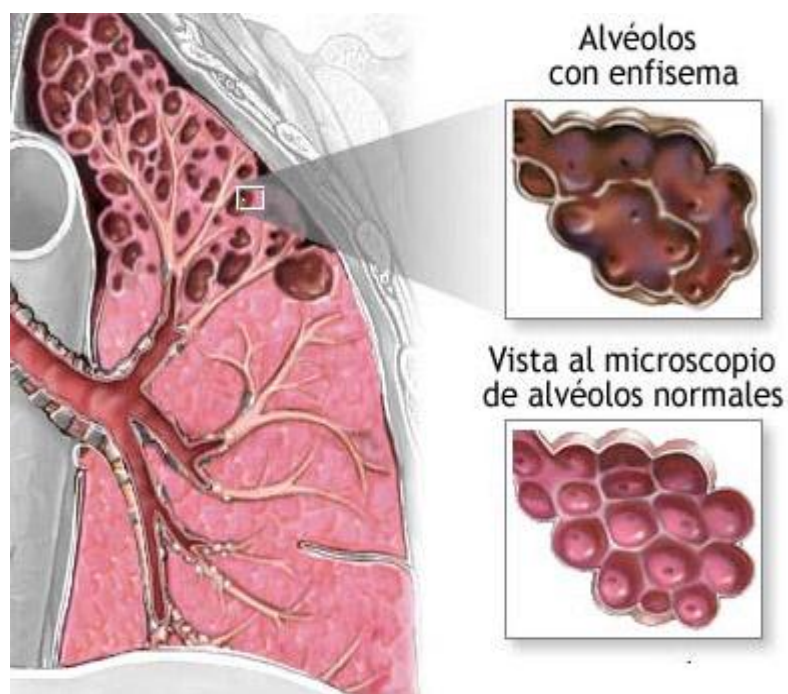


FIGURA N° 17. Comparación con vista al microscopio de alveolos pulmonares con enfisema y alveolos normales.

3.5 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES A ESTUDIAR.

3.5.1 Generalidades de *Thevetia ahouia*.

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

Nombre científico: *Thevetia ahouia*.

Sinónimos: *Cerbera ahouai* L, *Plumeriopsis ahouai* (L.), *Cerbera nitida*, *Thevetia nítida*.

Familia: Apocynaceae.

Referencias de herbario (Jardín Botánico La Laguna): ES-1030.

Descripción botánica:

Árbol: arbustos o pequeños, mayormente 1–2 m de alto, ocasionalmente hasta 10 m de alto, con látex blanco.

Hojas: simples, alternas de 13-23 cm de largo y de 5-7 cm de ancho, oblongo-lanceoladas, el ápice obtuso o redondeado y base aguda, brillante en la haz, con nervios secundarios poco visibles; pecíolos cortos, de menos de 1 cm, con glándulas papilosas en el punto de inserción con la ramita.

Flores: inflorescencias cimosas de pocas flores cremas a amarillo pálidas; sépalos libres, ovados, 5–7 mm de largo; corola angostamente infundibuliforme, tubo 2–3.5 cm de largo, los lobos 0.5–1 cm de largo; anteras no completamente aglutinadas a la cabeza del estilo; ovario apocárpico.

Frutos: sincápicos, abayados, transversalmente oblongos, 2–3.5 cm de largo y 3–4 cm de ancho, con 2–4 semillas grandes, exocarpo rojo, mesocarpo blanco y carnosos (4).

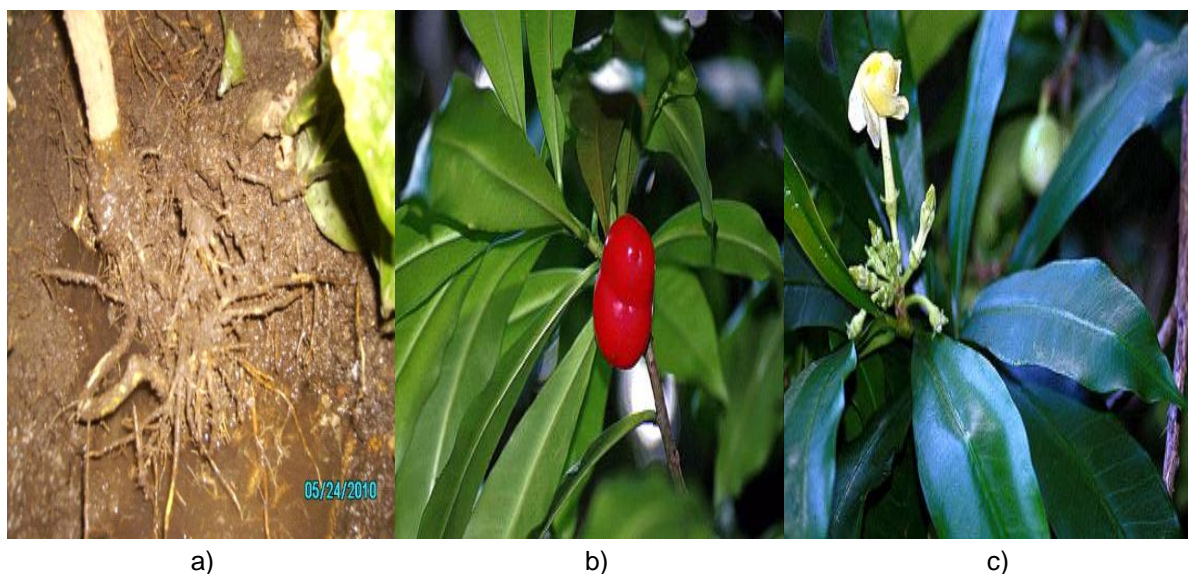


Figura N°18. *Thevetia ahouia*. a) Detalle de raíz. b) Detalle del fruto y c) Detalle de las flores.

Fenología: observado con hojas de abril a febrero, con flores de marzo a octubre y con frutos de abril a enero.

Hábitat: bosques muy húmedos, en elevaciones de 250-400 m s.m.

Localización: localmente común en bosques siempre verdes y áreas abiertas, zona atlántica.

Distribución: de México a Honduras. En El Salvador se distribuye en: Ahuachapán: Hda. San Benito, P.N. El Imposible, Barra de Santiago, Monte Hermoso, San Francisco Menéndez y El Refugio. San Salvador: Soyapango y San Martín. Chalatenango y La Libertad.

Usos etnobotánicos: presentan cierta actividad antiinflamatoria y antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y el látex de la raíz es eficaz contra mordeduras de serpientes (11,4).

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-D-O-acetil- α -L-thevetopiranosido, Evomonosido, neriifolina, 2'-acetil-neriifolina y 3'-O-metilevomonosido (15, 16, 17).

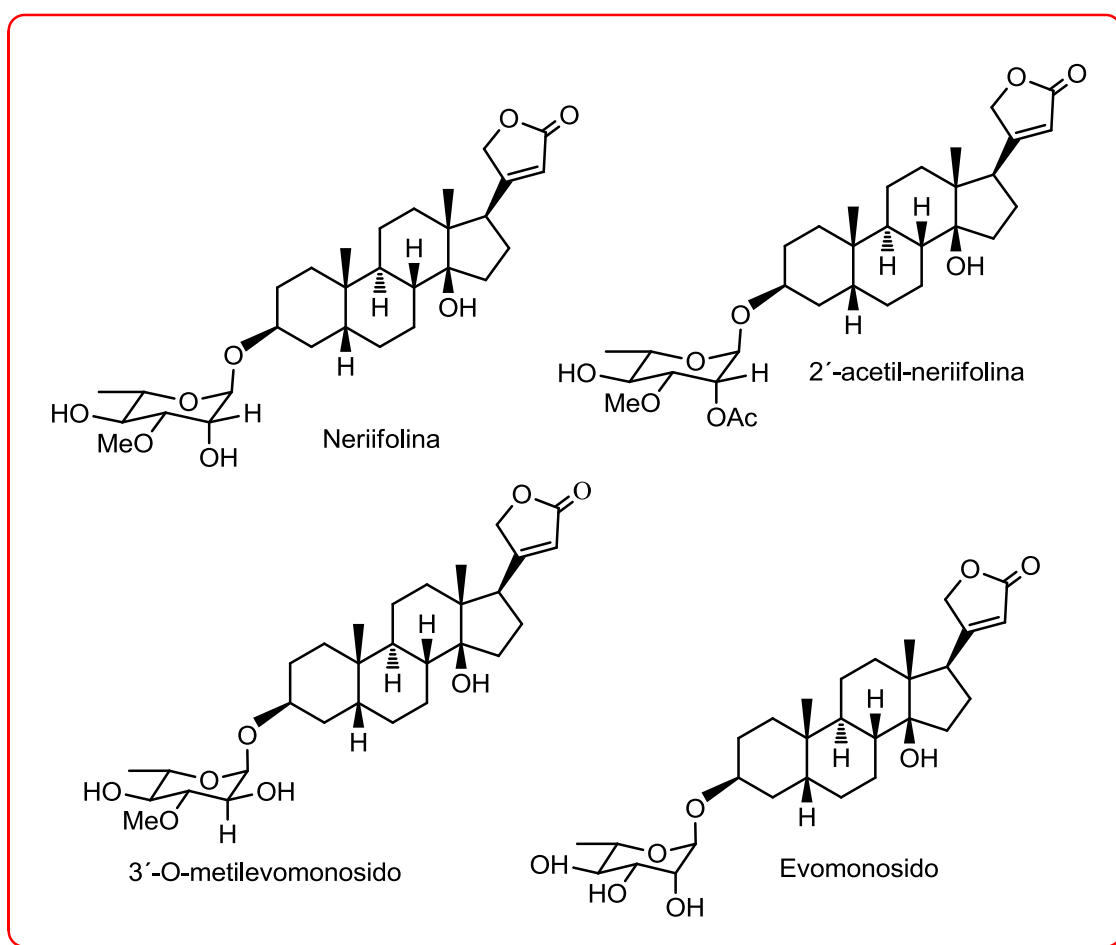


Figura N°19. Algunos glicósidos cardiotónicos aislados de *Thevetia ahouia* (16).

3.5.2 Generalidades de *Plumeria rubra*.

Nombre común: flor blanca, flor de ensarta, flor de la cruz, flor de mayo, flor de señora (El Salvador), cacalosuchil (México, Guatemala); flor de la cruz (Guatemala); flor de pan, flor de toro, sacuajoche (Nicaragua), flor blanca, cacalojoche, torito (Costa Rica); cacarucha, palo de cruz (Panamá); frangipani (Ingles).

Sinónimos: *Plumeria acuminata* W.T. Aiton ; *Plumeria acutifolia* Poir. ; *Plumeria bicolor* Ruiz & Pav. ; *Plumeria carinata* Ruiz & Pav. ; *Plumeria incarnata* Mill. ; *Plumeria lútea* Ruiz & Pav. ; *Plumeria purpúrea* Ruiz & Pav. *Plumeria rubra* fo. *acutifolia* (Poir.) Woodson; *Plumeria rubra* var. *acutifolia* (Poir.) L.H. Bailey *Plumeria tricolor* Ruiz & Pav, *Plumeria obtusa*.

Nombre científico: *Plumeria rubra*.

Familia: Apocynaceae.

Referencias de herbario (Jardín Botánico La Laguna): JMR-293.

Descripción botánica:

a) Árbol: este árbol es de pequeño a mediano, alcanzando una altura máxima de 15 m y un diámetro de 74 cm. Tiene una copa amplia y redonda que comienza a poca altura. Las partes cortadas exudan un látex blanco abundante. La corteza es de color café grisáceo, liso y lustroso, pero se torna áspera y agrietada; internamente posee rayas blancas y amarillentas. Las ramas mas pequeñas tienen como 3 cm. de diámetro y son de color verde; tienen puntos verrugosos (lenticelas) de color café, y muchas cicatrices foliares.

b) Hojas: son simples, alternas, tienen el pecíolo de 3 a 12 cm. de largo, acanalada por arriba. La lamina es de forma oblanceolada de 12 a 50 cm. de largo y de 4 a 18 cm. de ancho, de borde liso.

El ápice es agudo o de punta corta y la base, aguda o de punta larga. El haz es verde claro a verde oscuro y el envés es verde claro a blanco.

c) Flores: son grupos florales (cimas) terminales, ramificados, tienen un pedúnculo grueso que mide generalmente de 15 a 25 cm. El cáliz de 1 a 2 cm. de largo, tiene 5 lóbulos; la corola consiste en tubo angosto de 1.5 a 2 cm. de largo y 5 lóbulos elípticos de 3 a 4 cm. de largo, color blanco con una mancha amarilla en la base de cada lóbulo; hay 5 estambres muy cortos, insertados cerca de la base del tubo e la corola; el pistilo con 2 ovarios separados y un estilo corto.

d) Frutos: de una flor generalmente se desarrolla 2 frutos (folículos) cilíndricos, de 12 a 25 cm. de largo y como de 2.3 cm. de diámetro. Su forma es semejante a una vaina, son ligeramente curvos y más angostos en los extremos, se abren por una línea y liberan muchas semillas aladas.

Fenología: observado con hojas de abril a noviembre, con flores de abril a septiembre y con frutos de septiembre a abril.

Hábitat: la “flor de mayo” es un árbol muy común, que se encuentra en sitios secos y pedregosos.

Distribución: México hasta Costa Rica. En El Salvador se distribuye en: Ahuachapán: El Imposible, San Benito; Chalatenango: La Palma; La Libertad: San Juan Opico, Cerro el Jabalí, Primavera; Santa Ana: San José Ingenio y Parque Nacional Montecristo.

Usos etnobotánicos: la corteza de la raíz es utilizado en casos de blenorragia y las flores contienen iridoides que son utilizadas como activos en jarabes pectorales (5).

Composición química: se ha reportado el aislamiento en hojas frescas y corteza del tallo, de triterpenoides: dammara-12,20(22)Z-dien-3-ona, dammara-

12,20(22)Z-dien-3 β -ol, olean-12-en-3,27-diol, 27-hidroxiolean-12-en-3-ona y doce compuestos que incluyen ocho triterpenos: dammara-3-20(S),25-triol, ácido urs-12-en-3 β -hidroxi-27-Z-feruloiloxi-28-oico, ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico, 3 β ,27-dihidroxilupan-29-ona, ácido 3 β -hidroxilupan-29-en-28-oico, ácido 3 β -hidroxiursan-12-en-28-oico, ácido 3 β -hidroxi-27-p-coumaroiloxi-olea-12-en-28-oico, iridoide: 1 α -plumierida, esteroide: 3 β -hidroxi- Δ^5 -stigmastano y un cardenólido: 3 α ,14 β -dihidroxi-17 β -card-20(22)-enolido (34).

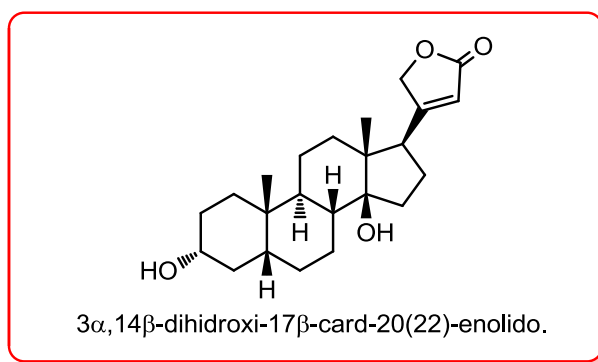


Figura N°20. Glicósido cardiotónico aislados de hojas frescas y corteza del tallo de *Plumeria rubra* (34).



Figura N°21. *Plumeria rubra*. a) Detalles de la raíz. b) Detalles del árbol y c) Detalle de flores.

3.5.3 Generalidades de *Stemmadenia donnell-smithii*.

Nombre común: Cojón, cojón de puerco (El Salvador), cojón de toro, cojón de caballo (México, Costa Rica y Guatemala), cojón de mico y cojón de burro (Honduras).

Sinónimos: *Tabernaemontana donnell-smithii*.

Nombre científico: *Stemmadenia donnell-smithii*.

Familia: Apocynaceae.

Referencias de herbario (Jardín Botánico La Laguna): ISV-623

Descripción botánica:

a) Árbol: es un árbol pequeño, siempre verde, que alcanza una altura de 10 m y un diámetro de 14 cm, se ramifica desde el medio del tallo y tiene una copa redondeada. La corteza de color gris, un poco lisa, tiene puntos verrugosos (lenticelas) conspicuos, grietas verticales superficiales y arrugas horizontales. Las ramas son delgadas de color verde a gris, tienen puntos verrugosos (lenticelas) conspicuos y generalmente se bifurcan cerca del ápice. Las cicatrices foliares rodean la rama en cada nudo.

b) Hojas: son simples, opuestas, tienen pecíolos como de 5 mm. de largo. La lamina es lampiña, de forma oblanceolada a obovada, de 5 a 21 cm. de largo y de 2.5 a 9 cm. de ancho, de borde liso. El ápice es de punta corta y la base, aguda y desigual. El haz es verde y el envés, verde claro mate. La lámina tiene puntos glandulares traslucidos y visibles al trasluz.

c) Flores: los grupos florales laterales, como de 3 cm. de largo, tiene pocas flores de color amarillo brillante, en pedicelos pelosos de 1 cm. de largo. El cáliz consiste de 5 a 9 sépalos desiguales, de 1 a 3 cm. de largo que cubre en parte; la corola en forma de trompeta, color amarillo, tiene un tubo de 3 a 4.5 cm. de

largo y 5 lóbulos extendidos y recurvados que miden de 2.5 a 4 cm. al través; hay 5 estambres sin filamento, las anteras puntiagudas insertadas en el medio del tubo de la corola; y sobre un disco, el pistilo con dos ovarios separados; y 1 estilo y dos estigmas.

d) Frutos: de cada flor se desarrolla generalmente dos frutos (folículos) oblongos, oblicuos, de 5 a 7 cm. de largo y de 4 a 5 cm. de ancho, son carnosos y contiene un látex blanco y pegajoso. Los ápices redondeados o de punta corta. Al madurarse, los frutos se tornan un color pardo y se abren por una línea en el fondo. En el interior encuentran semillas negras, oblongas, de 7 a 10 mm. de largo, envueltas en una capa carnosa (arilo) de color rojo-anaranjado.

