



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización preliminar de las fracciones del extracto metanólico de las hojas de la especie cf. *Aspidosperma excelsum* con actividad anticancerígena

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: STEVEN ALEXANDER LOJA OJEDA

TUTOR: PhD. JAN SPENGLER

CO-TUTOR: PhD. PABLO ANDRÉS CISNEROS

Napo-Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 16 de mayo de 2023

Yo, Steven Alexander Loja Ojeda con documento de identidad N°0923665657, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,



Steven Alexander Loja Ojeda

0923665657

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Steven Alexander Loja Ojeda con documento de identidad N° 0923665657, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Caracterización preliminar de las fracciones del extracto metanólico de las hojas de la especie *cf. Aspidosperma excelsum* con actividad anticancerígena”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 16 de mayo de 2023



Steven Alexander Loja Ojeda

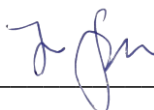
0923665657

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización preliminar de las fracciones del extracto metanólico de las hojas de la especie *cf. Aspidosperma excelsum* con actividad anticancerígena”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Steven Alexander Loja Ojeda, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 16 de mayo de 2023



Jan Spengler

C.I: 1757762099



Firmado electrónicamente por:

**PABLO ANDRES
CISNEROS PEREZ**

Pablo Andrés Cisneros

C.I: 1003237177

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por este gran logro. Así como, el gran apoyo brindado por parte de mis amados padres, familia y amigos. A mis tutores, Pablo Cisneros y Jan Spengler por sus grandes consejos y apoyo a lo largo de este presente trabajo. Agradecer, a una gran amiga, colega y técnica de laboratorio como lo es Roxana Llive, la cual me guio y me ayudó a fortalecer mis conocimientos técnicos dentro de laboratorio. A Joel Medina en el Laboratorio de Productos Naturales de Ikiam en el manejo del equipo GC-MS y a la Doctora Natalia Bailón de la UTPL por su valiosa contribución y enseñanza en los ensayos celulares realizados.

De igual forma, a mis amigos y grandes seres humanos que se convirtieron en mi familia Ikiam en este trayecto universitario, como lo son Belén Benites, Samy Roldan, Andrea Cedeño, Mikaela Jiménez y grandes colegas de carrera como Yanileth López, Belén Macas, Dayana Torres y Andrea Cuenca.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Cáncer: Generalidades	1
1.1.2. Bioprospección y extracción	1
1.1.3. Técnicas cromatográficas: Cromatografía de Capa Fina (CCF) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	2
1.1.4. Biodiversidad de Ecuador	2
1.1.5. Familia Apocynaceae.....	3
1.1.6. Usos e importancia	3
1.1.7. <i>Aspidosperma excelsum</i> : Usos populares	4
1.2. Metabolitos secundarios	4
1.2.1. Compuestos fenólicos.....	4
1.2.2. Alcaloides	5
1.2.3. Cardenólidos.....	6
1.3. Enfoque preliminar de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	7
1.4. Planteamiento del problema a investigar.....	7
1.5. Justificación de la investigación.....	8
1.6. Objetivos de la investigación	8
1.6.1. Objetivo General.....	8
1.6.2. Objetivos Específicos.....	9
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	9
2.1. Preparación del extracto primario de metanol.....	9
2.2. Fraccionamiento del extracto primario de metanol mediante extracción líquido-líquido usando solventes de polaridad creciente.....	9
2.3. Extracción Soxhlet de Cloroformo para extracción de alcaloides.....	10
2.4. Tamizaje Fitoquímico de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	10
2.4.1. Determinación cualitativa de fenoles	10
2.4.2. Determinación cualitativa de flavonoides	11
2.4.3. Determinación cualitativa de alcaloides.....	11
2.4.4. Determinación cualitativa de terpenoides.....	11
2.4.5. Determinación cualitativa de glucósidos cardiacos y cardenólidos.....	11
2.5. Determinación cuantitativa de fenoles por espectrofotometría UV-Vis.....	12
2.6. Determinación cuantitativa de flavonoides por espectrofotometría UV-Vis.....	12

2.7.	Determinación cuantitativa de alcaloides por espectrofotometría UV-Vis.....	13
2.8.	Determinación cuantitativa de cardenólidos del extracto primario de metanol por espectrofotometría UV-Vis	14
2.9.	Cromatografía de capa fina (CCF) de los diferentes extractos.....	14
2.10.	Extracción de alcaloides para análisis por GC-MS	15
2.11.	Análisis de GC-MS para identificar potenciales compuestos anticancerígenos presentes en el extracto alcaloideo.....	15
2.12.	Procedimiento de cultivo celular	16
2.13.	Análisis de viabilidad celular mediante ensayo MTS.....	16
CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN		16
3.1.	Tamizaje Fitoquímico de extractos de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	16
3.2.	Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Alcaloides de extractos de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i> por espectrofotometría UV-Vis.....	18
3.3.	Cuantificación de Cardenólidos del extracto metanólico primario de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i> por espectrofotometría UV-Vis.....	20
3.4.	Cromatografía de Capa Fina (CCF) de los diferentes extractos.....	22
3.5.	Efectos de los diferentes extractos de las hojas de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i> sobre la viabilidad celular	25
3.6.	Identificación preliminar de potenciales compuestos presentes en el extracto alcaloideo por GC-MS	28
CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de alcaloides con base en su aminoácido precursor y su distribución en el reino Plantae	5
Tabla 2. Metabolitos detectados en el tamizaje fitoquímico de extractos de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	17
Tabla 3. Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Alcaloides por espectrofotometría UV-Vis de extractos de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	19
Tabla 4. Cuantificación de cardenólidos por espectrofotometría UV-Vis del extracto metanólico primario de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	21
Tabla 5. Parámetros para la curva de calibración de cardenólidos por espectrofotometría UV-Vis utilizando 2(5H)-Furanona como estándar	21
Tabla 6. Placas de cromatografía de capa fina realizadas a los diferentes extractos (5,0 mg/mL)	23
Tabla 7. Identificación por GC-MS de compuestos en el extracto alcaloideo de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i>	29

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química base de Flavonoides y Fenol	4
Figura 2. Estructura química base de cardenólidos.....	6
Figura 3. Estructuras que forman parte de un alcaloide indólico	20
Figura 4. Efectos citotóxicos de los diferentes extractos de <i>cf. Aspidosperma excelsum</i> mediante el ensayo de MTS.....	26
Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos preliminarmente identificados por GC-MS.	32

RESUMEN

Recientemente se ha demostrado que el extracto metanólico de las hojas de *cf. Aspidosperma excelsum* (Familia: Apocynaceae) presenta una potente actividad anticancerígena en las líneas celulares humanas HeLa y D-384 pudiendo ser atribuida a un efecto aditivo o sinérgico entre cardenólidos con otros metabolitos secundarios potenciales reportados en Apocynaceae. Se conoce que las especies de esta familia son ricas en terpenoides, compuestos fenólicos y en especial alcaloides. El presente trabajo profundiza en un análisis fitoquímico cualitativo y cuantitativo del extracto metanólico y fracciones (Fr. Butanol, Fr. Acetato de etilo y Fr. Hexano) provenientes del mismo. Además de, determinar su actividad citotóxica en las líneas celulares humana, MCF-7 y PNT2. Se caracterizó de forma preliminar metabolitos responsables de la actividad anticancerígena presentada en las líneas celulares humana evaluadas. El extracto metanólico sobresalió de manera significativa en la cuantificación tanto de fenoles, flavonoides y alcaloides. Sin embargo, las fracciones de Acetato de etilo y Hexano presentaron la mayor cantidad de compuestos polifenólicos (fenoles-flavonoides) y alcaloides, respectivamente. Se pudo encontrar y caracterizar de manera preliminar metabolitos prometedores tales como 8-Hidroxicarvotanacetona, Fitol, Clionasterol y Lupeol, los cuales han sido reportados en la literatura como prometedores agentes anticancerígenos en distintas líneas celulares humanas. Cabe destacar que el Fitol sobresale entre los mencionados por presentar una elevada citotoxicidad frente a MCF-7 específicamente, línea celular humana en la que el extracto alcaloideo fue evaluado en esta investigación. Además, entre todos los extractos obtenidos, el extracto de cloroformo se presentó como el más prometedor por haber revelado actividad citotóxica frente a las MCF-7 y PNT2. A partir de los resultados obtenidos se puede apreciar la diversidad de compuestos con potencial anticancerígeno presentes en *cf. Aspidosperma excelsum* destacando así, la importancia de realizar estudios fitoquímicos bioguiados orientados a buscar o confirmar principios bioactivos.

Palabras claves: Apocynaceae, *Aspidosperma excelsum*, análisis fitoquímico, metabolitos secundarios, actividad anticancerígena.