Fenología: observado con flores de mayo a agosto y con frutos de marzo a septiembre.

Hábitat: es un árbol poco común, encontrado en sitios algo húmedos, a menudo cerca de los ríos y arroyos (4).

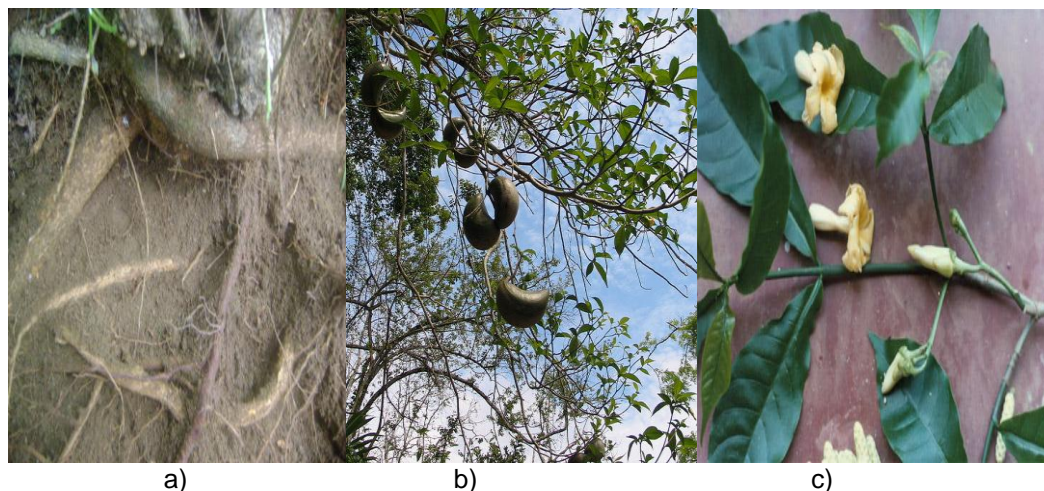


Figura N°22. ***Stemmadenia donnell-smithii***: a) Detalle de raíz, b) Detalle del fruto, y c) Detalle de las flores.

Distribución: del sur de México hasta Panamá. En El Salvador se distribuye en: Ahuachapán: San Francisco Menéndez, El Corozo; Libertad: Laderas Norte de La Laguna, Cordillera del Bálsamo, San Julián, cafetal Ajiotal, San Juan Opico y Santa Ana: Santa Lucía y Finca El Jardín.

Usos etnobotánicos: Las flores y hojas son utilizadas como emplastos para la artritis reumatoidea (4).

Composición química: Se ha reportado en la semilla el aislamiento de alcaloides indólicos: tabersonina, coronaridina, dihidrotabesonina, 2,3-dihidrotabesonol, estemadenina, tetrahidrotabesonol, voacangina, quebrachamina, isovoacangina, tabernanthina y voacamina (14, 10).

3.6 GENERALIDADES DE METODOS DE EXTRACCION, FRACCIONAMIENTO Y SEPARACION DE PRODUCTOS NATURALES

La obtención de principios activos a partir de la droga o de precursores de origen natural, se puede realizar mediante:

1. Métodos extractivos a partir de la droga.
2. Métodos hemisintéticos o semisintéticos.
3. Métodos biotecnológicos.

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 vegetal: género, especie, origen, etc.
- b) Selección de la parte vegetal a extraer: hojas, raíces, flores, semillas, etc.

- c) Inactivación de los sistemas enzimáticos del vegetal cuando se trabaja con materiales frescos (hojas y flores), es decir recién recolectados. Así se asegura su integridad evitando procesos de degradación que conlleve a la alteración de los principios.
- d) Desecación de las plantas bajo condiciones controladas para evitar la transformación química de los componentes. El proceso debe de ser rápido, con temperatura moderada y preferiblemente con aire caliente (11).

Métodos extractivos a partir de la droga.

Se parte la droga y se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos directamente a partir de la droga. Este método se basa en la distribución de una sustancia entre dos fases inmiscibles. La constante de distribución se define por la siguiente ecuación:

$$K = [C_A] / [C_B]$$

$[C_A]$ = Concentración del soluto en la fase orgánica.

$[C_B]$ = Concentración del soluto en la fase acuosa.

K = Coeficiente de reparto.

El soluto se distribuye entre las dos fases en función de su solubilidad en ambas originando un equilibrio de partición dinámico. Este equilibrio viene definido por su constante de equilibrio, constante de distribución o coeficiente de reparto K.

En los procesos de extracción empleados normalmente, una fase es agua y la otra un disolvente orgánico adecuado. Un cambio en el disolvente cambiara la solubilidad en esta fase y en consecuencia altera el coeficiente de reparto.

Para aumentar o disminuir la solubilidad de la sustancia en una fase se puede añadir distintos productos. La solubilidad de un producto en una fase puede incrementarse con la adición de un reactivo que sea capaz de formar un complejo estable y soluble en esa fase; por ejemplo, las oleofinas y poliolefinas, pueden extraerse hacia la fase acuosa con el ion plata. La solubilidad de una sustancia puede disminuirse, por la adición de sales neutras que reducen la solubilidad en esta fase; pueden emplearse distintas sales, ejemplo, el cloruro de sodio, sulfato sódico, carbonato de potasio y cloruro cálcico (28).

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 por expresión:* Usada para la extracción de principios activos contenidos tanto en sustancias vegetales como animales.

Se realiza la compresión del tejido vegetal o animal mediante exprimidores o prensas. Las prensas más corrientes, aptas para volúmenes pequeños de vegetales jugosos, consisten en un disco que es manejado por un tornillo y que exprime la fruta (una vez que ésta ha sido limpiada, pelada y convertida en pulpa) contra un recipiente perforado. Como resultado de la expresión, el jugo se separa del vegetal y es recogido en un recipiente exterior.

- *Extracción con incisiones:* Se utiliza en la extracción de principios activos de sustancias vegetales. Para ello, se realizan cortes en la superficie de la planta de la que quiere extraerse el látex.

- *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.

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

1. *Característica de la droga*:

Drogas deseadas y molidas para facilitar el máximo contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente.

2. *Naturaleza del disolvente*:

- Principalmente se utilizan extracciones en mezclas hidroalcohólicas (agua y etanol, considerados como solventes universales).
- Se puede utilizar otros solventes orgánicos como: *n*-hexano, éter etílico, éter de petróleo, metanol, propilenglicol, etc.
- Muchos metabolitos secundarios se hidrolizan en agua, además que los extractos ácidos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados.

3. *Temperatura*:

El aumento de la temperatura favorece la extracción de los metabolitos secundarios (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 (20)).

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)

Extracción discontinua.

- *Extracción simple o maceración.* Se deja el material vegetal en contacto con el solvente en un recipiente tapado y se agita periódicamente a una temperatura ambiente (15 a 20 °C), de 8 a 20 días.

Las ventajas de este método es que la muestra no entra en contacto con el calor en primer lugar y en segundo es que el extracto puede permanecer sin contaminación microbiana.

Las desventajas más significativas es que es un proceso lento, no se consigue agotamiento total de la muestra y se emplean grandes volúmenes de disolventes.

- *Digestión.* Es un método extractivo similar a la maceración pero que se trabaja con temperaturas cercanas a ebullición.

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

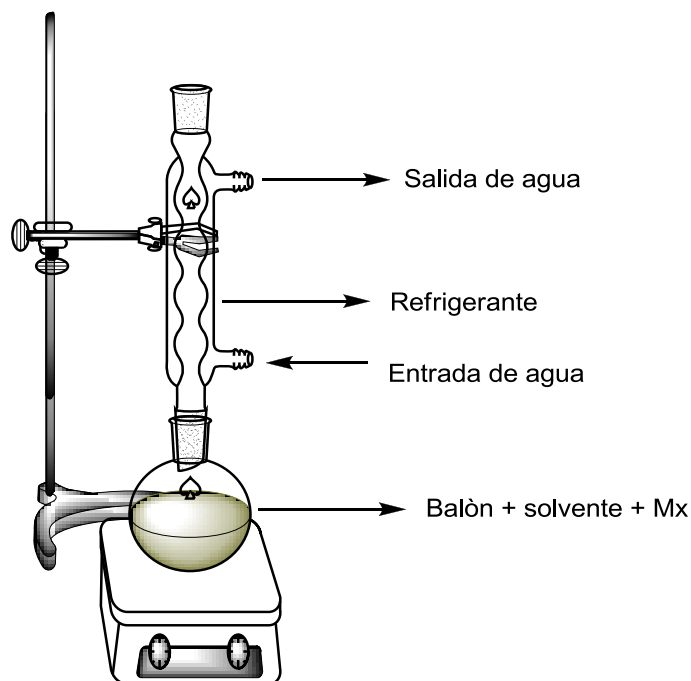


Figura N°23. Aparato de extracción por reflujo.

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

- *Decocción*. La droga se pone en contacto con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva hasta la temperatura de ebullición, manteniendo dicha ebullición durante unos 10-20 minutos, una vez enfriado, se filtra.

Se aplica generalmente a drogas duras (corteza, raíces, semillas, etc.) en las que resulta difícil el contacto entre los metabolitos secundarios y el disolvente debido a sus características histológicas.

Tanto en las infusiones como en las decocciones se utiliza como disolventes siempre el agua por lo que no resultaran métodos adecuados para extraer metabolitos secundarios activos hidrolizables.

También hay que tener en cuenta la poca estabilidad en el tiempo de los extractos acuosos, de ahí la conveniencia de preparar las infusiones y las decocciones en el momento en que se van a utilizar.

Extracción continúa:

- *Percolación*. Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. El disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal, el cual es recogido por la parte inferior del percolador.

Se puede llegar a la extracción completa de los metabolitos secundarios con el inconveniente del empleo y acumulación de grandes cantidades de disolvente.

- *Soxhlet*. Consta de tres partes: matraz o balón, cuerpo extractor y refrigerante.

Ventajas: se utilizan volúmenes de disolventes menores, extracciones exhaustivas y tiempos más cortos de extracción. Desventajas: degradación térmica, disolvente de bajo punto de ebullición (12).

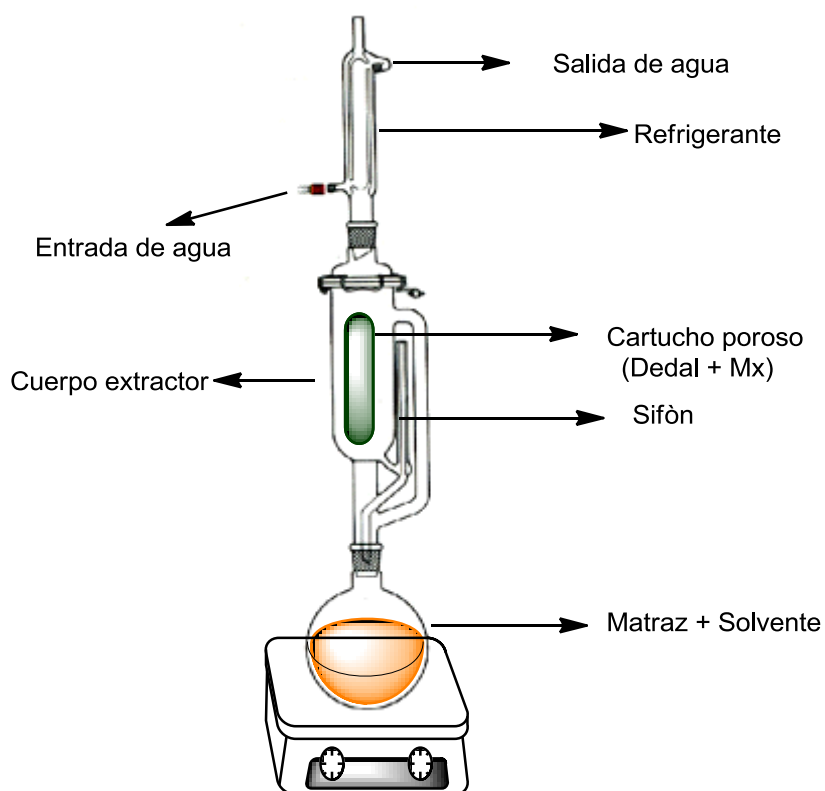


Figura N°24. Aparato de extracción continúa Soxhlet.

Extracción por Destilación.

La destilación puede definirse como la evaporación parcial de un líquido con la transferencia de estos vapores y su posterior condensación en una parte distinta del aparato de destilación. La destilación es uno de los métodos más usados en la separación y purificación de líquidos.

El éxito obtenido en el uso de las técnicas de destilación depende de varios factores. Entre estos incluye la diferencia de presión de vapor (referido a la diferencia de punto de ebullición) de los componentes presentes, de la cantidad

de la muestra, del aparato de destilación, de la posible destilación simultánea de dos componentes, formación de azeótropos y del cuidado del analista.

Puesto que el proceso de destilación se basa en el hecho de que el vapor procedente de una mezcla líquida es más rica en el componente más volátil. Una destilación simple no conducirá nunca a una separación completa de las dos sustancias volátiles.

El uso de columnas de fraccionamiento eficaces produce resultados mejores cuando se dispone suficiente cantidad de muestra. Cuando la cantidad de muestra es demasiado pequeña para efectuar la destilación, se recomienda el uso de técnicas cromatográficas (28).

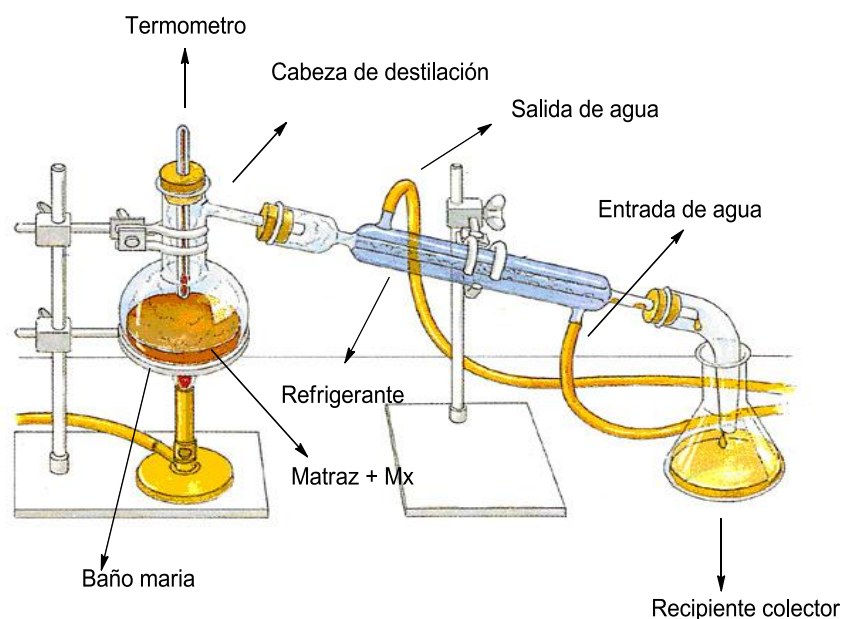


Figura N°25. Aparato de destilación simple.

3.7 GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA.

Se entiende por cromatografía al conjunto de técnicas analíticas que se fundamentan en la separación que se produce cuando una mezcla de compuestos es arrastrada por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria.

La técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos en función de su diferente afinidad entre una fase estacionaria y una móvil.

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles, una de ellas llamada fase activa o fase móvil, que transporta las sustancias que se separan, y que progresa en relación a otra fase llamada fase estacionaria (12,27).

3.7.1 Clasificación de los procesos cromatográficos.

Cromatografía de adsorción:

La fase estacionaria es un sólido sobre el que se adsorben los componentes de la muestra.

- Cromatografía Líquido – Sólido CLS (fase móvil líquido).
- Cromatografía Gas – Sólido CGS (fase móvil gas).
- Cromatografía en Capa Fina CCF (fase estacionaria sólida en forma plana y la móvil líquida).

Cromatografía de reparto:

La fase estacionaria es un líquido sostenido por un sólido inerte.

- Cromatografía Líquido – Líquido CLL (fase móvil un líquido).

- Cromatografía Gas – Líquido CGL (fase móvil un gas).
- Cromatografía en papel (fase estacionaria es una capa de agua adsorbida sobre una hoja de papel).

Cromatografía de intercambio iónico:

La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico y la separación se produce por la unión de los iones a la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión molecular:

La fase estacionaria es una estructura parecida a un tamiz y la separación se produce en función del tamaño de las moléculas. Teniendo en cuenta la forma de la fase estacionaria se clasifica en:

- Cromatografía en columna.
- Cromatografía plana (cromatografía en capa fina y en papel) (12, 27).

3.7.2 Clasificación según el mecanismo de separación.

Cromatografía de adsorción:

La cromatografía de adsorción emplea una fase estacionaria sólida de carácter polar, adsorbente y una fase móvil líquida, eluyente. Se utiliza tanto con fines como preparativos y la separación de los componentes de la mezcla viene determinada por las interacciones polares de los componentes de la misma con las fases estacionaria y móvil. Por lo tanto, los compuestos más difíciles de separar mediante este tipo de cromatografía, serán aquellos que tengan una polaridad muy similar.

Fase estacionaria o adsorbente:

Está constituida por un sólido poroso, finamente granulado, con centros activos polares en su superficie donde se adsorben las moléculas de los compuestos que se van a cromatografiar. Cuanto menor sea el tamaño de partícula de este material mayor será la capacidad de adsorción.

La adsorción se debe a interacciones intermoleculares del tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido o enlaces de hidrógeno entre el adsorbente y el soluto. El adsorbente más utilizado es gel de sílice donde las interacciones tienen lugar entre los grupos Si-OH y Si-O-Si; también se emplea con relativa frecuencia alúmina (Al_2O_3). El adsorbente debe ser inerte con las sustancias a cromatografiar. El gel de sílice presenta carácter ácido y la alúmina puede adquirirse con carácter neutro, ácido o básico.

Fase móvil o eluyente:

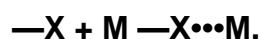
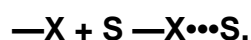
Es un disolvente en el que los componentes de la mezcla son, al menos, parcialmente solubles. Al aumentar la polaridad del disolvente aumenta la velocidad de elución de los compuestos de la mezcla.

Se puede utilizar un único disolvente o una mezcla de disolventes e incluso llevar a cabo la elución con un gradiente de polaridad aumentando progresivamente la proporción del disolvente más polar.

Retención:

Las moléculas de soluto **S** se adsorben en los centros polares de la fase estacionaria **X** y, a medida que se produce la elución, van siendo desplazadas por las moléculas de disolvente/s que constituyen la fase móvil **M** (13, 28).

La retención de un soluto se puede justificar por la competencia que se establece entre **S** y **M** por adsorberse a los centros polares **X**, es decir, depende de los valores de las constantes de los equilibrios:



Que están en función de: la polaridad del compuesto a eluir que depende de sus grupos funcionales; la naturaleza del adsorbente y la naturaleza del disolvente.

3.7.3 Orden de polaridad de los compuestos orgánicos.

Ácidos carboxílicos > fenoles > alcoholes y tioles > aminas > ésteres > aldehídos y cetonas > hidrocarburos aromáticos > hidrocarburos halogenados > éteres > hidrocarburos insaturados > alcanos.

Cuanto más polar sea un compuesto mas se retendrá en la fase estacionaria. Por ejemplo, se retiene más un alcohol que un hidrocarburo.

3.7.4 Orden de polaridad de los eluyentes más habituales.

H₂O > CH₃-OH > (CH₃)₂CH-OH > acetona > acetato de etilo > éter dietílico > CHCl₃ (cloroformo) > tolueno.

Para un mismo compuesto, un aumento en la polaridad de la fase móvil hace que se desplace con más facilidad de la fase estacionaria. Por ejemplo, se eluirá más rápidamente una amina en acetonitrilo que en hexano (12, 27). Para compuestos poco polares, que se retienen poco en el adsorbente, se utilizan eluyentes apolares o poco polares como, por ejemplo, hexano.

Para compuestos muy polares, que quedan muy retenidos en el adsorbente, se emplean eluyentes muy polares como, por ejemplo, metanol o mezclas metanoldiclorometano. Para compuestos de polaridad media se emplean eluyentes de polaridad intermedia y son muy aconsejables en estos caso las mezclas en distintas proporciones de hexanoacetato de etilo.

3.8 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

3.8.1 Fundamento.

En la cromatografía en capa fina la fase estacionaria está compuesta por una sustancia adherida a un soporte en forma de capa muy fina. El soporte empleado puede ser de vidrio, plástico o metal.

La fase estacionaria consiste en una fina capa delgada de gel de sílice o alúmina adherida a un soporte de vidrio, aluminio o materiales plásticos con un grosor que puede oscilar entre 1 hasta 0,1 – 0,2 mm.

Algunas placas vienen con indicadores fluorescentes. Para realizar la cromatografía se aplica la muestra disuelta en la parte inferior de la placa, y a 1 cm del borde de la misma, con la ayuda de un capilar. Las muestras se deben colocar entre 1-1,5 cm del extremo inferior de la placa de tal forma que al ponerla en contacto con el disolvente que se encuentra en la cubeta no cubra la muestra.

El cromatograma se introduce verticalmente en un recipiente cerrado llamado cubeta de cromatografía o tanque de desarrollo que contiene en su fondo una pequeña cantidad del eluyente que se vaya a usar (fase móvil) dejando que el disolvente ascienda por capilaridad.

La fase estacionaria contiene partículas del analito que son arrastradas con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria.

Cuando el eluyente ha ascendido hasta casi el borde superior de la placa, se saca, se seca y se observan las manchas.

Muchas veces las sustancias desarrolladas por este método, al no ser coloreadas, no son visibles. Para hacerlas visibles se utiliza luz ultravioleta entre 240-270 nm.

Para hacer visibles aquellas señales que no se detectan a la luz UV, ni son coloreadas, se procede al revelado de la placa usando un revelador destacando entre los más usuales el Yodo y el Óleum [mezcla de ácido sulfúrico (4%) ácido acético (80%) y agua (16%)]. El cromatograma una vez revelado nos presenta mediante manchas el grado de pureza de la muestra o el número de compuestos presentes en ella (13, 28).

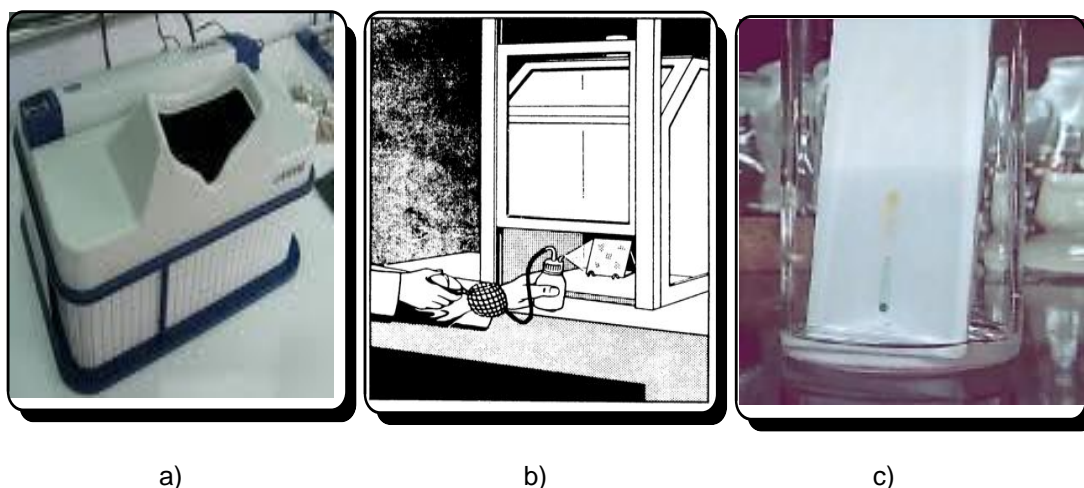


Figura N°26. (a) Cromatografía en capa fina: Cámara UV, (b) Cámara de revelado y c) cromatografía de capa fina revelada.

3.8.2 Visualización del cromatograma.

Con luz UV (ultravioleta). Las placas suelen llevar incorporado un indicador fluorescente que absorbe luz UV y emite luz visible, generalmente verde. Cuando se cromatografían sustancias que absorben en el UV donde se encuentra el compuesto no absorbe el indicador y como resultado vemos una mancha que indica su presencia.

Con un agente revelador. Se emplea cuando las sustancias no absorben radiación UV. El revelador reacciona con los productos absorbidos dando lugar a compuestos coloreados y por tanto se utilizará uno u otro en función del compuesto que se quiera visualizar.

Algunos ejemplos de reveladores: H_2SO_4 concentrado en etanol para azúcares, ninhidrina para aminoácidos y vapores de yodo para compuestos insaturados y aromáticos, reactivo de Baljet que es específicos para glicósidos cardiotónicos (presencia de lactonas insaturadas).

3.8.3 Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.

- a) Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- b) La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corrientes de aire.
- c) Limpieza de las placas: muchas placas están contaminadas con grasa.
- d) Plastificantes o adhesivos: para el trabajo a pequeña escala, éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar secar completamente antes de aplicar la muestra.
- e) Pureza de los disolventes (13).

3.9 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

3.9.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (I.R.).

Este método se basa en que los fotones de la luz infrarroja pueden hacer que grupos de átomos vibren respecto a los enlaces covalentes que los unen entre sí (32).

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.

Las regiones en infrarrojo donde más frecuentemente se encuentran los grupos funcionales característicos de los glicósidos cardiotónicos van desde 3600 a 3400 cm^{-1} para el grupo OH de C-14 y los OH de los azúcares, 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 también una absorción a 1725- 1715 hasta 1780 cm^{-1} y una banda de estiramiento de C=C de 1740 a 1780 cm^{-1} , correspondiente a la lactona α , β insaturada, según reportes científicos (12).

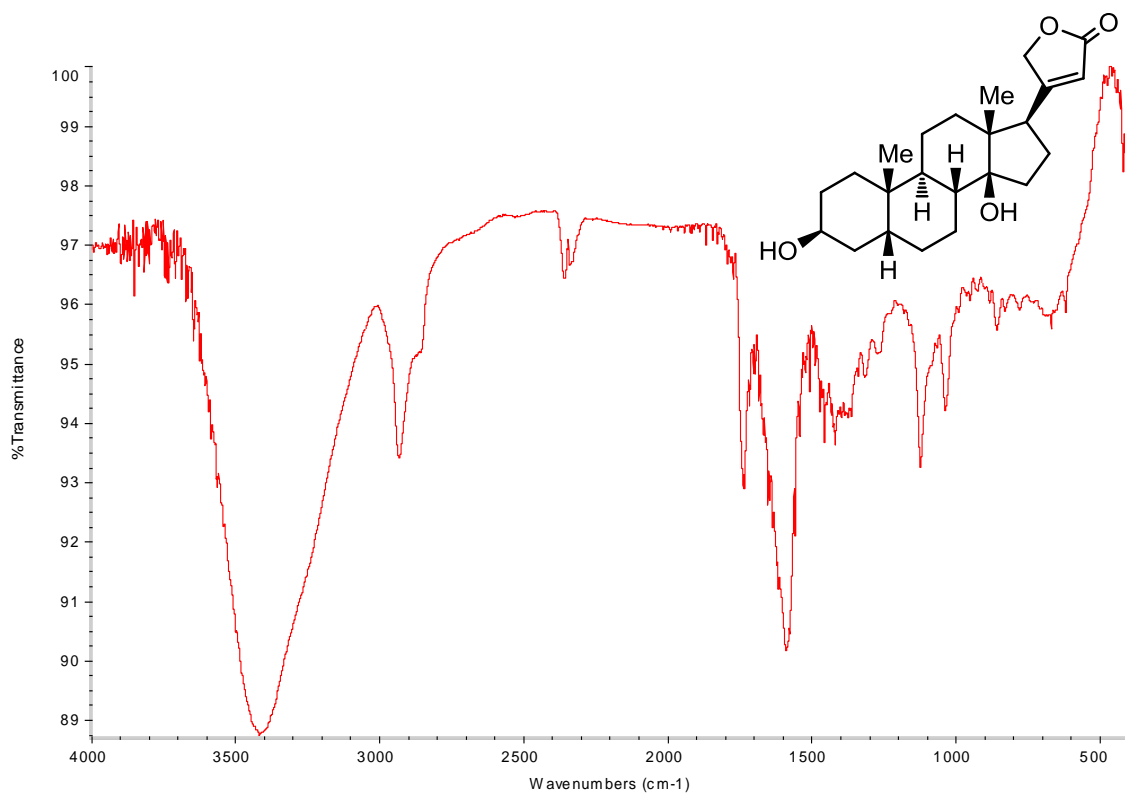


Figura N° 27. Espectro IR de la Digitoxigenina

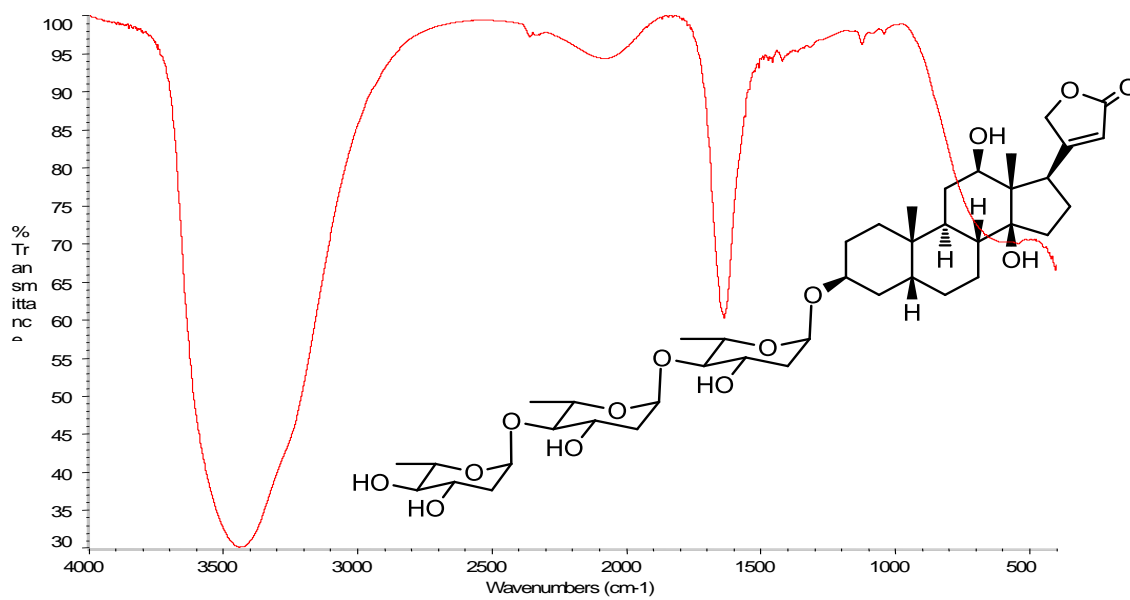


Figura N° 28. Espectro de IR de Digoxina.

3.9.2 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS).

La espectroscopía UV-VIS permite determinar la absorción de luz en una muestra.

Cuando la radiación incide sobre una sustancia, no toda ella se ve afectada por la misma, al átomo o conjunto de átomos que absorben radiación se le denominaba cromóforo.

En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo, se denominaban a tales grupos auxocromos.

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; particularmente los glicósidos cardiotónicos absorben entre los 200 a 300 nm.

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

Para que se observe una absorción máxima debe existir en la molécula un cromóforo (aquellos grupos funcionales que sin unión o conjugación con otros grupos, muestran absorción electrónica en la región del visible y ultravioleta).

De esta manera la técnica permite detectar la presencia de un determinado cromóforo el cual origina prácticamente el mismo patrón espectral, independientemente de la estructura total de la molécula (12).

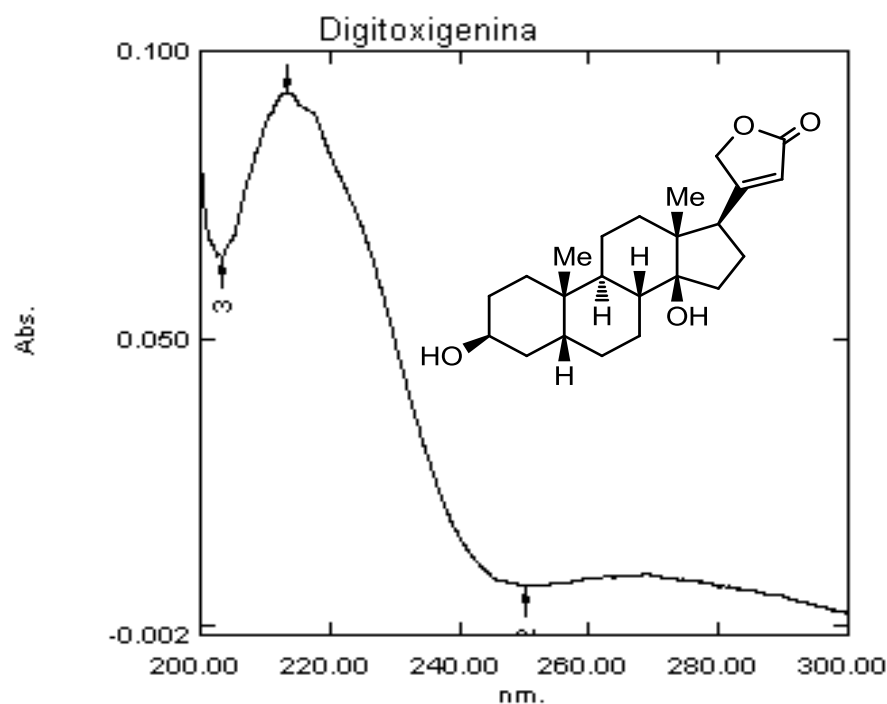


Figura N° 29. Espectro ultravioleta de la Digitoxigenina.

3.10 CUANTIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

La cuantificación de los glicósidos cardiotónicos se realiza a partir de los datos de absorbancia obtenidos en el análisis espectroscópico UV practicados a las fracciones que contengan glicósidos cardíacos; ya que las absorbancias nos darán una idea de la concentración idónea que tenemos que seguir para obtener absorbancias representativas (0.5-0.9) en cada una de las fracciones. Los resultados de la determinación cuantitativa de los glicósidos cardiotónicos presentes en las fracciones hidroalcohólicas procedentes de la corteza de raíces y flores de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* serán expresados en términos de un marcador externo, como la digoxina ($C_{41}H_{64}O_{14}$).

3.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

3.11.1 GENERALIDADES DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría de éstos son de punto final, al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático.

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

El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT).

Este colorante amarillo pálido, soluble en agua, es reducido tempranamente en células viables, por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua), fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones, lo cual es intrínsecamente tóxico para las células (3).

Ensayo de reducción del MTT es método simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

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

3.11.2 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.

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 (3). En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: Físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O₂, CO₂, tensión superficial, etc.), 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*.

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 (3).