ABSTRACT

Recently it has been demonstrated that the methanolic extract of the leaves of *cf. Aspidosperma excelsum* (Family: Apocynaceae) shows a potent anticancer activity in human cell lines HeLa and D-384, which could be attributed to an additive or synergistic effect between cardenolides with other potential secondary metabolites reported in Apocynaceae. It is known that the species of this family are rich in terpenoids, phenolic compounds and especially alkaloids. The present work delves into a qualitative and quantitative phytochemical analysis of the methanolic extract and fractions (Fr. Butanol, Fr. Ethyl acetate and Fr. Hexane) from it. In addition, their cytotoxic activity was determined in human cell lines MCF-7 and PNT2. The metabolites responsible for the anticancer activity presented in the human cell lines evaluated were preliminarily characterized. The methanolic extract excelled significantly in the quantification of phenols, flavonoids and alkaloids. However, the Ethyl acetate and Hexane fractions presented the highest amount of polyphenolic compounds (phenol-flavonoids) and alkaloids, respectively. Promising metabolites such as 8-Hydroxycarvotanacetone, Phytol, Clionasterol and Lupeol, which have been reported in the literature as promising anticancer agents in different human cell lines, were found and preliminarily characterized. It should be noted that Phytol stands out among those mentioned for presenting high cytotoxicity against MCF-7 specifically, the human cell line in which the alkaloid extract was evaluated in this research. In addition, among all the extracts obtained, the chloroform extract presented itself as the most promising for having revealed cytotoxic activity against MCF-7 and PNT2. From the results obtained, the diversity of compounds with anticancer potential present in *cf. Aspidosperma excelsum* can be appreciated, thus highlighting the importance of carrying out bioguided phytochemical studies aimed at searching for or confirming bioactive principles.

Keywords: Apocynaceae, *Aspidosperma excelsum*, phytochemical analysis, secondary metabolites, anticancer activity.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1 Cáncer: Generalidades

El cáncer es una enfermedad metabólica heterogénea y multifactorial [1]. Está asociado con fuentes internas tales como funciones celulares reducidas o perdidas; apoptosis, estrés oxidativo, mutaciones e hipoxia, o emergentes de orígenes externos catalogados como exposición prolongada a radiación, rayos ultravioleta, contaminación, además de tabaquismo y estrés [1].

Es la principal causa de mortalidad en países desarrollados y ocupa el segundo lugar en países en vías de desarrollo [2]. Por lo general se detecta en etapas avanzadas donde es casi imposible aplicar un tratamiento efectivo [3]. Como tratamientos para contrarrestar esta enfermedad se han empleado la radioterapia y la quimioterapia [2]. El problema de estas terapias son los efectos secundarios causados. Por ejemplo, los fármacos usados en quimioterapia presentan una toxicidad elevada. De igual manera, al ser tratamientos no específicos, se vuelve de suma importancia buscar nuevas fuentes de medicamentos que muestren una mayor especificidad frente a las células cancerosas, mayor eficacia y menos efectos secundarios [2,3].

1.1.2. Bioprospección y extracción

Durante las últimas décadas, se ha practicado la bioprospección, que implica "la búsqueda sistemática de compuestos naturales, diseños genéticos y organismos completos en la vida silvestre con potencial para el desarrollo de productos" [4]. Siendo de interés, los dirigidos hacia fases primarias del proceso bioprospectivo como la identificación y caracterización de principios que se podrían considerar bioactivos (actividad antiparasitaria, antiinflamatoria, antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antitumoral y citotóxica) [4].

Sólo es posible llevar a cabo la separación, identificación y caracterización de los compuestos bioactivos tras un proceso de extracción adecuado [5]. Entre estos, destacan la extracción Soxhlet y la extracción líquido-líquido, que son métodos de fácil

acceso y que se utilizan en etapas preliminares de bioprospección. Posteriormente, se utilizan métodos más avanzados con la finalidad de enriquecer el extracto en uno o más metabolitos de interés [6,7]. La extracción Soxhlet es un método de extracción clásico para aislar un compuesto o un grupo determinado de compuestos en función de la polaridad del disolvente empleado [6]. Por otro lado, la extracción líquido-líquido es un método de fraccionamiento grueso basado en las diferencias de los coeficientes de reparto de los metabolitos extraídos entre dos líquidos inmiscibles (uno polar y otro apolar) [7].

1.1.3. Técnicas cromatográficas: Cromatografía de Capa Fina (CCF) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía es una técnica de separación basada en la diferencia de afinidad entre los componentes de una mezcla en dos fases inmiscibles, una fase estacionaria y una fase móvil [8]. Se utilizan ampliamente en química orgánica, para aislar y purificar productos [9].

La cromatografía de capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, utilizada para separar mezclas no volátiles. Siendo su principio básico de adsorción se fundamenta en la separación según la polaridad de los compuestos [10].

Por otro lado, la cromatografía de gases se caracteriza por tener alta capacidad de separación, sensibilidad y selectividad en el análisis de compuestos volátiles. Dicho cromatógrafo de gases puede estar acoplado a un espectrómetro de masas para la identificación de los compuestos. Sin embargo, algunas veces, los compuestos más polares requieren una derivatización química para mejorar su volatilidad y estabilidad térmica [8].

1.1.4. Biodiversidad de Ecuador

En la cuenca amazónica, la biodiversidad de especies y recursos genéticos es la más diversa y compleja del planeta [11]. Alrededor de 3000 especies de plantas útiles para distintos fines han sido clasificadas, muchas de ellas con potenciales propiedades farmacológicas, entre otras. Sin embargo, de la biodiversidad amazónica ecuatoriana aún falta mucho por conocer [11]. Así pues, la naturaleza se presenta como una fuente importante de nuevos prototipos de fármacos, siendo las plantas la principal fuente para

el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades [12]. De hecho, el descubrimiento de varios agentes anticancerígenos eficaces a partir de plantas puede atribuirse, directa o indirectamente, a un historial de uso de la planta relevante en la medicina tradicional [12].

1.1.5. Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae sobresale por ser una de las familias más numerosas del reino vegetal, conformada por 424 géneros y con más de 4 600 especies distribuidas en cinco subfamilias como Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae y Asclepiadoideae [13]. Se caracterizan por ser arbustos, plantas leñosas o herbáceas que contienen látex lechoso [13,14]. Presentan una distribución naturalizada, donde las aves y las actividades humanas han provocado su dispersión en las zonas tropicales, subtropicales y templadas [13].

1.1.6. Usos e importancia

Apocynaceae es una importante fuente de fármacos utilizados en la medicina moderna [15]. Los usos etnomedicinales y el conocimiento tradicional de las plantas Apocynaceae han dado lugar a una amplia evaluación de las propiedades farmacológicas de muchas plantas de esta familia. Se sabe que los extractos crudos, así como los compuestos aislados (oleandrina, ácido gimnémico, vinblastina, lupeol y quebrachamina), poseen una amplia gama de actividades biológicas, tales como: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, hepatoprotector, y anticancerígena [13]. Dichas bioactividades vienen efectuadas por la amplia gama de metabolitos secundarios presentes en las especies de esta familia tales como compuestos fenólicos simples, flavonoides, terpenos, esteroides, glucósidos cardiotónicos (cardenólidos), lignanos y alcaloides donde algunos de estos grupos de metabolitos contribuyen a la actividad anticancerígena [13,16]. Cabe resaltar que la mayoría de las plantas de esta familia son ricas en alcaloides [13]. A pesar de que muchas especies de esta familia son conocidas por su potencial etnomédico, muy pocas de ellas han sido estudiadas sistemáticamente y evaluadas farmacológicamente [13].

1.1.7. *Aspidosperma excelsum*: Usos populares

La especie *Aspidosperma excelsum* tiene un mayor uso popular en el tratamiento de la malaria y enfermedades febriles [15,17]. Además de ser implementado por los nativos del Amazonas como antiinflamatorio, antihipertensivo, anticonceptivo e inclusive para el tratamiento de la diabetes [15].

1.2. Metabolitos secundarios

1.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza por el cual existe un interés creciente en los mismos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desórdenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante [16].

Se caracterizan por la presencia de numerosos anillos fenólicos [18]. Clasificados en dos grandes grupos principales conocidos como flavonoides y no flavonoides [19]. Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir su estructura es del tipo C₆-C₃-C₆, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de tres carbonos ciclada a través de un oxígeno, ver Figura 1 [20,21]. Además, se divide en seis subclases diferentes en donde se encuentran flavonas, flavonoles, flavononas, isoflavonas, flavanos y antocianinas [19,20]. Por otro lado, el grupo de no flavonoides son compuestos más simples que presentan uno o más grupos sustituyentes -OH (hidroxilo) unidos directamente a un anillo aromático [22]. El Fenol (C₆H₆O) es el compuesto más sencillo de este grupo [22], ver Figura 1.