Entre algunas de las células más comúnmente utilizadas son (12):

- 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)

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) (12).

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO.

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

La presente investigación tiene un tipo de estudio retrospectivo ya que se estudia el problema con datos del pasado de investigaciones realizadas. También es prospectivo ya que propone una nueva alternativa mediante datos obtenidos en el análisis de las especies en estudio y es experimental porque se realizan ensayos fitoquímicos y biológicos; además es hipotético-deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, se permite formular la siguiente hipótesis:

Las fracciones procedentes de los extractos hidroalcohólicos de las raíces y flores de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* poseen glicósidos cardiotónicos y estos presentan actividad citotóxica frente al carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón y adenocarcinoma humano de mama.

La investigación del presente estudio se dividió en tres etapas:

4.1.1 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

- Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, manuales, etc. En la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Revistas científicas, Ej: Journal of Natural Products, Phytochemistry, Journal the Phytotherapy, Letters in Organic Chemistry, ente otras.
- SciFinder Scholar (base de datos del American Chemical Society).
- Internet.

4.1.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO.

El universo de la investigación son las especies de Familia *Apocinácea*

Identificación de las muestras.

Las muestras fueron identificadas en la Sección Técnica Científica del Jardín Botánico “La Laguna” por el curador; Licenciado Jorge Monterrosa, las cuales fueron comparadas con el herbario interno (ver anexo1), asignándose los siguientes códigos:

- *Thevetia ahouia* (ES-1030)
- *Stemmadenia donnell-smithii* (ISV-623)
- *Plumeria rubra* (JMR-293)

Recolección del material vegetal.

La recolección del material vegetal se llevo a cabo en los lugares y meses que se detallan a continuación:

- Flores y raíces de *Plumeria rubra*: Calle final, Barrio el Calvario, Dulce nombre de María, Chalatenango; durante los meses de mayo y junio de 2010.
- Flores y raíces de *Stemmadenia donnell-smithii*: Lotificación Artigas, calle principal, contigua al cementerio municipal, San Martín, San Salvador; durante los meses de mayo y junio de 2010.
- Flores y raíces de *Thevetia ahouia*: Lotificación Artigas, calle principal, polígono “B”, casa 36, San Martín, San Salvador; durante los meses de mayo y junio de 2010.

4.1.3 INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO.

4.1.3.1 Preparación de las muestras a investigar.

Las flores y raíces de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* se les efectuó una limpieza de la siguiente manera: las muestras de raíces se lavaron con agua y se secaron a temperatura ambiente, en atmósfera seca, sin presencia de luz solar para evitar la degradación de glicósidos cardiotónicos por efecto de los rayos UV.

Luego fueron cortadas por medios mecánicos para obtener las cortezas y estas se continuaron secando a temperatura ambiente con excepción de las raíces de *Thevetia ahouia* que se secaron en estufa a una temperatura de 40°C por un tiempo de 60 minutos. Las flores de *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* fueron cortadas en secciones para facilitar el secado en la estufa en las mismas condiciones que las raíces. Las flores de *Plumeria rubra* solo se secaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz solar.

4.1.3.2 Molienda del material vegetal.

El siguiente paso consistió en moler el material vegetal correspondientes a las muestras de raíces *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia*; con el objetivo de lograr obtener un tamaño adecuado. En el caso de las flores se pulverizan manualmente. Luego se procedió a la pesada del material vegetal.

4.1.3.3 Pesada del material vegetal.

La obtención de metabolitos de interés en este caso glicósidos cardiotónicos depende en gran medida de la cantidad de muestra inicial al principio del análisis. De un peso de 100 gramos de material vegetal seco se logra obtener

alrededor de 2 gramos de producto aislado (glicósidos cardiotónicos). Para nuestro caso los pesos iniciales reales variaron entre cada uno de los órganos de las especies en estudio. Así que para las flores y raíces de ***P. rubra*** se tuvo un peso inicial de 53.2 g y 78.2 g respectivamente. De la misma forma para la ***S. donnell-smithii*** (33.2 g de flores y 58.1 g de raíces) y para la ***T. ahouia*** se pesaron 108.9 g y 190.2 g respectivamente.

4.1.3.4 Obtención de los extractos hidroalcohólicos de las raíces y flores de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia*.

El primer paso consistió en someter a maceración el material vegetal previamente seco, molido y debidamente pesado; utilizando como disolvente etanol al 60%. El tiempo de maceración fue de 48 horas. Después de transcurrido el tiempo de macerado, se filtro cada una de los extractos de las muestras obteniéndose un residuo y un filtrado. El segundo paso para la obtención de los extractos hidroalcohólicos fue someter a reflujo los residuos de las muestras que se colocaron en maceración. Las condiciones del reflujo fue a temperatura de ebullición del etanol y durante 24 horas no continuas, utilizando mantas térmicas. Obteniendo así un segundo filtrado. Luego se unieron ambos filtrados, dando como resultado el extracto hidroalcohólico. El reflujo complementa la extracción del macerado y se logra la completa separación de los metabolitos de las partes vegetales.

4.1.3.5 Fraccionamiento por partición líquido - líquido.

La partición líquido-líquido consistió en someter a los diferentes extractos hidroalcohólicos provenientes de las flores y raíces de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia*** a extracciones con *n*-hexano (para eliminar clorofila y grasa), acetato de etilo y diclorometano, estos últimos

son capaces de extraer los metabolitos secundarios de interés (glicósidos cardiotónicos) que la planta pudiera contener.

Procedimiento

Se realizó una secuencia de extracción de la siguiente manera: en primer lugar se adiciono el doble de volumen de *n*-hexano al volumen obtenido del extracto hidroalcohólico, en segundo lugar el doble de volumen de diclorometano y por ultimo de la misma forma se fraccionó con acetato de etilo. Se realizaron dos extracciones con el fin de obtener mayor cantidad de metabolitos presentes en las fracciones. A continuación se eliminó el solvente de cada una de las fracciones por medio del evaporador rotatorio y cámara de extracción de gases hasta obtener un residuo.

4.1.3.6 Identificación de glicósidos cardiotónicos por el método de cromatografía de capa fina.

Las condiciones que se utilizaron para la detección de los glicósidos cardiotónicos fueron las siguientes:

Fase estacionaria: cromatoplasas (10 x 20 cm) de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor.

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

Muestras:

- Fracciones *n*-hexánicas concentradas de raíces y flores de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***.
- Fracciones diclorometánicas concentradas de raíces y flores de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***.
- Fracciones de acetato de etilo concentradas de raíces y flores de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***.

Testigos: Digoxina (calidad reactivo, como glicósido) y Digitoxigenina (calidad reactivo, como aglicona).

Al final se miden las distancias recorridas por las muestras y los testigos. Posteriormente se calculan los $R_{f's}$ de interés (4).

Revelador:

- 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 (3).

- Cámara de luz U.V. (λ 254 nm y 356 nm)

Resultado positivo: manchas color naranja.

4.1.3.7 Análisis espectroscópico de las muestras positivas para glicósidos cardiotónicos.

Dentro de los análisis espectroscópicos que se realizaron en las fracciones que resultaron positivas a la presencia de glicósidos cardiotónicos:

- Espectroscopia Infrarroja: Avatar 330 FT-IR, marca ThermoNicolet.
- Espectroscopia Ultravioleta: PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu.

4.1.3.7.1 Análisis espectroscópico ultravioleta (32).

Se utilizaron para el análisis los residuos totalmente secos de las fracciones de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo procedentes de los extractos hidroalcohólicos de las cortezas de raíz y flores de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia*** en las que se detecten positivas la presencia de glicósidos cardiotónicos según la CCF de cada una de ellas.

Se peso una cantidad de muestra tal que al realizar la cascada de dilución se logre obtener una concentración adecuada del metabolito para que el espectrofotómetro UV logre detectarlo.

Se realizaron pruebas de solubilidad previas a las muestras siendo estas solubles en alcohol, por ello se prefirió trabajar con etanol absoluto (pro-análisis) para evitar la presencia agua en las muestra y así eliminar interferencias en los espectros.

Los espectros resultantes de las muestras se compararon con los espectros de los testigos utilizados, los cuales fueron digoxina y digitoxigenina.

Se realizo un barrido desde los 300 nm hasta los 200 nm en el equipo para rastrear posibles glicósidos cardiotónicos presentes en las fracciones. Para que la lectura sea valida o representativa se buscara tener una concentración que logre un dato de absorbancia entre 0.5 y 0.9.

4.1.3.7.2 Análisis espectroscópico infrarrojo (32).

Las muestras fueron reducidas a un sólido cristalino posterior a la concentración de las fracciones y a total evaporación de su disolvente, por esta razón el método más conveniente para obtener espectros de sólidos, especialmente en trabajos cuantitativos, es el de las pastillas o comprimidos, el cual consistió en mezclar de 2-5 mg de la muestra problema con un haluro alcalino (por lo general KBr). Se busca obtener una mezcla entre 0.3 a 1% o incluso entre 2 y 4%, por ello se pulverizan los miligramos de muestra en 100 mg de KBr para lograr ajustar el porcentaje de concentración del comprimido. Esta mezcla se pulverizó finamente y se introdujo en una matriz especial o prensa, donde se sometió, en vacío, a una presión elevada (de 3,000 a 10,000 kg/cm²) y así se obtiene una pastilla transparente, en la que la sustancia se encuentra en estado de suspensión sólida de grano muy fino.

4.1.3.8 Cuantificación de glicósidos cardiotónicos (22).

La cuantificación de los glicósidos cardiotónicos se realiza a partir de los datos de absorbancia, para obtener los resultados del análisis espectroscópico UV practicados a las fracciones que contengan glicósidos cardíacos; ya que las absorbancias nos darán una idea de la concentración idónea que tenemos que seguir para obtener absorbancias representativas (0.5-0.9) en cada una de las fracciones.

La determinación cuantitativa de los glicósidos cardiotónicos presentes en las fracciones hidroalcohólicas procedentes de la corteza de raíces y flores de *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* serán expresado en términos de un marcador externo, como la digoxina (C₄₁H₆₄O₁₄).

La cuantificación se desarrollo en base a la metodología planteada en la Farmacopea Italiana; la cual estipula el siguiente procedimiento:

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

Las fracciones se protegieron de la luz utilizando papel carbón esto con el fin de evitar la degradación del picrato de sodio en solución alcalina por efecto de los rayos UV; se dejaron reposar cada muestra por 30 minutos exactos (el exceso de tiempo puede contribuir a la degradación del picrato sódico y obtener así datos erróneos de absorbancia).

Se procedió a la lectura de las fracciones a una longitud de onda de 495 nm. Luego se calcula según las absorbancias la cantidad de glicósidos cardiotónicos presentes en las muestras en términos de digoxina estándar y así se logra determinar la concentración de glicósidos cardiotónicos (22). El cálculo de la cantidad en mg de cardiotónicos presentes en las muestras se realizo utilizando la siguiente fórmula:

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

El proceso antes descrito se realizó por quintuplicado en las fracciones AcOEt de flores de *thevetia ahouia*, CH₂Cl₂ de corteza de raíz de *thevetia ahouia* y CH₂Cl₂ de flores de *thevetia ahouia*, donde se determinó la presencia de glicósidos cardíacos, posteriormente se calculó la desviación estándar para comprobar su reproducibilidad (22).

4.1.3.9 Determinación de la actividad citotóxica (2).

Las fracciones que mostraron presencia de glicósidos cardiotónicos fueron sometidas a actividad citotóxica, la cual fue realizada en el Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, España, por la Dra. Laila Moujir.

Las líneas celulares ensayadas son:

- 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, MEDM (Sigma), suplementado con 5% de suero de ternera fetal (Gibco), y una mezcla de 1% de penicilina-estreptomicina (10,000 UI/mL). Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ y 98% de humedad. La actividad citotóxica se evalúa a través del método colorímetro MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio bromuro].

Ensayo: 30 células en suspensiones (0.1 mL, de 2×10^4 células / buenas) se incuban en una placa con 96 pocillos; las fracciones que dan positivas las pruebas para glicósidos cardiotónicos, a diferentes concentraciones se disuelven

en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de 48 ó 72 h se mide la densidad óptica utilizando un lector micro ELISA (Multiskan Plus II) a 550 nm y usando una lectura de fondo de 620 nm después de la disolución de la MTT formazan con DMSO.

El porcentaje de viabilidad (CI_{50}) se calcula por medio de una curva. Todos los experimentos se repiten tres veces (2).

DIAGRAMA DE TRABAJO.

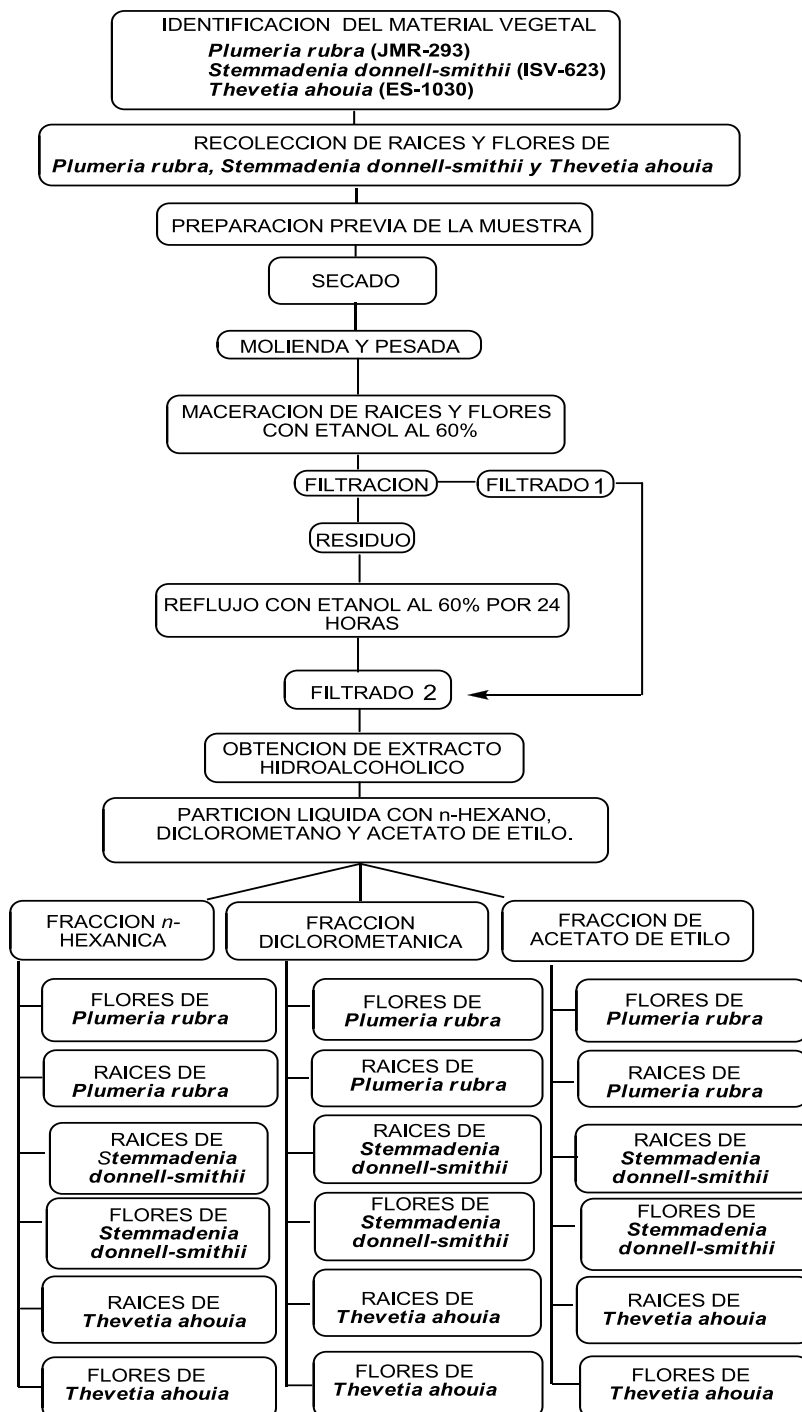


Figura N°30. Esquema de trabajo (a).

Continuación de diagrama de trabajo:

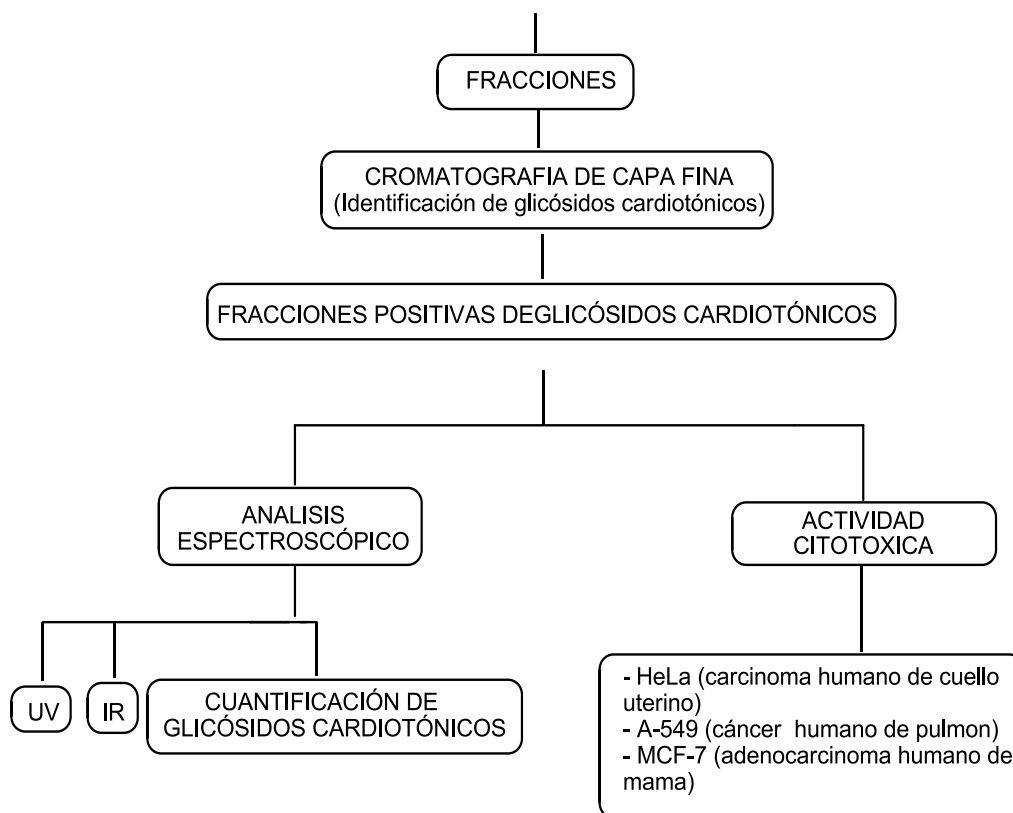


Figura N°31. Esquema de trabajo (b).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ESTUDIO FITOQUÍMICO.