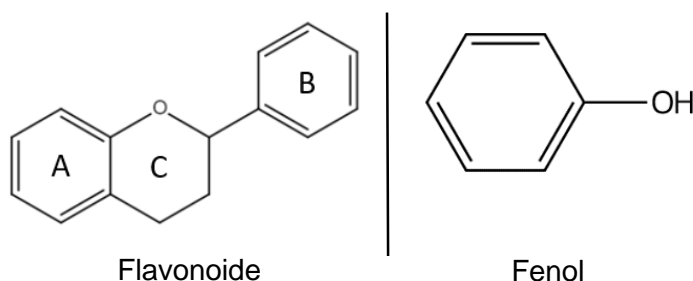


Figura 1. Estructura química base de Flavonoides y Fenol
Fuente: CAS SciFinder

1.2.2. Alcaloides

Los alcaloides son uno de los grupos más amplios y diversos de compuestos secundarios nitrogenados de bajo peso molecular de origen natural derivados de aminoácidos o del proceso de transaminación [23]. En los tejidos vegetales se pueden encontrar como sales hidrosolubles, ésteres o combinados con taninos o azúcares, rara vez se encuentran como bases libres [8]. Son compuestos de gran interés científico debido al potencial farmacológico que poseen. Su actividad biológica es diversa, van desde presentar actividad sobre el sistema nervioso central, disfunción cardiaca hasta presentar actividad como agentes antibióticos, antiinflamatorios, anticancerígenos, entre otros [24]. Además, presentan potencial para la industria alimenticia, cosmética y agrícola [8].

La clasificación más utilizada es con base en su aminoácido precursor que proporciona tanto el átomo de nitrógeno como la porción fundamental del esqueleto del alcaloide. El en caso de la familia Apocynaceae predominan los compuestos derivados del triptófano, ver Tabla 1 [8]. Sobresaliendo como principales metabolitos secundarios presentes en las especies de *Aspidosperma*, los alcaloides indólicos monoterpénicos, de los cuales se han aislado unos 250 y presentan una considerable diversidad estructural [15]. Varios de ellos han mostrado importantes actividades farmacológicas [15].

Tabla 1. Clasificación de alcaloides con base en su aminoácido precursor y su distribución en el reino Plantae

L-Ornitina	L-Tirosina	L-Triptófano	L-Lisina	L-Histidina
☞ Tropano	☞ Feniletilamina	☞ Indol	☞ Quinolizidina	☞ Imidazol
☞ Pirrolidina	☞ Isoquinolinas	☞ Quinolina	☞ Piperidina	
☞ Pirrolizidina	☞ Bencilisoquinolinas	☞ β-Carbolina	☞ Indolizidina	
Familia en la que se han reportado				
☞ Asteraceae	☞ Amaranthaceae	☞ Amaranthaceae	☞ Crassulaceae	☞ Cactaceae
☞ Boraginaceae	☞ Amaryllidaceae	☞ Asteraceae	☞ Fabaceae	☞ Rutaceae
☞ Capparidaceae	☞ Berberidaceae	☞ Apocynaceae	☞ Piperaceae	
☞ Erythroxylaceae	☞ Cactaceae	☞ Convolvulaceae	☞ Punicaceae	
☞ Fabaceae	☞ Euphorbiaceae	☞ Elaeagnaceae		
☞ Solanaceae	☞ Liliaceae	☞ Fabaceae		
	☞ Loganiaceae	☞ Icacinaceae		
	☞ Menispermaceae	☞ Loganiaceae		
	☞ Papaveraceae	☞ Malvaceae		
	☞ Poaceae	☞ Nyssaceae		
	☞ Ranunculaceae	☞ Poaceae		
	☞ Rhamnaceae	☞ Rubiaceae		
	☞ Rubiaceae	☞ Zygophyllaceae		

Fuente: Cuevas [8]

1.2.3. Cardenólidos

Los cardenólidos son glucósidos de esteroides con una aglicona pentacíclica y de cero a cuatro monosacáridos unidos por el enlace β -O-glicosilo al C3 del esteroide [25], ver Figura 2. Con una enorme diversidad de formas químicas, estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos esporádicamente como glucósidos o como geninas libres (lactona más esteroide) en varias familias botánicas [26,27]. Es generalmente aceptado que los cardenólidos son una potente defensa química exhibida por las plantas contra varios depredadores [27].

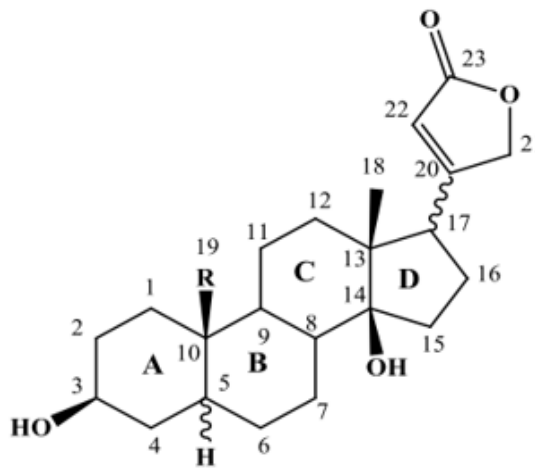


Figura 2. Estructura química base de cardenólidos
Fuente: Cotacachi [26]

La familia Apocynaceae sobresale con el mayor número de plantas que contienen cardenólidos en comparación con otras familias [27]. Esta familia representa más de la mitad de los 55 géneros que contienen cardenólidos, incluyendo los dos géneros (*Asclepias* y *Strophanthus*) con más especies que contienen cardenólidos [27]. Se ha observado que la concentración de cardenólidos varía en diferentes especies del mismo género e igual forma que el contenido de cardenólidos en varias partes de una misma planta [27]. Así pues, se ha demostrado que a bajas concentraciones, los cardenólidos son fármacos de un gran valor para tratar la insuficiencia cardíaca en humanos. Además, han mostrado una destacada actividad anticancerígena así como para el tratamiento de otras enfermedades [27].

1.3. Enfoque preliminar de *cf. Aspidosperma excelsum*

Cotacachi [26] menciona en su estudio que se realizó la respectiva identificación de cardenólidos con actividad anti-cáncer presentes en extractos metanólicos de las especies vegetales: *Tabernaemontana sananho*, *Rauvolfia praecox*, *Himatanthus tarapotensis*, *Himatanthus bracteatus*, *cf. Aspidosperma excelsum* y *Nerium oleander*, todas de la familia Apocynaceae. De entre las cuales, *H. tarapotensis* y *H. bracteatus* sobresalieron con una considerable cantidad de cardenólidos con actividad anti-cáncer en concentraciones altas, más no superiores a *N. Oleander* (especie modelo), la cual presentó la mayor cantidad de cardenólidos; a diferencia de *cf. Aspidosperma excelsum*, que presentó una casi nula cantidad de cardenólidos. Sin embargo, estas tres especies *H. tarapotensis*, *H. bracteatus* y *A. excelsum* presentan una potente actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de cuello uterino (HeLa) y meduloblastoma (D-384) en las que fueron evaluadas, por lo que se sospecha que la actividad citotóxica alcanzada no solo se le atribuiría a los cardenólidos como es evidente en la especie *cf. Aspidosperma excelsum* por su baja concentración de cardenólidos sino a otros posibles metabolitos potenciales como alcaloides, los cuales, están presentes en esta y otras especies de la familia Apocynaceae.

1.4. Planteamiento del problema a investigar

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo. En el 2020, se registraron casi 10 millones de fallecimientos (www.who.int/es). La incidencia de esta enfermedad aumenta considerablemente con la edad, muy probablemente por la acumulación de factores de riesgo de determinados tipos de cáncer incluido la combinación con la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad (www.who.int/es). Los tratamientos que se aplican hoy en día, tales como radioterapia y la quimioterapia, si bien es cierto, han ayudado de gran manera, pero, al no ser específicos resultan con efectos secundarios adversos por lo que es de suma importancia encontrar tratamientos opcionales con mejor selectividad hacia las células cancerígenas. En este caso, metabolitos secundarios bioactivos provenientes de la especie *cf. Aspidosperma excelsum*.

1.5. Justificación de la investigación

La identificación y caracterización de compuestos provenientes de fuentes naturales que se podrían considerar bioactivos en el campo de la prevención y el tratamiento del cáncer ha despertado un gran interés, debido a la capacidad de regular, tanto a nivel molecular como celular, la supervivencia y la muerte de las células cancerosas a través de múltiples vías de señalización [28]. Los múltiples objetivos que pueden verse afectados por estos compuestos, ha estimulado la búsqueda de fuentes biológicas donde será posible extraerlos en cantidades significativas [28].

Como se mencionó anteriormente, una excelente fuente biológica de la que se tiene conocimiento son las plantas de la familia Apocynaceae, la cual sobresale con una numerosa cantidad de especies que contienen cardenólidos y una gran variedad de metabolitos secundarios con potencial anticancerígeno [13,29]. Razones por las cuáles estas especies pueden ser tomadas como el punto de partida para realizar una caracterización preliminar de la actividad anti-cáncer. En este estudio se profundizará lo realizado por Cotacachi [26] con un análisis fitoquímico completo, abarcando metabolitos potenciales como alcaloides, fenoles, flavonoides, entre otros y la cuantificación de los mismos. Siendo así, en esta investigación específicamente el análisis se llevará a cabo para la especie *cf. A. excelsum*, con la finalidad de poder determinar preliminarmente, si la actividad anticancerígena presentada por esta especie en las líneas celulares HeLa y D-384, previamente, se le puede atribuir a otro tipo de metabolito como alcaloides o demás presentes en la especie, tomando en cuenta la baja presencia de cardenólidos obtenida.

1.6. Objetivos de la investigación

1.6.1. Objetivo General

Caracterizar preliminarmente las fracciones del extracto metanólico de las hojas de la especie *cf. Aspidosperma excelsum* con actividad anticancerígena.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Fraccionar el extracto metanólico de las hojas de la especie *cf. Aspidosperma excelsum* por medio de técnicas cromatográficas.
- Determinar la actividad anticancerígena de las fracciones obtenidas en las líneas celulares.
- Caracterizar preliminarmente las fracciones con actividad anticancerígena mediante tamizaje químico y GC-MS.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Preparación del extracto primario de metanol

Las hojas de la especie *Aspidosperma excelsum* se tomaron del punto de muestreo indicado en Cotacachi [26] bajo el permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica mediante el Contrato Marco MAAE-DBI-CM-2021-151. Una vez recolectadas, las hojas fueron cortadas en pequeños fragmentos y secadas en una estufa con flujo de aire a una temperatura de 40°C durante 5 días. El extracto metanólico fue preparado macerando 165 g de hojas secas en metanol al 80% (1/10 planta/solvente; 3 repeticiones x 24h) [30]. Posteriormente, con la ayuda de un rotavaporador (BUCHI Rotavapor™ R-300) se concentró el extracto a 50 mbar y 37°C, dando como resultado un extracto crudo metanólico de 19.29 g, el cual finalmente fue almacenado a 4°C.

2.2. Fraccionamiento del extracto primario de metanol mediante extracción líquido-líquido usando solventes de polaridad creciente

El extracto primario de metanol (6 g) se sometió inicialmente a un proceso de desengrasado con hexano donde se siguió un proceso modificado de [31] que se resume en breve. Se pesó 6 g, se añadió 60 mL de hexano y se dejó en el baño ultrasónico por hora y media. Posteriormente, se reservó el sobrenadante (Fr. Hexano; grasa) y al remanente se le añadió metanol acuoso al 10 % (50 mL) y se realizó lavados con acetato de etilo (AcOEt) y butanol (BuOH) (50 mL x 3) [32], obteniendo los extractos Fr. AcOEt y Fr. BuOH respectivamente, los cuales fueron llevados hasta sequedad con ayuda del rotavaporador (BUCHI Rotavapor™ R-300) incluyendo la fracción de hexano

(Fr. Hexano). Dando como resultado: 538.7 mg de extracto de Fr.AcOEt, 4.84 g de extracto de Fr. BuOH y 1g de Fr. Hexano.

2.3. Extracción Soxhlet de Cloroformo para extracción de alcaloides

La extracción Soxhlet se llevó a cabo según el método descrito por Cevallos-Morillo [6] con ciertas modificaciones. Para ello, se pesaron 25 g de hojas secas de *cf. Aspidosperma excelsum*, se pulverizó y se ajustó a pH 11 con aproximadamente 30 mL de una solución de KOH (85%) al 5%. Después se dejó enfriar la mezcla a 3°C durante una noche y posteriormente se sometió a extracción Soxhlet con 250 mL de cloroformo durante 12h, dos veces. Finalmente, el extracto fue llevado hasta sequedad utilizando el rotavaporador (BUCHI Rotavapor™ R-300), dando como resultado un extracto de cloroformo de 2.35 g.

2.4. Tamizaje Fitoquímico de *cf. Aspidosperma excelsum*

Se determinaron de forma cualitativa metabolitos de interés en los distintos extractos obtenidos de las hojas de *cf. A. excelsum*: Extracto primario de metanol (MeOH), Fracción de hexano, Fracción de AcOEt, Fracción de BuOH y Soxhlet CHCl₃ (una proporción de 10 mg disueltos en 2 mL; por cada test) adaptando los procedimientos basados en [33,34].

2.4.1. Determinación cualitativa de fenoles

Test Folin-Ciocalteu: A cada extracto se le añadió unas gotas del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M comercial (consiste de una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo) y carbonato de sodio al 7%. Para el control positivo, en un tubo de ensayo se añadió unas gotas de ácido gálico con unas gotas del reactivo de Folin-Ciocalteu 2 M y carbonato de sodio 7%. El desarrollo de un color verde azulado se toma como presencia positiva de fenoles.

2.4.2. Determinación cualitativa de flavonoides

Test de Shinoda: A cada extracto se le añadió unas gotas de HCl concentrado (37%) más una pequeña cucharada de polvo de magnesio. Para el control positivo, en un tubo de ensayo se añadió gotas de quercetina (95%) con unas gotas de acetato de sodio (1M) y solución de tricloruro de aluminio (10%). El desarrollo de un color rosa o rojo carmesí indica la presencia de flavonoides.

2.4.3. Determinación cualitativa de alcaloides

Test de Dragendorff: A cada extracto se añadieron unas gotas del reactivo de Dragendorff (solución de nitrato básico de bismuto con ácido acético y yoduro de potasio) [35]. Para el control positivo, a 2 mg de atropina se le añadió unas gotas del reactivo de Dragendorff. El desarrollo de un color anaranjado rojizo indica la presencia de alcaloides.

2.4.4. Determinación cualitativa de terpenoides

Test de Salkowski: A cada extracto se mezcló con 2 mL de cloroformo. Se añadió lentamente 2 mL de H₂SO₄ concentrado a lo largo de las paredes de los tubos de ensayo. Se formó un precipitado de color marrón rábano en la interfaz que indica la presencia de terpenoides.

2.4.5. Determinación cualitativa de glucósidos cardiacos y cardenólidos

En primera instancia, al extracto metanólico se le realizó una extracción de cardenólidos basado en la metodología aplicada por Cotacachi [26], posteriormente se realizó el **test de Keller-Killani**. Para el cual, se tomó una alícuota de 2.5 mL del sobrenadante resultante de la extracción de cardenólidos realizado a cada extracto y se agregó 1.5 mL de ácido acético glacial. Posteriormente, se adicionaron entre 3 y 4 gotas de cloruro férrico al 5% y 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Para el control positivo, a 50 µl de 2(5H)-Furanona se le añadió exactamente las mismas cantidades mencionadas. El desarrollo de un anillo marrón en la interfase indica las características del desoxi-azúcar de los cardenólidos, lo que confirma la presencia positiva de cardenólidos. Además, la presencia de un anillo verde-violeta que aparece debajo del anillo marrón, en la capa de ácido acético, indica la presencia positiva de glucósido.

2.5. Determinación cuantitativa de fenoles por espectrofotometría UV-Vis

El método aplicado para llevar a cabo la cuantificación de fenoles totales está basado en Medina [36] con ligeras modificaciones. En un inicio, se preparó la solución madre de ácido gálico (97.5%) y solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) (7%). Para ello, primero se pesó 5 mg de ácido gálico y se disolvió con 1 mL de agua destilada en un tubo Eppendorf mientras que por otro lado se pesó 3.5 mg de Na_2CO_3 y se disolvió con agua destilada en un balón de aforo de 50 mL. Después, se prepararon soluciones hijas de ácido gálico de 25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se añadió 100 μL de cada solución de ácido gálico (25 – 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tubos de ensayo de 5 mL y se mezcló con 40 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2M, seguido de 860 μL de agua destilada. Se realizó agitación por vórtex durante 10 segundos y se dejó reposar durante 5 minutos. Después, se agregaron 100 μL de la solución carbonato de sodio y 900 μL de agua destilada. Se realizó agitación por vórtex por pocos segundos y se dejó reposar en oscuridad durante 60 minutos. Este proceso se realizó por triplicado para cada concentración de solución de ácido gálico. Finalmente, se leyó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu, UV-3600 Plus).