Las cortezas de raíces de *Plumeria rubra* fueron secadas en estufa a una temperatura entre 40°C a 45°C y las raíces de *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* se secaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz solar.

Para facilitar el secado las flores de *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* fueron cortadas en secciones ya que se observó una gran cantidad de agua y látex que contenían. Se les efectuó un corte dividiéndolo en cuatro secciones para evitar la descomposición de las flores y se sometieron a secado en estufa durante 70 minutos.

El secado al sol directo no es recomendable porque puede alterar los principios activos ya que la luz ultravioleta puede producir reacciones químicas que los pueden alterar. Se necesita entonces secar las plantas en la claridad y con aireación adecuada

A continuación se presentan los datos de peso de material seco inicial de los cuales se partió para la obtención de las fracciones hidroalcohólicas y sus respectivos códigos asignados de las especies *Plumeria rubra*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Thevetia ahouia* respectivamente.

Cuadro N° 2. Peso del material vegetal seco inicial de flores y raíces de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***.

Espece Vegetal	Órgano de la planta	Código	Peso de material seco inicial (g)
<i>Plumeria rubra</i>	Flores	Pr-F	53.2
	Corteza de raíces	Pr-R	78.2
<i>Stemmadenia donnell-smithii</i>	Flores	Sds-F	33.2
	Corteza de raíces	Sds-R	58.1
<i>Thevetia ahouia</i>	Flores	Ta-F	108.9
	Corteza de raíces	Ta-R	190.2

Después de transcurrido el tiempo de macerado se paso a filtrar cada una de las muestras obteniéndose un residuo y un filtrado. A este ultimo se les denomina “filtrado uno” el cual luego se une a un segundo filtrado que resulta de la extracción a reflujo con etanol al 60% v/v del residuo del macerado. El reflujo se realizó por un período de tiempo de 24 horas no continuas, después se filtra y de aquí se obtiene un” filtrado dos”. La mezcla del filtrado 1 y 2 constituye el extracto hidroalcohólico.

Generalmente se usa la maceración cuando la planta contiene principios activos que se perderían o quedarían modificados por acción del calor ò bien al alterarse el disolvente con el calor y el extracto puede permanecer sin contaminación microbiana.

Durante el reflujo la muestra entró en contacto directo con la fuente de calor con el objeto de un agotamiento total de la muestra lo cual es una ventaja. En este caso es el mismo alcohol recuperado el utilizado en la maceración (alcohol etílico al 60% v/v). En el reflujo así como en la maceración se utilizan grandes cantidades o volúmenes de disolvente lo cual es una desventaja desde el sentido económico.

A los extractos hidroalcohólicos de *Thevetia ahouia*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Plumeria rubra*, se les realizó tres extracciones líquido-líquido con *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo así como también la posterior recuperación del solvente.

Se debe considerar y tener muy en cuenta las densidades (ρ) de los disolventes con respecto a la densidad del extracto; así como también los colores característicos de los extractos, con el fin de evitar percances o confusiones en la partición. Y separación de las fases.

Se realizaron 2 extracciones por cada uno de los disolventes; son 6 en total por cada órgano de planta en análisis.

En consecuencia se obtendrán 18 fracciones en total) de los extractos. La eliminación del agua de cada fracción se realiza con sulfato de sodio anhidro.

El comportamiento de las densidades de los disolventes utilizados en el análisis (diclorometano, acetato de etilo y *n*-hexano) con respecto a las densidades de los extractos hidroalcohólicos se presentan en el siguiente cuadro de resultados:

Cuadro N° 3. Comportamiento de las densidades de los disolventes orgánicos frente a la densidad del extracto hidroalcohólico.

Extracto Hidroalcohólico	Disolvente Orgánico		
	<i>n</i> -hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo
Corteza de raíces de <i>Stemmadenia donnell-smithii</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$
Flores de <i>Stemmadenia donnell-smithii</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$
Corteza de raíces de <i>Plumeria rubra</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$
Flores de <i>Plumeria rubra</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$
Corteza de raíces de <i>Thevetia ahouia</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$
Flores de <i>T.ahouia</i>	$\rho_{Ext.} > \rho_{n-hex}$	$\rho_{Ext.} < \rho_{CH_2Cl_2}$	$\rho_{Ext.} > \rho_{AcoEt}$

En general el comportamiento entre cada uno de los extractos es similar entre ellos por lo tanto se puede resumir la tabla anterior en:

$$\rho_{Extracto} > \rho_{n-hexano}; \rho_{Extracto} < \rho_{Diclorometano}; \rho_{Extracto} > \rho_{Acetato\ de\ Etilo}$$

Para lograr obtener fracciones libres de presencia de agua se vuelve indispensable la utilización de Na₂SO₄ anhidro. La eliminación del agua contribuye a la calidad del análisis espectroscópico, ya que tanto los espectros IR como UV resultan con interferencias si se encuentran presentes moléculas de H₂O en el residuo producto de la concentración y posterior desecado en la cámara extractora.

El paso siguiente es la concentración de las fracciones *n*-hexánica, diclorometánica y de acetato de etilo de cada uno de los órganos en estudio (flores y raíces de ***Plumeria rubra***, ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia***) por medio del rotavapor que tiene como objeto la eliminación del solvente. El paso posterior es comprobar por medio de un método cromatográfico la presencia de glicósidos cardiotónicos antes que los residuos de las fracciones lleguen a sequedad total y así poder descartar las fracciones que no los contengan.

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La comparación de los Rf's y el color de las manchas de las fracciones y los estándares permitió determinar la similitud con los testigos de digitoxigenina y de digoxina. Con el revelador Baljet; se presentaron cinco manchas características de estos metabolitos (manchas color naranja), las cuales presentan formas alargadas y ovoides. Por lo que se puede confirmar la presencia de la lactona insaturada típica de los glicósidos cardiotónicos ya que el reactivo revelador de Baljet es selectivo para estos metabolitos, por presentar manchas bastante nítidas y persistentes aún en bajas concentraciones o en pequeñas fracciones de estos metabolitos. El tiempo de duración de estas manchas fue de 48 horas. Las pruebas de cromatografía en capa fina que se les practicò a las 12 fracciones hidroalcohólicas procedentes de las flores y raíces de ***Plumeria rubra*** y ***Stemmadenia donnell-smithii*** resultaron negativas, demostrando que estas especies están exentas de contener glicósidos cardíacos en los órganos en estudio y posiblemente en toda la planta. De las tres especies en estudio solo a las flores y cortezas de raíces de ***Thevetia ahouia*** se les identificò la presencia de glicósidos cardiotónicos.

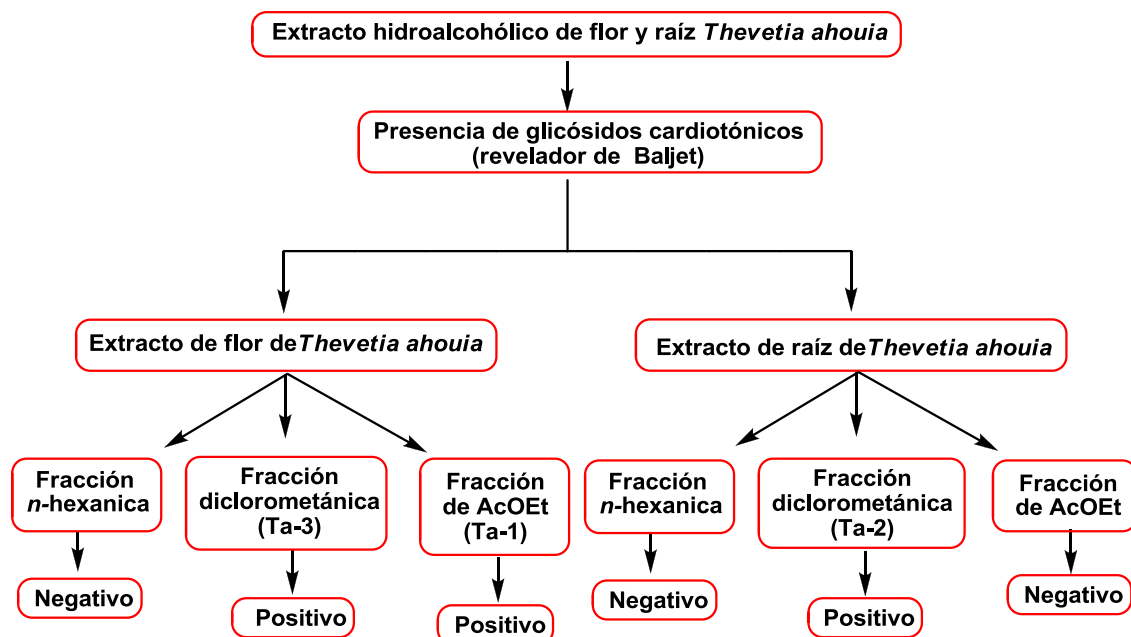


Figura N° 32. Resultado del fraccionamiento líquido-líquido de los extractos hidroalcohólicos de flor y raíz de *Thevetia ahouia*

Como se observa en los resultados solamente se identificó la presencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones diclorometánicas y de acetato de etilo, obtenidas a partir del extracto hidroalcohólico de flores y raíces de cada una de las especies en estudio, a excepción de la fracción de acetato de etilo de raíz; debido a esto las fracciones de *n*-hexano y acetato de etilo de raíz no será tomada en cuenta para los análisis espectroscópicos ni para la realización de la prueba citotóxica *in vitro*.

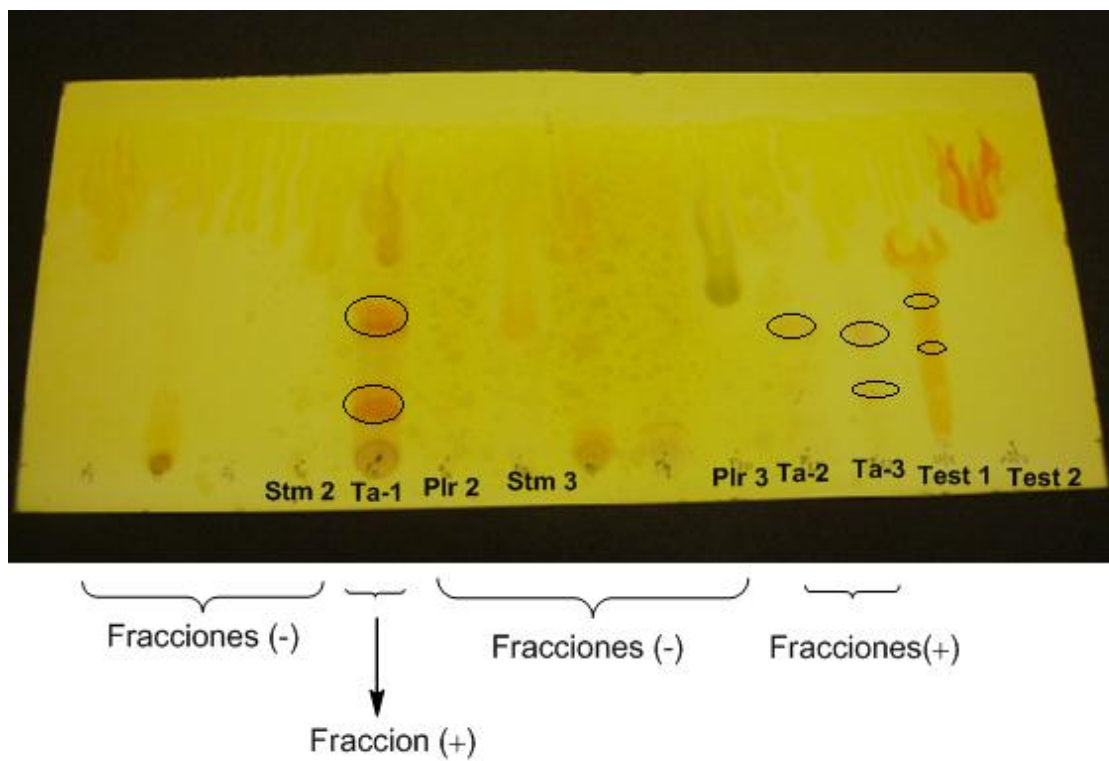


Figura N° 33. Placa cromatográfica reveladas con Baljet.

Donde:

- Testigo 1: Digitoxigenina (+) (aglicona)
- Testigo 2: Digoxina (+) (glicósido)
- Ta-1: AcOEt de Flores de *Thevetia ahouia* (+)
- Ta-2: CH₂Cl₂ de corteza de raices de *Thevetia ahouia* (+)
- Ta-3: CH₂Cl₂ de Flores de *Thevetia ahouia* (+)
- Stm-2: CH₂Cl₂ de Flores de *Stemmadenia donnell-smithii* (-)
- Stm-3: AcOEt de corteza de raices de *Stemmadenia donnell-smithii* (-)
- Plr-2: CH₂Cl₂ de Flores de *Plumeria rubra* (-)
- Plr-3: AcOEt de corteza de raices de *Plumeria rubra* (-)

Cuadro N° 4. Resultado de la evaluación cromatográfica, de los diferentes fracciones procedentes de los flores y cortezas de raíces de *Thevetia ahouia*.

Fracción N°	Código de Fracción	Nombre de la Fracción	R _f de la mancha (placa revelada con Baljet)
1	Ta-1	AcOEt de Flores de <i>Thevetia ahouia</i>	0.39 0.49
2	Ta-2	CH ₂ Cl ₂ de corteza de raíces de <i>Thevetia ahouia</i>	0.09 0.16 0.44 0.52
3	Ta-3	CH ₂ Cl ₂ de Flores de <i>Thevetia ahouia</i>	0.23 0.54 0.51

- Testigo 1: Digitoxigenina (aglicona) R_f de 0.65
- Testigo 2: Digoxina (glicósido) R_f de 0.50
- Fase móvil: Acetato de etilo: metanol: agua (8:1:1).

Comparando el R_f del testigo (Digitoxigenina y Digoxina) con los diferentes R_f de las fracciones, se observa la presencia de cardiotónicos en forma de glicósidos (R_f < 0.6). Demostrando que no hay degradación de la parte glicosada.

5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

Estos análisis, por lo general, se hacen para investigar la clase de anillos aromáticos o heterocíclicos que están presentes en un producto natural de estructura desconocida; convirtiendo así el análisis de ultravioleta en una herramienta complementaria para un examen de infrarrojo (6).

5.3.1 Espectroscopia ultravioleta.

Las fracciones de Ta-1 (flor de *T. ahouia* en AcOEt), Ta-2 (raíz de *T. Ahouia* en CH₂Cl₂) y Ta-3 (flores de *T. ahouia* en CH₂Cl₂) fueron sometidas a un barrido de 300-200nm en el espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700, marca Shimadzu, obteniendo los siguientes espectros:

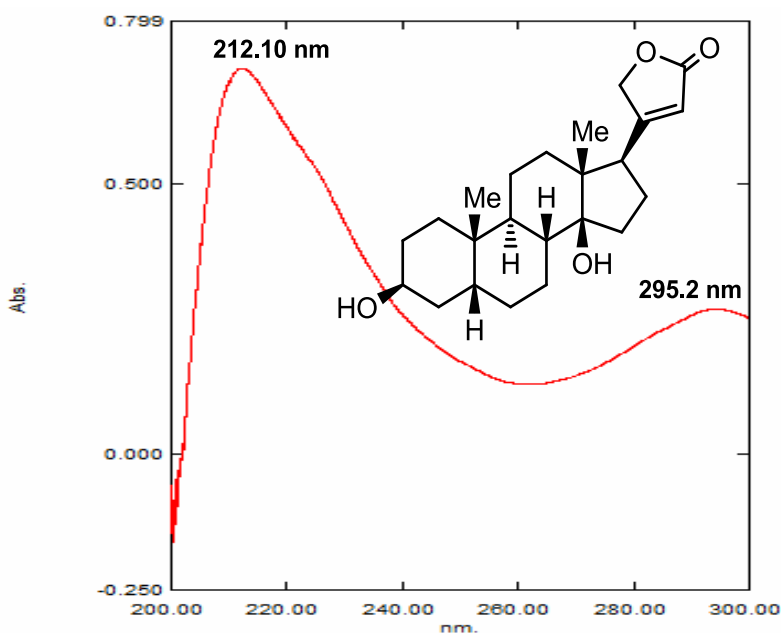


Figura N° 34. Espectro UV de la digitoxigenina (testigo).

Se puede observar en el espectro de la digitoxigenina (Testigo 1), hay dos maximos de absorvancia que cumplen con el rango establecido, siendo el maximo de 212.10 nm caracteristico de la lactona α - β -insaturada.

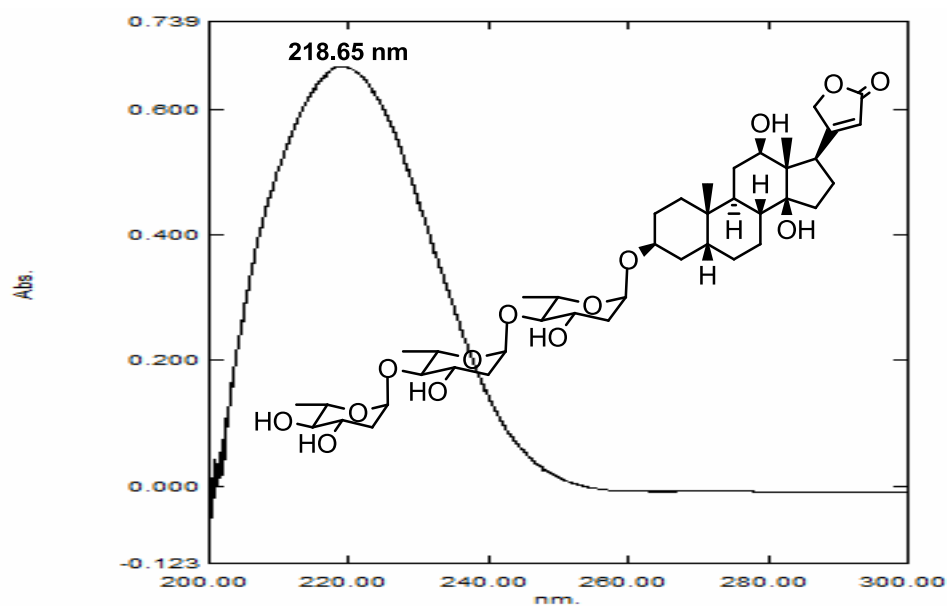


Figura N° 35. Espectro UV de la digoxina (testigo).

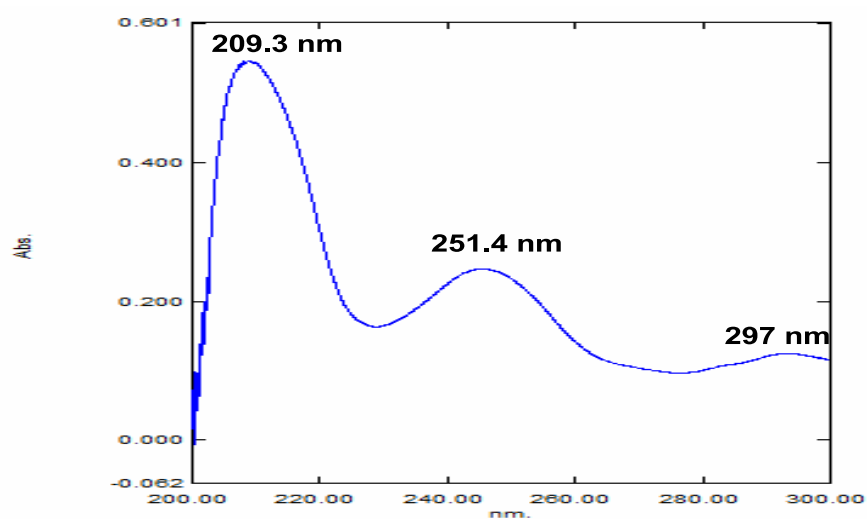


Figura N° 36. Espectro UV de fracción 1 (Ta-1), flor de *T. ahouia* en AcOEt.

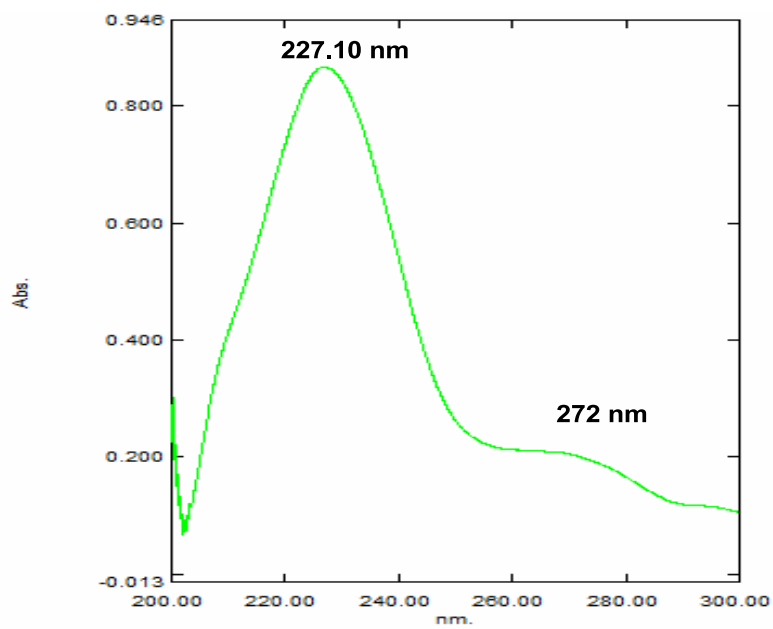


Figura N° 37. Espectro UV fracción 2 (Ta-2), raíz de *T. ahouia* en CH_2Cl_2 .

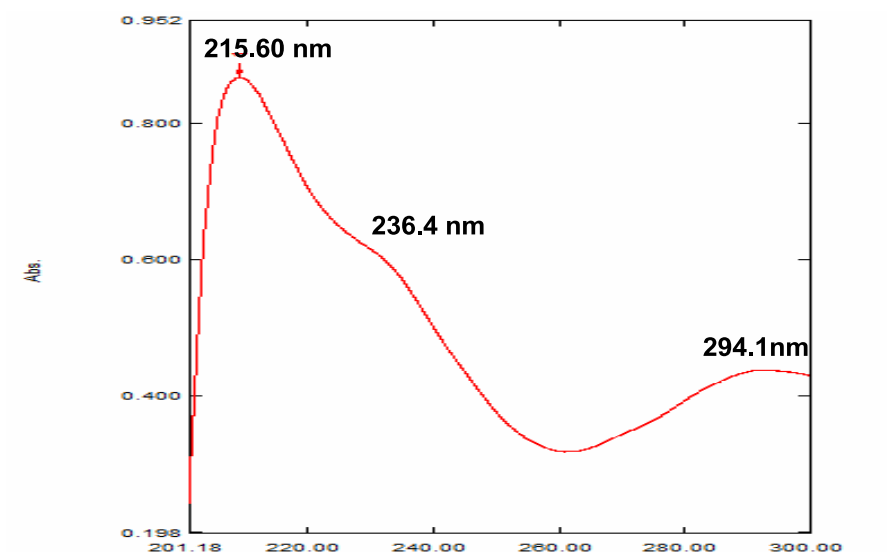


Figura N° 38. Espectro UV de fracción 3 (Ta-3), flores de *T. ahouia* en CH_2Cl_2 .

Todas las fracciones de *T. ahouia*, presentaron varios máximos de absorbancia entre 200 a 300 nm, que comparados con los testigos nos indica la presencia del cromóforo lactona α - β -insaturada que muestra un máximo de absorción alrededor 205-220 nm típica de glicósidos cardiotónicos (12).

Por lo tanto las fracciones de diclorometano tanto de flores como de raíces de *Thevetia ahouia*, así como la fracción de acetato de etilo correspondiente a flores de *T. ahouia* muestran la presencia de máximos de absorbancia características de glicósidos cardiotónicos; por lo cual se comprueba que el género *Thevetia* son una fuente considerable de estos metabolitos especialmente de los órganos estudiados.

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

Fracción N°	Max. Absorbancia	Longitud de onda Max.(nm)
Ta-1	0.546	209.30 251.40 277.00
Ta-2	0.866	227.10 272.00
Ta-3	0.851	215.60 236.40 294.10
Digitoxigenina	0.712	212.10 295.20
Digoxina	0.668	218.65

5.3.2 Espectroscopia Infrarroja.

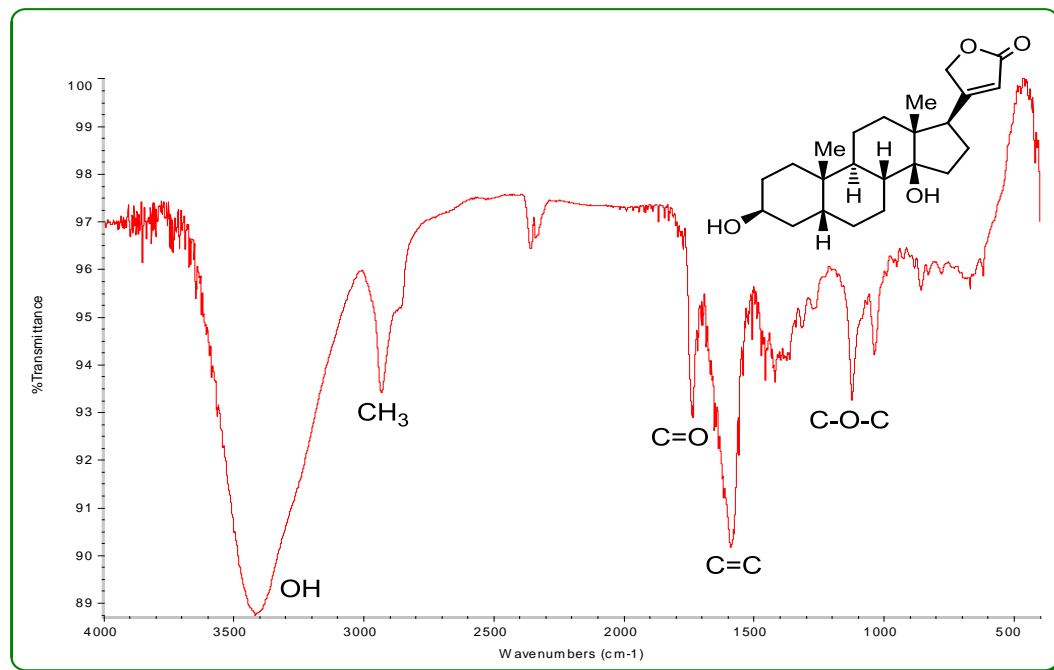


Figura N^o 39. Espectro IR de digitoxigenina (testigo).

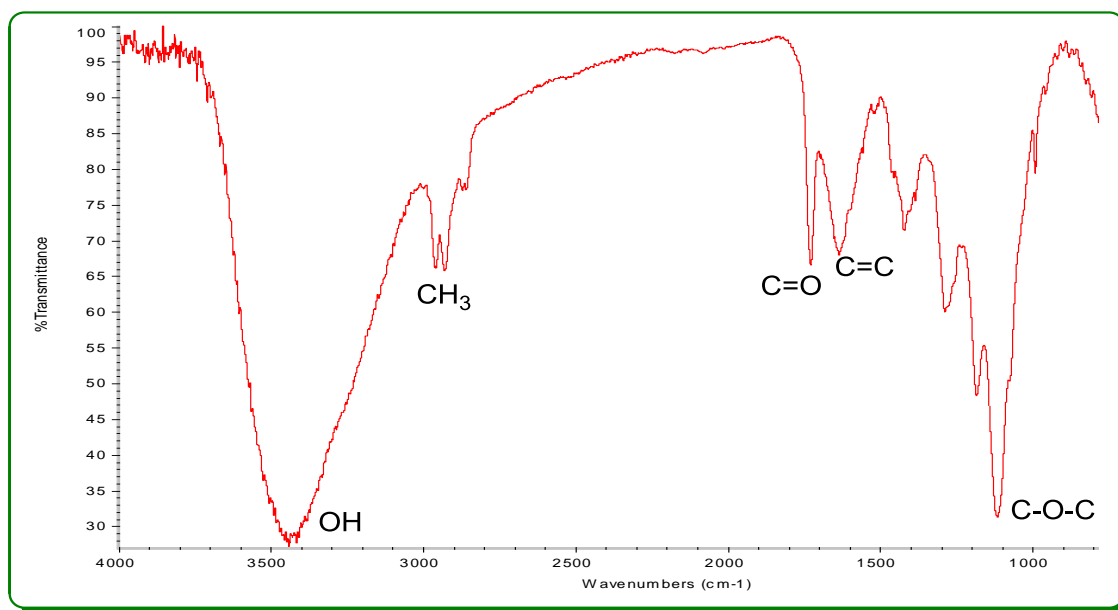


Figura N^o 40. Espectro IR de fracción 1 (Ta-1), Flor de *T. ahouia* en AcOET

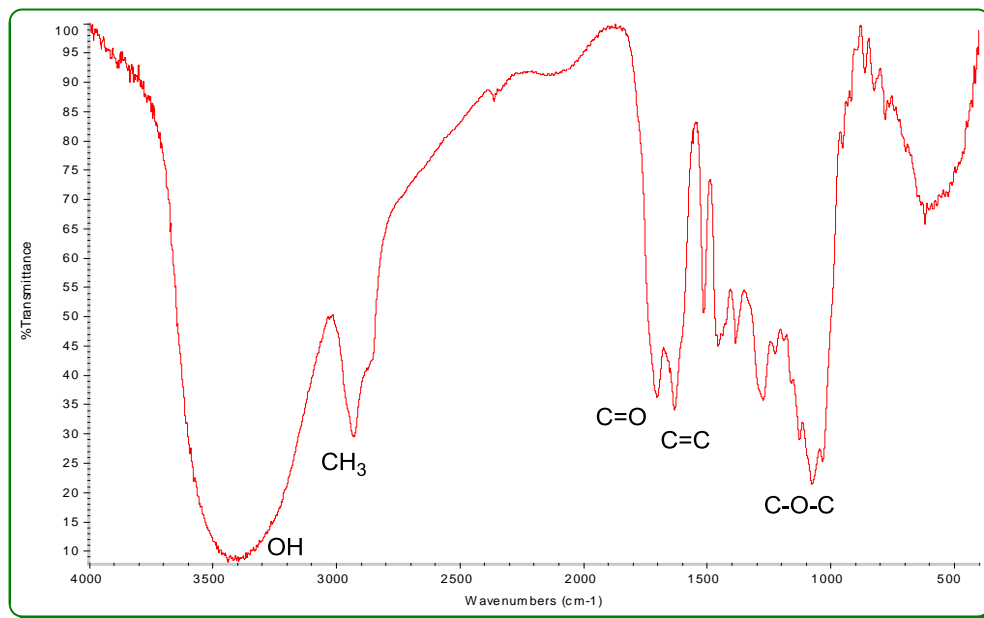


Figura N° 41. Espectro IR de fracción 2 (Ta-2), Raíces de *T. ahouia* en CH₂Cl₂

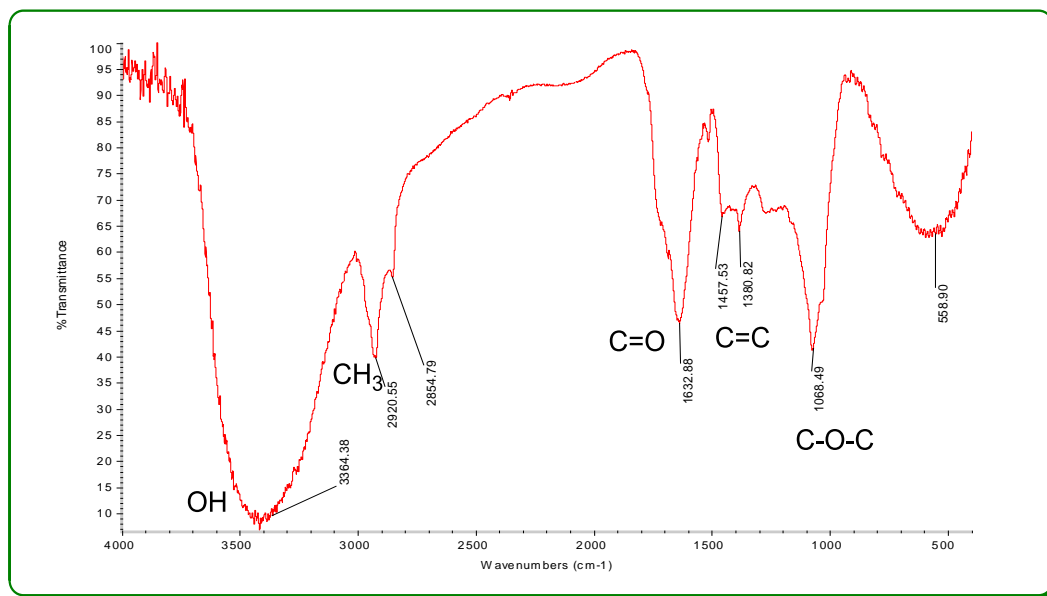


Figura N° 42. Espectro IR de fracción 3 (Ta-3), Flores de *T. ahouia* en CH₂Cl₂.

Las tres fracciones analizadas por espectroscopía infrarroja mostraron tener 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) (12).

Por lo tanto las fracciones de diclorometano tanto de flores como de raíces de *Thevetia ahouia*, así como la fracción de acetato de etilo correspondiente a flores de *T. ahouia* muestran la presencia de bandas características de glicósidos cardiotónicos; comprobando que el genero *Thevetia* son una fuente considerable de estos metabolitos.

Cuadro N°6. 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	CH ₃	C=C	C-O-C	C=O
	3600-3700	2870-2960	1450- 1635	1020-1270	1735
Ta-1	+	+	+	+	+
Ta-2	+	+	+	+	+
Ta-3	+	+	+	+	+
Digitoxigenina	+	+	+	+	+
Digoxina	+	-	+	-	+

+ = Presencia positiva de la banda de absorción.