2.6. Determinación cuantitativa de flavonoides por espectrofotometría UV-Vis

El método aplicado para llevar a cabo la cuantificación de flavonoides totales está basado en Wang [37] con ligeras variaciones. Inicialmente, se preparó la solución madre de quercetina (95%), la solución de acetato de sodio 1 M y la solución de tricloruro de aluminio (99%) al 10%. Para lo cual, primero se pesó 5 mg de quercetina y se disolvió con metanol en un balón de aforo de 10 mL mientras que por separado en 2 balones de aforo de 25 mL con metanol se disolvió el peso respectivo de 2.05 g de acetato de sodio anhidro y 2.5 g de tricloruro de aluminio (99%). A continuación, para la preparación del blanco control se añadió 100 μL de solución de acetato de sodio (1 M), 100 μL de solución de tricloruro de aluminio (10%) y se mezcló con 4.8 mL de metanol. Para el blanco se añadió 500 μL de cada solución de quercetina (5 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se mezcló con 4.5 mL de metanol.

Para la curva de calibración, se prepararon soluciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL en tubos de ensayo partiendo de la solución madre de quercetina de 0.5 mg/mL. Una vez preparado todo ello, se colocó 500 µL de cada solución de quercetina (5 - 50 µg/mL) en tubos de ensayo de 5 mL y se mezcló con 4.3 mL de metanol, seguido de 100 µL de solución de acetato de sodio (1M) y 100 µL de solución de tricloruro de aluminio (10%). Todo este proceso se realizó por triplicado para cada concentración de solución de quercetina. Se realizó agitación por vórtex por 5 segundos y se dejó en reposo y oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 438 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu, UV-3600 Plus).

2.7. Determinación cuantitativa de alcaloides por espectrofotometría UV-Vis

El método aplicado para llevar a cabo la cuantificación de flavonoides totales fue preparado según el procedimiento descrito por Cevallos-Morillo [6] bajo ligeras modificaciones. Para la preparación de la solución de verde de bromocresol (VBC) 0.1 mM, se pesó 7 mg de VBC, se añadió 0.3 mL de NaOH 2 mol/L con 0.5 mL de agua destilada hasta que se disuelva completamente y la solución se diluyó hasta 100 mL con agua destilada en un balón de 100 mL. Así mismo, para la preparación de la solución de fosfato de potasio (K_2HPO_4), se pesó 3.55 mg de K_2HPO_4 al 98%, se colocó una cierta cantidad de agua para disolverlo y se sometió a calor. Se ajustó el pH a 4,7 con ácido cítrico sólido, se trasvasó a un balón de 100 mL y se aforó con agua destilada. A continuación, para la preparación de la solución estándar de atropina (>99%), se pesó 10 mg de atropina y se disolvió con agua destilada en un balón aforado de 10 mL.

Para la curva de calibración, se prepararon soluciones de 4, 8, 12, 16, 20 y 24 µg/mL de una solución de atropina. A cada tubo se le añadió 2.5 mL de buffer fosfato más 2.5 mL de la solución de VBC para el arrastre de los componentes orgánicos se añadió 5 mL de cloroformo. Se realizó agitación por vórtex durante 1 minuto se centrifugó por tres minutos a 2000 rpm y con ayuda de una pipeta se descartó el sobrenadante (fase acuosa) quedando solo la fase orgánica en cada tubo. De igual forma se preparó el blanco pero sin adicionar estándar atropina. Finalmente, se realizó la lectura de absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Shimadzu, UV-3600 Plus).

2.8. Determinación cuantitativa de cardenólidos del extracto primario de metanol por espectrofotometría UV-Vis

Previo a la cuantificación, se realizó una extracción de cardenólidos basado en Cotacachi [26]. Para la cual, se pesó 50 mg del extracto primario de metanol se colocó en tubos cónicos de 50 mL. Se disolvió con 10 mL de metanol al 70% y se centrifugó a 4 700 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se descartó el sedimento, se añadió 2.5 mL de acetato de plomo (II) al 15% (p/v) y la solución resultante se centrifugó a las condiciones iniciales. De igual forma, se descartó el sedimento, se agregó 5 mL de fosfato monopotásico al 4% (p/v) y nuevamente se centrifugó la solución resultante en las mismas condiciones. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos de 50 mL (se transfirió aproximadamente 15 mL de sobrenadante).

La determinación de cardenólidos totales fue realizada según los métodos descritos en [38,39] bajo pequeñas adaptaciones. Inicialmente, se preparó las soluciones estándar de ácido 3,5-dinitrobenzoico (99%) al 2% y KOH 1N. Para ello, se pesó 100 mg de ácido 3,5-dinitrobenzoico y se disolvió con 5 mL de metanol. Así mismo, se pesó 280 mg de KOH y se disolvió con 5 mL de metanol. Por otro lado, para obtener la solución estándar de 2(5H)-Furanona (98%) de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se tomó una alícuota de 10 μL de 2(5H)-Furanona y se disolvió en 1 mL de metanol en un tubo Eppendorf cubierto con papel aluminio.

Seguido de ello, para la curva de calibración de 2(5H)-Furanona (98%) se preparó soluciones hijas de 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la solución estándar de 2(5H)-Furanona de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A continuación, se mezcló 100 μL del reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico:KOH; 1:1) con 100 μL de cada concentración preparada de 2(5H)-Furanona. Para el blanco muestra, se mezcló 100 μL de metanol con 100 μL del reactivo de Kedde. Finalmente, la absorbancia se midió a 560 nm después de 2.5 minutos en un lector de espectrofotómetro de placa multipocillo (GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader).

2.9. Cromatografía de capa fina (CCF) de los diferentes extractos

Se eluyeron placas de silica gel sobre aluminio (5 cm x 3 cm) con mezclas de disolventes (metanol, hexano, diclorometano (DCM) y acetato de etilo) a distintas concentraciones y como reveladores se usó el reactivo de Dragendorff, sulfato cérico o yodo. En dichas

placas, se sembró en proporciones de 10 mg disueltos en 2 mL; por cada extracto (Ext. MetOH, Fr. Hexano, Fr. AcOEt y Soxhlet CHCl₃).

2.10. Extracción de alcaloides para análisis por GC-MS

La extracción de alcaloides se realizó basado en el grupo de Cespedes-Acuña [40]. Se pesó 360 mg de extracto metanólico en un tubo Eppendorf de 2 mL y se añadió 1 mL de MetOH. De igual forma, se pesaron 360 mg en otros tres tubos Eppendorf y se añadió 500 µL de MetOH con 500 µL de cafeína (0.01 mg/mL), con el fin de realizar una extracción por triplicado con cafeína como estándar interno durante el ensayo. Se realizó agitación por vórtex durante 15 segundos, se dejó en el baño ultrasónico por aproximadamente 2 horas y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. A continuación, se trasvasó 700 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 2 mL y se colocó en una estufa durante 14 horas a una temperatura de 40°C. Una vez transcurrido el tiempo, se añadió 500 µL de H₂SO₄ al 2% y se dio agitación por vórtex. La solución ácida se desengrasó con éter etílico (500 µL x 3; 10 000 rpm por 5 minutos) y se basificó con 200 µL NH₄OH al 25%. Posteriormente, los alcaloides se extrajeron con éter etílico (500 µL x 3; 10 000 rpm por 5 minutos) y el tubo Eppendorf recolector del mismo, se colocó en una estufa a 50°C por 1 noche. Finalmente, la mezcla seca de alcaloides se resuspendió con 100 µL de MetOH grado HPLC para su posterior análisis mediante GC-MS.

2.11. Análisis de GC-MS para identificar potenciales compuestos anticancerígenos presentes en el extracto alcaloideo

El análisis fue desarrollado basado en el protocolo planteado por el grupo de Cespedes-Acuña [40] usando un cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas GCMS-QP2020 NX de cuadrupolo simple, Shimadzu y columna capilar SH-I-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). El programa de temperatura fue: 100-180°C a 15°C/min, 180-300°C a 5°C/min, manteniéndose finalmente por 10 minutos. La inyección se realizó a 250°C. El flujo de gas portador (helio) fue de 1.05 mL/min. Además, se inyectó 1 µL de los extractos de alcaloides directamente en el GC-MS. Se usó cafeína como estándar interno. El índice de retención Kovats (RI) de los compuestos se registró con una mezcla de n-alcanos de calibración estándar (C7-C33). Los compuestos se identificaron comparando su fragmentación espectral de masas con el espectro de referencia estándar usando la biblioteca de masas (NIST20 v2.4).

2.12. Procedimiento de cultivo celular

El cultivo celular se realizó en la línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y fibroblastos de próstata normal (PNT2), cultivadas en medio EMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, solución antibiótico-antimicótica al 1% (100 unidades/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B), 1 % de L-glutamina (2mM) y 1% de aminoácidos no esenciales. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y monitoreadas en la cámara de Neubauer mediante microscopía invertida.

2.13. Análisis de viabilidad celular mediante ensayo MTS

Se realizó el ensayo colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetónifenol)-2-(4-sulfofenil) (MTS) para cuantificar la viabilidad y citotoxicidad de los extractos (Fr. Hexano, Fr. AcOEt, Ext. MetOH, Soxhlet CHCl₃) con las líneas celulares MCF-7 y PNT2. Para ello, se sembraron 5x10³ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Luego, las células se trataron por triplicado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los 4 extractos a analizar. Como control negativo se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,1 % v/v y Doxorubicina (SIGMA) 1 μM como control positivo, el tiempo de exposición fue de 48 h. Cuatro horas antes de que finalizar el tratamiento se agregó 20 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ de solución de reactivo MTS (5 mg/mL) y se incubó en oscuridad hasta culminar el tratamiento a 37°C. Finalmente, la absorbancia se midió a 490 nm. En lo que respecta al análisis estadístico, los datos obtenidos se presentaron como medias de tres experimentos independientes.

CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tamizaje Fitoquímico de extractos de *cf. Aspidosperma excelsum*

Los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los diferentes extractos de hojas de *cf. Aspidosperma excelsum* se reflejan en la Tabla 2. La determinación cualitativa de metabolitos indica que el extracto primario de metanol y la fracción de BuOH presentan compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenoides y glucósidos cardiotónicos, mientras que, tanto la fracción de AcOEt como el extracto de CHCl₃ a diferencia de los

primeros extractos mencionados, no presentan glucósidos cardiotónicos. En el caso de la fracción hexano por la naturaleza de su coloración fue imposible visualizar algún cambio de coloración en los diferentes test realizados.

Al resultar positivo la presencia de cardenólidos en esta especie vegetal, coincide con la descripción del grupo de Patil [13], donde se menciona que ciertas especies pertenecientes a la familia Apocynaceae presentan glucósidos, específicamente glucósidos cardiotónicos del tipo cardenólidos, los cuales han reportado actividad anticancerígena.

Un grupo de metabolitos importante a considerar son los alcaloides, debido a que la mayoría de las plantas de la familia Apocynaceae son ricas en alcaloides y algunos han reportado actividad anticancerígena [13].

Tabla 2. Metabolitos detectados en el tamizaje fitoquímico de extractos de *cf. Aspidosperma excelsum*

Metabolitos Secundarios	Test	Extractos				
		Ext. primario MetOH	Fracción Hexano	Fracción AcOEt	Fracción BuOH	Soxhlet CHCl ₃
Fenoles	Folin-Ciocalteu	(+)	*	(+)	(+)	(+)
Flavonoides	Shinoda	(+)	*	(+)	(+)	(+)
Alcaloides	Dragendorff	(+)	*	(+)	(+)	(+)
Terpenoides	Salkowski	(+)	*	(+)	(+)	(+)
Glucósidos cardiotónicos (cardenólidos)	Keller-Killani	(+)	*	(-)	(+)	(-)

(+) presencia, (-) no presencia

(*) Imposible visualización de algún cambio de coloración por el tono natural oscuro del extracto

Realizado por: Loja Steven, 2023

3.2. Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Alcaloides de extractos de *cf. Aspidosperma excelsum* por espectrofotometría UV-Vis

Los resultados de la cuantificación respectiva de fenoles, flavonoides y alcaloides se reflejan en la Tabla 3. El contenido de fenoles totales fue determinado basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual cumple la función de agente oxidante [16]. Conjuntamente, el ácido gálico se usó como estándar medido a 750 nm. Por otro lado, el contenido de flavonoides totales fue determinado basándose en el método descrito por Gracia [16] usando la quercetina como estándar medido a 438 nm. Los resultados obtenidos de la cuantificación de fenoles y flavonoides están expresados en equivalentes de ácido gálico y de quercetina, respectivamente. El contenido de alcaloides totales fue determinado mediante el método utilizado por Shamsa [41], basado en la reacción del alcaloide con verde de bromocresol (VBC), formando un complejo de color amarillo medido a 415 nm usando atropina como estándar. El extracto primario de metanol sobresalió de manera significativa en la cuantificación tanto de fenoles, flavonoides y alcaloides; ver Tabla 3. Sin embargo, las fracciones de AcOEt y Hexano presentaron la mayor cantidad de compuestos polifenólicos (fenoles-flavonoides) y alcaloides, respectivamente. Con ello se puede deducir que la especie vegetal presenta una mayor cantidad de alcaloides del tipo no polar, debido a la clara predominancia y afinidad de alcaloides por la fase menos polar como lo es la fracción de hexano. No obstante, podemos inferir también que presenta otra diversidad de tipos de alcaloides por la notable cuantificación en las otras fracciones, ver Tabla 3. Apocynaceae resalta por alcaloides de tipo: indólicos, ibogánicos, terpenoidales y esteroidales, donde la polaridad de dichas estructuras químicas es variada [13].

Tabla 3. Cuantificación de Fenoles, Flavonoides y Alcaloides por espectrofotometría UV-Vis de extractos de *cf. Aspidosperma excelsum* (3,3 mg/mL)

	Fenoles totales			Flavonoides totales			Alcaloides totales		
	µg ácido gálico/mg extracto	% ácido gálico por muestra	mg ác. gálico/g hoja seca de <i>A. excelsum</i>	µg quercetina/mg extracto	% quercetina por muestra	mg quercetina/g hoja seca de <i>A. excelsum</i>	µg alcaloides/mg extracto	% alcaloides por muestra	mg alcaloide/g hoja seca de <i>A. excelsum</i>
Extracto primario MetOH	135,497 ± 6,953	13,550 ± 0,695	16,079	2,330 ± 0,078	0,233 ± 0,008	0,277	22,518 ± 2,531	2,252 ± 0,253	2,672
Fracción Hexano	51,504 ± 1,314	5,150 ± 0,131	1,024	N.D	N.D	N.D	68,695 ± 6,875	6,869 ± 0,687	1,366
Fracción AcOEt	156,602 ± 4,667	15,660 ± 0,467	1,668	7,161 ± 0,077	0,716 ± 0,008	0,076	10,130 ± 5,637	1,013 ± 0,564	0,108
Fracción BuOH	39,719 ± 2,506	3,972 ± 0,251	3,799	1,013 ± 0,034	0,101 ± 0,003	0,097	2,327 ± 0,197	0,233 ± 0,020	0,223
Extracto CHCl₃	44,771 ± 2,668	4,477 ± 0,267	2,077	0,624 ± 0,090	0,062 ± 0,009	0,029	11,269 ± 2,245	1,127 ± 0,224	0,523

N.D: No determinado

Realizado por: Loja Steven, 2023

En lo que respecta a alcaloides, al realizar su extracción con cloroformo; un método de extracción alcalino de los alcaloides mayormente usado en otras investigaciones no ha resultado óptimo en este caso, debido a que se obtuvieron cantidades bajas a diferencia de otros protocolos para otras plantas como la sangre de drago donde el extracto de cloroformo resulta enriquecido en alcaloides [6,9]. Se puede intuir que en la estructura de los alcaloides presente en esta especie vegetal al resultar afines al hexano, puede estar unido a otros compuestos como esteroides o terpenos, por lo que el nitrógeno no resaltaría como la parte más importante de la estructura total sino más bien toda su estructura carbonada. Se sabe que en el caso de las especies de *Aspidosperma*, predominan los alcaloides indólicos de considerable diversidad estructural, muchos de los cuales contienen un esqueleto simple de β -carbolina, con sistemas de anillos tricíclicos de pirido-indol, ver Figura 3 [42,43]. Un ejemplo de ello es la aspidocarpina, compuesto preliminarmente identificado por GC-MS en esta investigación, ver Tabla 7. Uno de los principales metabolitos secundarios en las especies de este género son los alcaloides indol monoterpénicos, y se han aislado alrededor de 250 de ellos, entre los cuales, varios han mostrado diversas actividades farmacológicas importantes tales como antiplasmodiales, analgésicos, antiinflamatorios, antiasmódicos y anticancerígenos [15,42,44].

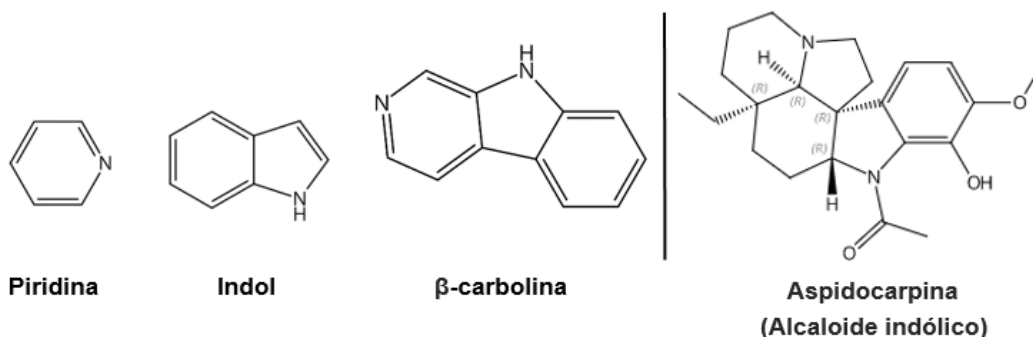


Figura 3. Estructuras que forman parte de un alcaloide indólico
Realizado por: Loja Steven, 2023

3.3. Cuantificación de Cardenólidos del extracto metanólico primario de *cf. Aspidosperma excelsum* por espectrofotometría UV-Vis

El contenido de cardenólidos totales fue determinado mediante el método descrito por Morsy [38] con ligeras modificaciones. El cual se basa en la obtención de derivados coloreados por reacción con derivados polinitroaromáticos en solución alcalina como el reactivo de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzoico:KOH) medido a 560 nm usando como estándar la lactona 2(5H)-Furanona. El reactivo de Kedde reacciona con el anillo

insaturado de la lactona el cual es característico para los glucósidos cardíacos disminuyendo las posibilidades de interferencia de los demás constituyentes de la planta, lo que resulta en un buen método para la detección y cuantificación de los cardenólidos.