- = No se presenta la banda de absorción

5.4 PRUEBA DE CUANTIFICACIÓN DE GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS.

De las tres especies en estudio solo a las flores y cortezas de raíces de *Thevetia ahouia* se les cuantificó la presencia de glicósidos cardiotónicos, los pesos iniciales fueron utilizados para determinar el contenido total de glicósidos cardiotónicos en raíz y flores. Los datos de pesos de muestra iniciales de *Plumeria rubra* y *Stemmadenia donnell-smithii* no se tomaron en cuenta ya que fueron negativos a la detección de glicósidos cardiotónicos, así como las observaciones sujetas a su determinación. El procedimiento de la prueba de cuantificación de glicósidos cardiotónicos fue siguiendo la metodología detallada en la farmacopea italiana. Luego se continuó con un procedimiento de cálculos estadísticos, los cuales se describen a continuación:

Cuadro N°7. Descripción del estándar de digoxina (12).

Estándar	Peso	valoración	Factor de dilución	Concentración	Absorbancia
Digoxina	38.5mg	96.1 % (para uso)	1000	0.0385mg/mL	0.356

ST: Digoxina farmacopea Italiana.

Tratamiento: secado al vacío a 104 C° por 1 hora.

Solvente: alcohol R (grado absoluto).

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

Fórmula usada:

$$C_{mx} = \frac{(C_{st})(A_{mx})}{A_{st}} \cdot FD$$

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 fracción1 (Ta-1): acetato de etilo de flores de *T. ahouia* (prueba realizada por quintuplicado).

$$C_{Ta-1(1)} = \frac{(0.0385)(0.610)}{0.356} \cdot 100 = 6.60 \text{ mg}$$

$$C_{Ta-1(2)} = \frac{(0.0385)(0.612)}{0.356} \cdot 100 = 6.62 \text{ mg}$$

$$C_{Ta-1(3)} = \frac{(0.0385)(0.620)}{0.356} \cdot 100 = 6.70 \text{ mg}$$

$$C_{Ta-1(4)} = \frac{(0.0385)(0.615)}{0.356} \cdot 100 = 6.65 \text{ mg}$$

$$C_{Ta-1(5)} = \frac{(0.0385)(0.618)}{0.356} \cdot 100 = 6.68 \text{ mg}$$

Contenido promedio de fracción 1 (Ta-1)= 6.65 mg de glicósido cardiotónico

-Intervalo de confianza de la medida para muestras pequeñas al 95% de confianza (7).

Fórmula a IC (μ) = $\bar{X} \pm t_{n-1} \cdot S/\sqrt{n}$ usar:

Donde:

\bar{X} = Media aritmética $\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$; t_{n-1} = Valor de tabla; n = Número de muestras

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

Para muestra 1:

Media:

$$\bar{X} = \frac{(6.60+6.62+6.70+6.65+6.68) \text{ mg}}{5}$$

$\bar{X} = 6.65$ mg de glicósido cardiotónico en fracción 1 (Ta-1)

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{(6.60-6.65)^2 + (6.62-6.65)^2 + (6.70-6.65)^2 + (6.65-6.65)^2 + (6.68-6.65)^2}{5-1}}$$

$$S = 0.041$$

Para t_{n-1} los grados de libertad son: $5-1=4$; por tanto el valor de t_{n-1} en tabla es de 2.78 para cuatro grados de libertad al 95% de confianza (2).

$$IC(\mu) = 6.65 \text{ mg} \pm (2.78) (0.041) \sqrt{5} \left\{ \begin{array}{l} \text{LS}=6.70 \text{ mg} \\ \text{LI}=6.60 \text{ mg} \end{array} \right.$$

Obteniendo un resultado para la muestra uno de $6.65 \text{ mg} \pm 0.041 \text{ mg}$ con un intervalo de confianza del 95% (7).

CUADRO N° 8. Interpretación de medidas estadísticas de dispersión.

Fracción N°	Tipo de muestra	Desviación estándar (S)	Intervalo de confianza IC(μ)
Ta-1	Flor de <i>T. ahouia</i> en AcOET	0.041	IC(μ)= 6.65±0.051 LS= 6.70 LI= 6.60 Me= 6.65
Ta-2	Raíz de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.097	IC(μ)=7.08±0.121 LS= 7.20 LI= 6.96 Me= 7.08
Ta-3	Flor de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.065	IC(μ)=7.35±0.081 LS= 7.43 LI= 7.27 Me= 7.75

Los resultados obtenidos de la desviación estándar y de los intervalos de confianza de las tres fracciones nos indican cuánto pueden alejarse los valores respecto al promedio de datos (media) (7).

Es de hacer notar que la desviación estándar de la fracción de diclorometano procedente de la corteza de raíces de *Thevetia ahouia* es mayor (0.097) con respecto a las desviaciones de las fracciones de las flores de *Thevetia ahouia* tanto la de acetato de etilo como de diclorometano la cuales presentaron desviaciones de 0.041 y 0.065 respectivamente. Demostrando estas ultimas mayor reproducibilidad.

Una desviación estándar grande indica que los puntos están lejos de la media y una desviación pequeña indica que los datos están agrupados cerca de la media. Por lo tanto los datos de la desviación estándar e intervalos de confianza obtenidos en cada una de las fracciones son significativos de manera que son representativos y confiables ya que están en el rango esperado según se puede observar en el cuadro No. 7. (7).

Rendimiento de glicósidos cardiotónicos en cada una de las fracciones.

Ejemplo de cálculos utilizando datos de la fracción 1 y fracción 3 (fracciones que corresponde a las flores).

- Fracción 1(Ta-1) Flores de *Thevetia* en AcOEt.

Donde:

P_{mx} = peso muestra

$Cont_{GC}$ = contenido de glicósidos cardiotónicos

P_{frac} = peso de fracción

$C_{ant GC_{frac}}$ = cantidad de glicósidos cardiotónicos en la fracción

Inicialmente se busca la cantidad de glicósidos cardiotónicos en la fracción, para ello es necesario tener en cuenta el peso de muestra que es de 0.015g, el cual contiene 0.00665g de glicósidos cardiotónicos. Interesa conocer que cantidad de GC (glicósidos cardiotónicos) hay en 2.326g de peso de fracción, por regla de tres se multiplica el peso P_{frac} por el Cont GC, el cual a su vez se divide entre el P_{mx}, determinado así la cantidad de glicósidos cardiotónicos en la fracción uno.

$$\begin{array}{l} P_{mx} \text{ ————— } Cont \text{ GC} \qquad 0.015g \text{ ————— } 0.00665g \\ P_{frac} \text{ ————— } Cant \text{ GC}_{frac} \qquad 2.326g \text{ ————— } X_1 = Cant \text{ GC}_{frac} \end{array}$$

$$X_1 = \frac{(2.326g)(0.00665g)}{0.015g}$$

$X_1 = 1.031g$ de glicósidos cardiotónicos en fracción 1 (Ta-1) Flores de T. ahouia en AcOEt; expesados como digoxina

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción 1.

Se procede a determinar que porcentaje de estos glicósidos cardiotónicos hay en la fracción. Para ello es necesario partir que en 100% de material vegetal hay 2.326g de peso de fracción. Interesa determinar que porcentaje hay en 1.031g de glicósidos cardiotónicos de fracción uno.

Por regla de tres se multiplica la Cant GC_{frac} por el 100% del material vegetal, el cual a su vez se divide entre el P_{frac}, determinado así el porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción.

$$\begin{array}{l} P_{frac} \text{ ————— } 100\% \qquad 2.326g \text{ ————— } 100\% \\ Cant \text{ GC}_{frac} \text{ ————— } X\% \qquad 1.031g \text{ ————— } X_1 \\ X_1 = 44.33\% \end{array}$$

$$X_1 = \frac{(1.031\text{g})(100\%)}{2.326\text{g}} \quad X_1 = 44.33\% \text{ de glicósidos cardiotónicos en la fracción Ta-1 (Flores de } \mathbf{T. ahouia} \text{ en AcOET)}$$

- Fracción 3 (Ta-3) Flores de *Thevetia* en CH₂Cl₂.

Se realiza el mismo procedimiento que en la fracción 1; se inicia partiendo de un peso de muestra de 0.017g, el cual contiene 0.00708g de glicósidos cardiotónicos. Interesa conocer que cantidad de heterosidos cardiacos hay en 2.326g de peso de fracción tres.

$$\begin{array}{l} 0.017\text{g} \text{ ——— } 0.00708\text{g} \\ 4.154\text{g} \text{ ——— } X_3 \end{array}$$

$X_3 = 1.730\text{g}$ de glicósidos cardiotónicos en la fracción Ta-3 (Flores de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂); expresados como digoxina

Porcentaje de glicósidos cardiotónicos en la fracción 3.

$$\begin{array}{l} 4.154\text{g} \text{ ——— } 100\% \\ 1.730\text{g} \text{ ——— } X_3 \end{array}$$

$X_3 = 41.65\%$ de glicósidos cardiotónicos en la fracción Ta-3 (Flores de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂)

- Contenido de glicósido cardiotónicos totales en las flores de *Thevetia ahouia* (fracción 1 y 3)

Para determinar que cantidad de glicósido cardiotónicos totales hay en las flores, es necesario realizar una sumatoria del contenido de glicósido cardiotónicos de cada una de la fracciones, incluyendo la fracción *n*-hexánica.

$\Sigma X_1+X_3+X_2= 1.031g+1.7030+2.0038$ $X_T= 4.7378g$ de glicósidos cardiotónicos totales el la fracción de flores de ***Thevetia ahouia***

Donde X_2 : Fracción *n*-hexánica

Porcentaje glicósido cardiotónicos totales en las flores de ***Thevetia ahouia***

Para calcular que porcentaje de glicósido cardiotónicos totales hay en las flores, es necesario partir que en 100% de material vegetal hay 108.90g de flores en base seca; determinando así que porcentaje de glicósido cardiotónicos totales expresados como digoxina están presentes en 4.737g de flores de las diferentes fracciones.

$$\begin{array}{l} 108.900g \text{ ——— } 100\% \\ 4.737g \text{ ——— } X \end{array}$$

$X= 4.35\%$ de glicósido cardiotónicos totales en flores ***T. ahouia*** expresados como digoxina

Cuadro N° 9. Contenido de glicósidos cardiotónicos de cada una de las fracciones hidroalcohólicas.

Fracción N°	Tipo de muestra, nombre de fracción	Peso de la fracción (g)	Peso de las muestra (mg) ^a	Contenido de Glicósidos Cardiotónicos, expresado como digoxina. ^a	
				Muestras (mg) ^b	Fracción (g)
Ta-1	Flor de <i>T. ahouia</i> en AcOET	2.3265	14.50	6.65 ± 0.051	1.031
Ta-2	Raíz de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	3.6661	17.54	7.35 ± 0.081	1.497
Ta-3	Flor de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	4.1548	17.30	7.08 ± 0.121	1.730

a. Datos promedios de análisis realizado por quintuplicado

b. Resultados con intervalo de confianza del 95%.

El contenido de glicósidos cardiacos no varia entre cada una de las fracciones ya que se encuentran en un rango de peso en gramos entre 1.0 y 1.7 siendo el mas alto la tercera fracción correspondiente a la fracción diclorometánica de las flores de *Thevetia ahouia*. La fracción de diclorometano procedente de las raíces de *Thevetia ahouia* demuestra tener mayor contenido de cardiotónicos expresados en miligramos y en términos del estándar digoxina, recordemos que a estos datos se les aplico un intervalo de confianza del 95% por lo que su rango de confianza es muy ajustado y proyecta resultados muy confiables.

Es importante observar en cuanto a los pesos de las fracciones (pesos de residuos totales) estos difieren, notándose un mayor rendimiento en las fracciones de diclorometano que en la fracción de acetato de etilo que presento un peso de 2.3265 g, coincidiendo con el menor peso de muestra (14.50 g), comparado con el peso de muestra de las fracciones de diclorometano tanto de raíces como de flores de *Thevetia ahouia*.

Cuadro N° 10. Porcentaje de glicósidos cardiotónicos de cada fracción.

Fracción N°	Tipo de muestra	Peso de la fracción (g)	Glicósidos Cardiotónicos (%)
Ta-1	Flor de <i>T. ahouia</i> en AcOET	2.3265	44.33
Ta-2	Raíz de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	3.6661	41.65
Ta-3	Flor de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	4.1548	40.83

La *Thevetia ahouia* así como otras especies de este género poseen un elevado porcentaje de glicósidos cardiotónicos presentes en sus diferentes órganos, tal es el caso de la *Thevetia peruviana* (Chilca) (12).

Podemos observar como las fracciones procedentes de flores y raíces de ***Thevetia ahouia*** tiene un buen porcentaje de cardiotónicos (entre 40% y 50%) considerando que los pesos de fracción no son tan elevados y rondan entre los 2 y un poco mas de 4 gramos por fracción. Por ejemplo la fracción correspondiente a acetato de etilo de las flores poseen un elevado contenido de glicósidos cardiotónicos considerando su peso de fracción (2.3265 g) lo cual comprueba que ésta especie es una potencial fuente de glicósidos cardiacos. Al igual que la primera fracción en estudio las otras dos también muestran un elevado porcentaje de metabolito en estudio según se muestra en el cuadro 9.

Cuadro N° 11. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en flor y corteza de raíz de ***Thevetia ahouia***, en base a material vegetal seco.

Especie	Parte de la planta	Peso del material vegetal	Contenido de glicósidos cardiotónicos totales, expresados como digoxina	Porcentaje (%)
<i>Thevetia ahouia</i>	Flor	108.9g	4.73g	4.35
	Raíz	190.2g	5.37g	2.83
	Epicarpo ^a	57.8g	2.33 g	4.03
	Semilla ^a	200.3 g	5.73 g	2.86

- a. Contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en epicarpo y semilla de ***Thevetia ahouia*** según trabajo de investigación. Campos Paniagua, A. 2009. Determinación de la actividad anticancerígena *in Vitro* de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de ***Thevetia ahouia***(Cojón de costa de hojas largas) (12).

En la recolección del material vegetal el problema que se presentó fue la poca disponibilidad de algunos órganos de la planta como es el caso de las flores y raíces, por motivos varios (época del año, muestreo y baja disponibilidad de las especies en el área de San Salvador, etc.); especialmente con las flores de ***Stemmadenia donnell-smithii*** y ***Thevetia ahouia*** no tanto así para la ***Plumeria rubra***, esto provocó que se obtuviera menor cantidad de muestras de la que se tenía previsto en la planificación del trabajo de investigación, lo cual, a su vez, provocó que contáramos con una menor cantidad de extracto, sobre todo en las flores de las especies.

Los resultados obtenidos durante la determinación de glicósidos cardiotónicos expresados como digoxina, indican una presencia considerable de glicósidos cardiotónicos dentro de cada una de las fracciones y por tanto un porcentaje significativo en las flores y raíces como del epicarpo y semilla de ***Thevetia ahouia***.

Observando el cuadro N° 10, y realizando una comparación de los datos de porcentajes y contenidos de glicósidos cardiacos presentes en los diferentes órganos de la planta demuestran que las flores y el epicarpo poseen los mayores contenidos de glicósidos expresados como digoxina comparados con las raíces y las semillas las cuales también contienen alta cantidad de cardiotónicos; pero aun así no se observa una diferencia muy significativa entre sus porcentajes que varía entre 2.8% y 4.4%; ya que se considera que un porcentaje mayor de 0.5 de metabolitos contenidos en un determinado órgano de la planta es alto (12).

De las flores y raíces de ***Thevetia ahouia***, se lograron obtener las fracciones n-Hexánicas, diclorometánicas y de acetato de etilo presentando mayor rendimiento los extractos con acetato de etilo.

Este solvente extrajo la mayoría de los compuestos presentes en el material vegetal, por lo que estos compuestos son de naturaleza polar.

Ninguno de los tres solventes es mejor que el otro simplemente son complementarios ya que cada uno de ellos posee características de extracción diferentes, así tenemos que el *n*-hexano extrae clorofila y grasas, en cambio el acetato de etilo y el diclorometano extraen componentes polares afines a ellos.

En nuestro caso de las fracciones obtenidas, la que presentaron mayor porcentaje de glicósidos cardiotónicos fueron las procedentes de las fracciones de flores de ***Thevetia ahouia*** tanto en acetato de etilo (44.33%) como en diclorometano (41.65%).

De igual manera en el contenido total de glicósidos cardiotónicos, a partir del material seco, se obtuvo en mayor porcentaje en las flores de ***Thevetia ahouia*** que de las raíces.

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.

5.5 RESULTADO DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA *in vitro*.

Cuadro N° 12. Resultado de la actividad citotóxica *in vitro* en cada unas de las fracciones ensayadas.

Nº	Código	Fracción	HeLa IC ₅₀ (µg/mL)	A-549 IC ₅₀ (µg/mL)	MCF-7 IC ₅₀ (µg/mL)	Vero-7* IC ₅₀ (µg/mL)
1	Ta-1	Flores de <i>T. ahouia</i> en AcOEt	>50	>50	>50	>50
2	Ta-2	Raíz de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.37	0.06	0.16	0.26
3	Ta-3	Flores de <i>T. ahouia</i> en CH ₂ Cl ₂	0.13	0.14	0.31	0.55
G.C.**	St 1	Digoxina	0.50	0.53	0.27	0.18
G.C.**	St 2	Digitoxigenina	0.13	0.05	0.12	0.19
Control Positivo	C.P.	Mercaptopurina	0.50	8.00	0.24	11.50

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

** **G.C.:** Glicósido cardiotónico.

IC₅₀: Porcentaje de viabilidad.

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

HeLa: Carcinoma de cuello uterino.

A-549: Cáncer humano de pulmón.

MCP-7: Adenocarcinoma humano de mama.

Una sustancia es activa cuando a una concentración determinada es capaz de inhibir el 50% del crecimiento de las células cancerígenas y ésta es menor a la concentración utilizada por el control positivo para lograr el mismo efecto; además de considerarse la toxicidad causada en las células Vero, la cual debe de ser media a baja para considerar la sustancia como un agente citotóxico efectivo.