En este punto, la cuantificación solo se llevó a cabo para el extracto metanólico primario; el cual resulta de interés por la presencia de cardenólidos revelado en el tamizaje fitoquímico previo, resultando afín al resultado obtenido por parte de Cotacachi [26] donde, reporta la identificación de cardenólidos en el extracto metanólico de *cf. Aspidosperma excelsum* por UPLC-QTOF-MS. Sin embargo, la cuantificación de cardenólidos por espectrofotometría UV-Vis llevada a cabo tanto en esta investigación como por Cotacachi no mostraron resultados cuantificables debido a que mostraron absorbancias muy pequeñas que se encontraban por debajo del límite de detección (L.D.D), ver Tabla 5. Por lo cual, se infiere que los cardenólidos están presentes en esta especie vegetal pero en bajas cantidades.

Tabla 4. Cuantificación de cardenólidos por espectrofotometría UV-Vis del extracto metanólico primario de *cf. Aspidosperma excelsum*

Absorbancia $\lambda=560$	$\mu\text{g/mL}$ Cardenólidos	Contenido de cardenólidos [$\mu\text{g/mL}$ extracto]
--	< L.D.D.	--

Realizado por: Loja Steven, 2023

Tabla 5. Parámetros para la curva de calibración de cardenólidos por espectrofotometría UV-Vis utilizando 2(5H)-Furanona como estándar

Parámetros	Valor
Pendiente	0,1552
Intercepto	0,5713
R^2	0,8793
L.D.D	2,0341 $\mu\text{g/mL}$
L.D.C	6,4768 $\mu\text{g/mL}$

L.D.D: Límite de detección

L.D.C: Límite de cuantificación

Realizado por: Loja Steven, 2023


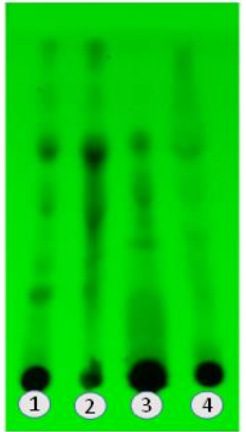
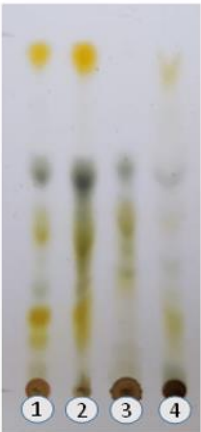

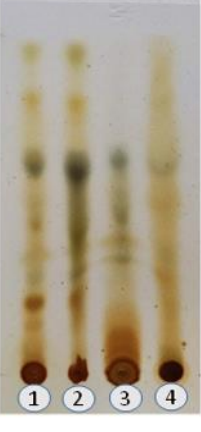



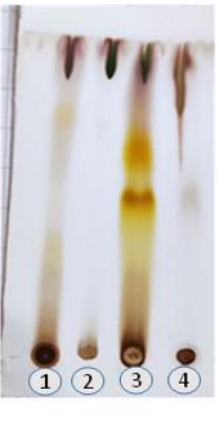

3.4. Cromatografía de Capa Fina (CCF) de los diferentes extractos


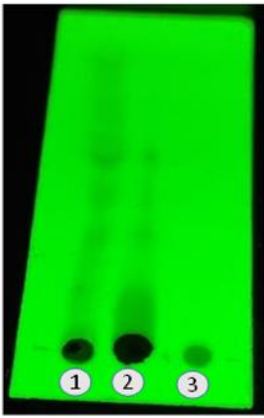

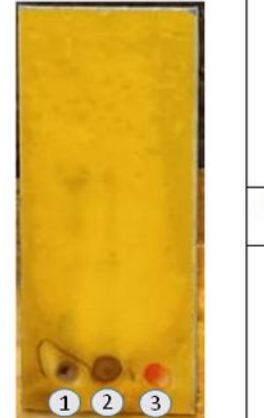
Con la finalidad de profundizar sobre las características de los extractos obtenidos, se decidió analizar los perfiles de sus cromatogramas de capa fina bajo diferentes condiciones, ver Tabla 6. De los sistemas de disolventes evaluados como fases móviles, el constituido por Hexano:AcOEt a una proporción de 75:25 (v/v) permitió una mejor resolución del perfil cromatográfico de los distintos extractos sembrados. La revelación con vapores de yodo y sulfato cérico reflejan bandas (manchas) a valores de R_f (Factor de retención) similares entre el extracto primario de MetOH, Fr. Hexano, Soxhlet de CHCl₃ y Fr. AcOEt. Sin embargo, este último se diferencia de los demás extractos por presentar una menor cantidad de productos. Por lo tanto, entre los extractos sembrados, la fracción de AcOEt se muestra de manera preliminar como la óptima para una futura extracción y/o purificación inicial de metabolitos secundarios potenciales presentes en la especie *cf. Aspidosperma excelsum*.

El reactivo de Dragendorff es aplicado como agente revelador general de alcaloides, cuya aplicación produce bandas (manchas) generalmente de color anaranjado como prueba positiva [45]. En la Tabla 6, placa C se colocó un estándar de nicotina; como control positivo. Sin embargo, los extractos corridos no presentaron manchas de dicha coloración por lo tanto, se infiere la posible ausencia de alcaloides. Sin embargo, por el tamizaje fitoquímico y cuantificación realizada previamente tenemos certeza de la presencia de alcaloides en los distintos extractos evaluados.

Como parte de esta investigación las placas fueron visualizadas sin usar revelador químico, primero a la luz visible y posteriormente expuestas a la luz UV con longitudes de onda de 254 nm y 365 nm. En todos los extractos sembrados al irradiar con ambas longitudes de onda se obtuvo bandas con los R_f similares a los observados con los reveladores químicos. Por otro lado, al observar las placas bajo la luz visible, se distinguen bandas de colores verde, amarillo y azul en todos los extractos sembrados, esto debido a la presencia de pigmentos que también se pueden apreciar al utilizar la luz violeta [46].

Tabla 6. Placas de cromatografía de capa fina realizadas a los diferentes extractos (5,0 mg/mL)
Revelados con lámpara UV-Vis, luz visible, sulfato cérico, yodo y reactivo de Dragendorff

Fases Moviles		Revelado				
		Onda corta (365 nm)	Onda larga (254 nm)	Luz visible	Sulfato cérico	Yodo
A	Hx:AcOEt (75:25)					
	1) Extracto MetOH					
	2) Fr. Hexano					
	3) Fr. AcOEt					
	4) Soxhlet CHCl ₃					
B	DCM:MeOH (75:25)					
	1) Extracto MetOH					
	2) Fr. Hexano					
	3) Fr. AcOEt					
	4) Soxhlet CHCl ₃					

C	Hx:AcOEt (75:25)					
	1) Soxhlet CHCl_3					Revelado con reactivo de Dragendorff
	2) Fr. AcOEt					
	3) Nicotina (estandar)					

Realizado por: Loja Steven, 2023

3.5. Efectos de los diferentes extractos de las hojas de *cf. Aspidosperma excelsum* sobre la viabilidad celular

La actividad antitumoral *in vitro* de los extractos obtenidos (50 µg/mL) fueron evaluados en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y fibroblastos de próstata normal (PNT2) mediante el ensayo MTS, durante un periodo de 48 horas (Figura 4). El porcentaje de citotoxicidad se evaluó en comparación con Doxorrubicina (100% de citotoxicidad) y DMSO (0% de citotoxicidad). En el caso de Fr. Hexano y extracto de Soxhlet de CHCl₃ exhibieron un porcentaje de citotoxicidad contra la línea MCF-7 del 5,36% y 19,36% respectivamente. El extracto primario de MetOH, Fr. AcOEt y Fr. BuOH no reflejaron efecto alguno. Por otro lado, en la línea PNT2, la fracción AcOEt y Fr. BuOH si exhibieron un porcentaje de citotoxicidad correspondiente al 10,17 % y 25,28% respectivamente. El porcentaje de citotoxicidad más alto se presentó por parte del extracto de Soxhlet de CHCl₃ del 30,30%, mientras que el extracto primario de MetOH y Fr. Hexano no reflejaron efecto alguno. Sin embargo, el efecto presentado por el extracto de Soxhlet de CHCl₃ no es considerado dentro de los límites citotóxicos ya que no supera el 50% de citotoxicidad. De modo que, los porcentajes de citotoxicidad presentado por los otros extractos evaluados tampoco reflejarían un efecto citotóxico significativo en las líneas celulares.