Se considera una toxicidad media a baja si la sustancia ensayada utiliza concentraciones altas o mayores para inhibir el crecimiento de un 50% de células buenas respecto a la concentración utilizada para inhibir el 50% de crecimiento de las células infectadas.

Según el cuadro No. 11, la fracción Ta-1 (Flores de *T. ahouia* en AcOEt) resultó tener una muy baja toxicidad (no posee actividad) frente a las 3 líneas celulares con un valor de $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ lo cual es desfavorable, al mismo tiempo es inofensiva para las células normales. En cuanto a la fracción Ta-2 (Raíces de *T. ahouia* en CH_2Cl_2) se demostró tener una alta toxicidad frente a las 3 líneas celulares cancerígenas, especialmente contra al cáncer humano de pulmón (A-549), ya que la concentración para inhibir el 50% de células infectadas es mucho menor a la concentración de la Mercaptopurina utilizada como control positivo. La fracción denominada Ta-2 obtuvo resultados muy parecidos a la fracción Ta-3 (Flores de *T. ahouia* en CH_2Cl_2) ya que su actividad citotóxica fue muy alentadora frente a las líneas celulares cancerígenas pero ambas fracciones resultaron ser demasiado tóxicas para las células vero.

En conclusión las fracciones Ta-2 y Ta-3 mostraron actividad frente el carcinoma humano de cuello uterino (HeLa) con valores de IC_{50} de 0.37 y 0.13 respectivamente. En cuanto al adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) solo la fracción Ta-2 (Raíces de *T. ahouia* en CH_2Cl_2) presento actividad significativa. Sin embargo, frente a las células Vero ambas fracciones mostraron una muy alta toxicidad convirtiéndose éstas en sustancias muy poco viables para un posterior estudio como agentes anticancerígenos, frente a estas líneas celulares (2).

CAPITULO IV
CONCLUSIONES.

6.0 CONCLUSIONES.

1. Por cromatografía de capa fina se demostró la ausencia de glicósidos cardiotónicos en las fracciones ***Plumeria rubra*** y ***Stemmadenia donnell-smithii***. Fue positiva la presencia glicósidos cardiotónicos en las fracciones de Flor de ***T. ahouia*** en AcOET, Raíz de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂ y Flor de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂ en forma de glicósidos ($R_f < 0.6$), es decir valores de 0.44-0.54 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.
2. El análisis Ultravioleta demostró que las fracciones de Flor de ***T. ahouia*** en AcOET, Raíz de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂ y Flor de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂, presentaron un máximo de absorbancia entre 200 a 300 nm que al ser comparadas con los testigos (digoxina y digitoxigenina) nos indican la presencia de la lactona α,β -insaturada típica de los glicosidos cardiotónicos.
3. El análisis Infrarrojo identificó a los glicósidos cardiotónicos en las fracciones de Flor de ***T. ahouia*** en AcOET, Raíz de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂ y Flor de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂, ya que los espectros presentaron bandas características similares a los testigos utilizados (digoxina y digitoxigenina).
4. La presencia de glicosidos cardiotónicos se comprobó por las bandas características representadas en el espectro infrarrojo y máximos de absorbancia en ultravioleta practicadas en las 3 fracciones en estudio; descartando así a la ***Plumeria rubra*** y ***Stemmadenia donnell-smithii*** como fuente de estos metabolitos y comprobando que no todas las especies de la familia Apocinaceae presentan glicósidos cardiotónicos.

5. Se comprobó mediante los resultados obtenidos que el proceso de molido del material seco permitió obtener un tamaño de partícula que favoreció a la extracción de los metabolitos utilizando 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 las flores de ***T. ahouia***.
7. De acuerdo al análisis citotóxico las 3 fracciones (Flor de ***T. ahouia*** en AcOET, Raíz de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂ y Flor de ***T. ahouia*** en CH₂Cl₂); mostraron una muy alta toxicidad frente a las células Vero convirtiéndose éstas en sustancias muy poco viables para un posterior estudio como agentes anticancerígenos, frente a estas líneas celulares.
8. Se realizó una comparación del contenido y porcentaje de glicósidos cardiotónicos en flores, corteza de raíz, epicarpo y semilla de ***Thevetia ahouia***, en base a material vegetal seco; demostrando mayor porcentaje de estos heterósidos cardíacos en flores y epicarpo, siendo estos últimos una fuente importante de estos metabolitos.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar aislamiento y elucidaciones estructurales de los glicósidos cardiotónicos presentes en la fracciones, ya que es factible en futuras investigaciones incrementar su rendimiento o efectuar cambios químicos a la molécula que se traduce en cambios de actividad biológica, mediante un correcto suministro de dichos precursores a la planta *in vivo* o *in vitro*.
2. Recolectar el material vegetal que se someterá a análisis (según la fenología de la especie) entre los meses de Abril a Octubre ya que en esta época del año los órganos a estudiar son más abundantes.
3. Profundizar en la búsqueda de especies vegetales ricas en glicósidos cardiotónicos, que sean más potentes como agentes citotóxicos, para emplearlas en un futuro como fitofármacos estandarizados.
4. Secar el material vegetal antes de molerlo ya que se evita el riesgo de contaminación por hongos por causa de la humedad del ambiente.
5. Eliminar el agua de las fracciones obtenidas mediante el uso de sulfato de sodio anhidro ya que la presencia de esta interfiere en los análisis espectroscópicos.
6. Estudiar la polaridad del extracto y utilizar un disolvente a fin con la muestra, como el alcohol etílico y este se prefiere con un grado de pureza absoluto para así poder eliminar posibles interferencias en los equipos utilizados en los análisis espectroscópicos.
7. Realizar futuras investigaciones respecto al mecanismo y la citotoxicidad de glicósidos cardiotónicos presentes en otros órganos de la especie en estudio.

BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alison D, Keith I, Ramirez A, Yang, Peiyong, Pawlus, **et al.** Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. *Molecular interventions*. 2008; 8 (1):37-47.
2. Arencebia D, Curveco L, Rosario L. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de toxicología en línea*. 2003; 9(1):40-50
3. Aristizabal G, Escobar L, Fabio A, Rivera A. Estudios comparativos de los métodos de resazurina y MMT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *scientific electronic library online*. 2010; 17(1):67-74
4. Archer E, Dean C, Witsberger D.1982. Árboles del parque Deininger.1ª ed.Dirección de publicaciones del ministerio de educación. El Salvador; 1982. p.284-287.
5. Barros D, Carretero J, Jiménez A. Cáncer del pulmón, factores de riesgo. *Investigación y Ciencia*. 2004; 37:25-30.
6. Brandan N, Juaristi J, Aguirre V, Romero B. Oncogenes y genes supresores de tumores. Universidad Nacional de nordeste.Argentina.2002; p 10-12.Disponible en:

<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/oncogenes.pdf> [Consultado el 14.5.2010]
7. Bonilla G. Estadística I “Elementos de estadísticas descriptivas y probabilidad”. 5ª ed. San Salvador, El Salvador. UCA editores; 1998. p. 299-315.

8. Bruneton J. Farmaconosia."Fitoquímica y plantas medicinales".2ª ed. Zaragoza, España: Acribia; 2001. p.723.
9. Chang F, Huang H Roy M. Cytotoxic Principles from the Formosan Milkweed, ***Asclepias curassavica***. Journal Natural Products.2005; 68:1494-1499.
10. Ciccio A, Castro A. Fisalieno, colorante de los frutos maduros de plantas del género ***Stemmadenia***. Revista Latinoamericana de Química.1984; 15 (1): 24-25.
11. Contreras A, Elías S, Llanque C. Carcinoma de mama. Peceña, Med Farm. 2008; 5(7):4-23.
12. Campos Paniagua A. 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) de la Familia Apocináceas. El salvador, Universidad de El Salvador. 2009. p. 27-29, 39-43, 47-48, 50-52 y 59-68.
13. Celsi S. "Química orgánica elemental moderna". 16ª ed. Buenos aires, Argentina: Kapeluzz; 1964. p. 22-32.
14. Collera O, Garcia A, Herran F, Perezamado J. Sandoval F. Alkaloids from ***Stemmadenia donnell-smithii*** species. Journal language unavailable. 1962; 14:3-18.
15. Cardellina L, Decosterd L. Gordon M, Gustafson T, Johnson H, Kirk R, **et al.** The differential cytotoxicity of cardenolides from ***Thevetia ahouia***. Journal the Phytotherapy Research.1994; 8(2):74 – 77.

16. Castro V, Endo H, Noro T, Mora G, Poveda L, Warashina T, **et al.** Cardenolide glycosides from ***Thevetia ahouia*** (LINN.) A.DC. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1997; 45(9):1536-1538.
17. Cole R, Jolad S, Hoffmann J. 3'-O-Methylevomonoside: a new Cytotoxic Cardiac Glycoside from ***Thevetia ahouia***. A.DC (Apocynaceae). Journal of Organic Chemistry. 1981; 46(9):1946-7.
18. Cheenpracha S, Chantrapromma S, Chantrapromma K, Karalai C, Lophookhieo S, Ponglimanont C, **et al.** Cytotoxic glycoside from the seed of ***Cerbera odollam***. Phytochemistry. 2004; 65:507-510.
19. Eleftherios P, Prassas I. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. Nature Reviews Drug Discovery. 2008; 7:926-935.
20. Evans W, Trease, G. "Tratado de Farmacognosia". 12^a ed. Interamericana: México; 1988. p. 514-518.
21. Franco J, Pérez H, Plaza P. Changes in lung-cancer mortality trends in Spain. Int J Cancer. 2002; 97(1):102-5
22. Farmacopea Ufficiale del la República Italian. 8^a ed. Roma, Italia. Instituto Poligrafico del Stato: 1972; p. 390-393.
23. Guo D, Lixin L, Ping L, Ye M, Zhong L. Cytotoxic Resibufogenin Transformation Products from Cell Suspension Cultures of ***Platycodon Grandiflorum***. Letters in Organic Chemistry. 2004; 1:176 -178.

24. Hiroshi S, Yoshihiro M, Yutaka S, Watanabe K. Bufadienolide and Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*. Journal Natural Products. 2003; 66(2): 36-241.
25. Hernández M. Oncogenes y cáncer. Cubana Oncol. 1999; 15 (2):9-131.
26. Ishibashi M, Koyano T, Kowithayakorn T, Miyagawa T, Ohtsuki T. Cardenolide Glycosides of *Thevetia peruviana* and Triterpenoid Saponins of *Sapindus emarginatus* as TRAIL Resistance-Overcoming Compounds. Journal of Natural Products. 2009; 72(9):1507-1511.
27. Kuklinski C. Farmacognosia “Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 2ª ed. Barcelona, España. Omega. 2000; p. 154-160.
28. López M, Ramírez G, Hernández I. “Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas”. Universidad de las palmas de gran canaria, España: 2005; p. 21-22 y 27-28.
29. MSPAS (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, El Salvador) Dirección de Vigilancia Sanitaria, Unidad de Estadística e Información en Salud. 2010
30. Morales F. Estudios en las Apocynaceae neotropicales XXVII: Familia Apocynaceae (Apocinácea, Rauvolfioideae) de El Salvador, Centroamérica. Darwiniana. 2006; 44(2):284 y 48.

31. Pinzón M, Contreras M, Martínez S, Hernández R, Huesca G. Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital. 2009.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>.
[Consultado el 12.5.2010]
32. Rubinson F, Rubinson D. "Química analítica contemporánea". 1ª ed. México: Prentice Hall Hispano América; 2000.p. 356-360.
33. Sánchez, S. Cáncer pulmonar. Fac Med UNAM. 2004; 47(3):100-112.
34. Siddiqui B, Begum S, Faizi S, Naeed A, Ghiasuddin A, Usmani S, **et al.** Chemical constituents of leaves and ítem bark of ***Plumeria obtusa***. *Phytochemistry*. 2004; 65(14): 2077-2084.
35. Winnicka k, Krzysztof B, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2006; 63 (2):109-115.

GLOSARIO

GLOSARIO (1, 6, 13, 17, 25, 27).

- Concentración inhibitoria media (CI_{50}): es una medida de la eficacia de un compuesto en inhibir la función biológica o bioquímica. Esta medida cuantitativa indica cuánto de la droga particular o de la otra sustancia (inhibidor) es necesario para inhibir un proceso biológico dado (o el componente de un proceso, es decir: enzimas, células y receptor de la célula o microorganismos) en un 50%.
- División celular caótica: termino que hace referencia a la multiplicación y/o proliferación anormal y sin control de las células cancerígenas por una alteración genética de la mitosis, las células se dividen veloz e indefinidamente.
- Dosis efectiva media (DE_{50}): término que se refiere a la dosis mínima capaz de producir el efecto deseado de la droga o de una determinada sustancia en el 50% de la población en estudio y se conoce como *dosis efectiva 50%*.
- Efecto inótrupo positivo: término que se refiere a la capacidad contráctil del corazón en la cual se dice que el musculo cardiaco presenta una mayor fuerza de contracción en las miofibrillas musculares cardiacas de lo normal.
- Especies ROS: se refiere a tipos o especies celulares reactivas ante la presencia de oxigeno los cuales se relacionan con las lesiones o daños a la membrana mitocondrial.
- Espectroscopía: termino general empleado para describir técnicas que se basan en la medición de absorción, emisión, o fluorescencia de la radiación electromagnética.
- Factor FGF-2: termino que se refiere al factor de crecimiento de fibroblastos de tipo 2 el cual se encarga del transporte extracelular de otros factores de crecimiento tumoral.

- Factor NF- $\kappa\beta$: término que designa al factor nuclear encargado de la transcripción de información genética celular utilizando los receptores proteínicos kappa y beta.
- Factor TNF: termino que se refiere al factor de necrosis tumoral el cual es un mediador celular que induce a la apoptosis por medio de la necrosis en los tejidos tumorales.
- Factor TNF/NF- $\kappa\beta$: factor de necrosis tumoral relacionado directamente con el factor nuclear de los receptores κ y β el cual interviene directamente en el proceso de la muerte de dominio celular.
- 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.
- Metástasis: proceso que se refiere al pasaje de células cancerosas del lugar original de proliferación a otro con el que no esta en contacto directo.
- Proteínas Akt: es una familia de proteínas, en humanos existen 3 genes de la familia Akt: Akt1, Akt2 y Akt3, también llamadas proteína quinasa B (PKB), las cuales juegan un importante rol en la señalización celular en mamíferos. La Akt1 está involucrada en la sobrevivida celular y en la inhibición de procesos apoptóticos, así mismo se encarga de inducir la vía de síntesis de proteínas y

además es clave en la vía que guía a la hipertrofia de musculo esquelético (crecimiento de tejido). También la Akt1 está implicada como principal factor de muchos tipos de cáncer.

- Proteínas Bcl-XL y Bcl-2: tipo de proteínas que son de naturaleza anti-apoptóticas las cuales contribuyen al proceso de formación tumoral y quística e intervienen en el grado del potencial de membrana mitocondrial.

- Proteína Src: termino que se refiere a la proteína tirosina quinasa la cual se encarga de la recepción de mensajes provenientes de los complejos de señalización intracelular hacia orgánulos celulares para su activación.

- Proteína TRAIL: termino que se refiere a un complejo proteico denominado ligando de muerte relacionado con la familia de TNF que es capaz de inducir apoptosis en células tumorales con una toxicidad mínima sobre las células normales.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): conocida por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original o molde. Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad virus o bacterias causantes de una determinada enfermedad, identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.

- Receptores DR4 y DR5: tipos de receptores proteicos conocidos como receptores de muerte celular los cuales son encargados de aumentar la superficie de la célula tumoral haciéndola mas susceptible a la apoptosis.

- Receptor EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico el cual puede generar una transactivación o inhibición del mismo por señal de la proteína Src.
- Receptores FXD: familia de proteínas transmembranales cuyas siglas representan una secuencia común altamente conservada, y participa de la regulación de los canales iónicos y de las proteínas de transporte, como la subunidad y de la Na⁺/K⁺ATPasa. Esta familia proteica incluye al factor inducido por hormonas corticoesteroides (CHF), el cual es una proteína que se expresa en la membrana basolateral de las células epiteliales del colon distal y de los nefrones.
- Receptores IL8: especie proteica que se encuentra en los tejidos pulmonares los cuales modulan la alteración de fluidez de la membrana plasmática y son encargados de la producción quística bronquio pulmonar generada por una marcada fibrosis.
- Receptor TRADD: tipo de receptor celular ligando del factor de necrosis tumoral tipo 1, asociado a la muerte de dominio a la membrana celular o apoptosis por inhibición de la unión de este con el factor TNF/NF- κ B.
- Vía MAPK: La vía de quinasas activada por mitógenos es una ruta de transducción de señal de células de eucariotas que se sitúa aguas abajo de receptores tirosín cinasas así como la mayoría de receptores para citocina.

ANEXOS

Anexo 1

Documento de identificación de especies en estudio sección técnica científica del jardín botánico La Laguna

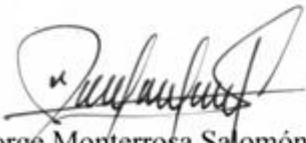
Antiguo Cuscatlán, martes 6 de julio de 2010

A quien interese,

Por este medio hago constar que los alumnos Jimmy Honles y Carlos Alberto Abrego se hicieron presentes en las instalaciones del herbario de nuestra institución solicitando la identificación de tres muestras botánicas.

Después de revisar el material y comparar con la colección de referencia, las muestras corresponden a las especies *Thevetia ahouai*, *Stemmadenia donnell-smithii* y *Plumeria rubra*, todas pertenecientes a la familia Apocynaceae.

Y para los usos que los interesados estimen convenientes, se extiende la presente nota.


Jorge Monterrosa Salomón
Jardín Botánico La Laguna
Sección Técnica Científica
Herbario LAGU
Curador