En cuanto a los resultados obtenidos de los ensayos en las líneas celulares se puede observar que los extractos con un mayor porcentaje de citotoxicidad en comparación a los otros extractos evaluados son la fracción BuOH y extracto de CHCl₃, los cuales presentan una baja cantidad de alcaloides y compuestos polifenólicos (fenoles-flavonoides). Mientras que, con la fracción de hexano se puede evidenciar lo contrario, el cual sobresalió con una mayor concentración de alcaloides (Tabla 3) y no resultó ser la fracción más activa en cuanto a la actividad anticancerígena con las líneas MCF-7 y PNT2. Por lo tanto, un alto contenido de alcaloides u compuestos polifenólicos no significa necesariamente una mayor actividad anticancerígena e incluso se podría asociar dicho porcentaje de inhibición presentado a uno u ciertos metabolitos con un potencial citotóxico muy alto a bajas concentraciones, puesto que no necesitan estar a una mayor concentración para presentar una mayor actividad. Sin embargo, para verificar esta hipótesis, habría que purificar compuestos de los extractos obtenidos y evaluar su capacidad anticancerígena en las mismas líneas celulares.

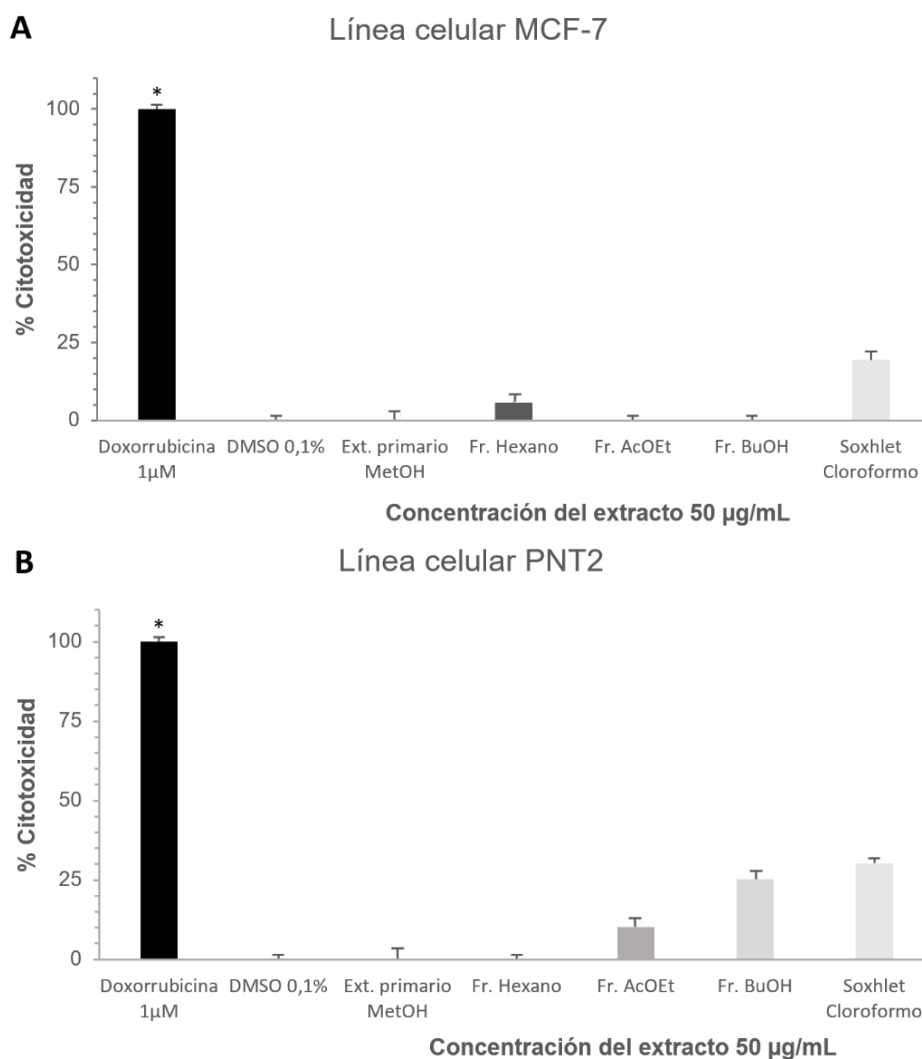


Figura 4. Efectos citotóxicos de los diferentes extractos de *cf. Aspidosperma excelsum* mediante el ensayo de MTS.

Realizado por: Loja Steven, 2023

Cabe mencionar que la fracción de hexano al ser la más rica en alcaloides poco polares y no presentar actividad anticancerígena en las líneas celulares evaluadas se puede inferir que los alcaloides poco polares no son responsables de dicha actividad.

Por otro lado, el extracto inicial de metanol puesto a prueba en esta investigación con las líneas celulares humanas MCF-7 y PNT2 no presentó actividad anticancerígena mientras que en la investigación realizada por Cotacachi [26] el extracto inicial metanólico de *cf. Aspidosperma excelsum* presentó una potencial actividad en las líneas celulares humanas HeLA y D-384 por lo que se puede intuir que:

la especificidad de la célula, es decir al ser diferentes tejidos celulares, presentan diferentes dianas moleculares [47] y por ende el efecto anticancerígeno de cada extracto

puede variar inclusive en base a su composición química (tamizaje fitoquímico). Esto nos da un breve indicio de la posible variación del potencial citotóxico que puede presentar los distintos extractos de *cf. A. excelsum* dependiendo de la línea celular humana en la que se realice el ensayo.

En lo que respecta a los alcaloides, específicamente del tipo indólicos aislados de diversas plantas medicinales han mostrado actividades citotóxicas contra varias líneas celulares cancerígenas induciendo autofagia, necroptosis y apoptosis bajo la influencia de varias proteínas implicadas en la vía apoptótica [48]. Además, se ha reportado la combinación entre alcaloides aislados de la especie *Catharanthus roseus* (familia: Apocynaceae) con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de linfomas, leucemias, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer testicular avanzado y sarcoma de Kaposi [48]. Esto abre la posibilidad de un efecto aditivo (sinergia aditiva) o sinérgico (sinergia potenciadora) con otros metabolitos [49].

Por parte de los compuestos fenólicos, las excepcionales propiedades antioxidantes los hacen fuertes candidatos como agentes anticancerígenos. De hecho, varios trabajos de investigación han demostrado que los polifenoles podrían usarse como agentes adyuvantes de quimioterapia en terapias contra el cáncer [18]. Sus efectos anticancerígenos están asociados con su capacidad para inhibir la proliferación celular (quinasa regulada por señal extracelular (Erk)1/2, ciclinas tipo D y quinasas dependientes de ciclina (CDK)), factores angiogénicos (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y MIC-1), cascadas de señalización oncogénicas (fosfoinositido 3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (Akt)), que inducen la apoptosis y previenen la migración celular y la metástasis [1].

Por otro lado, el extracto metanólico que reporta Cotacachi [26] en su estudio proviene del mismo punto de toma de muestra, el tiempo de recolección de la muestra fue un periodo distinto, por lo que se puede inferir que posiblemente en ese lapso de tiempo la especie vegetal presentaba una concentración diferente de sus metabolitos secundarios. Es más, en la literatura se ha informado que una función importante de los compuestos del metabolismo secundario es la de actuar como agentes alelopáticos, es decir, intervienen en la defensa química de las plantas. Así pues, los metabolitos secundarios que son secretados por una planta, pueden interactuar con otra planta y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto negativo o positivo sobre ella [50]. Si bien las condiciones ambientales influyen en la

síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, su potencialidad vuelve a sufrir las consecuencias de la interacción con el ambiente, pudiendo ser ésta modificada por las distintas condiciones ambientales [50,51]. Por lo tanto, no siempre se producirían sustancias cualitativas y cuantitativamente iguales, debido a que la producción y el perfil de estos compuestos químicos pueden no mantenerse a través del tiempo [50].

3.6. Identificación preliminar de potenciales compuestos presentes en el extracto alcaloideo por GC-MS

La identificación preliminar de potenciales compuestos anticancerígenos como resultado del análisis del extracto alcaloideo por GC-MS se refleja en la Tabla 7. Los datos fueron procesados bajo los criterios descritos por Mogollon [52], en el cual la identificación de los picos se realizó mediante la comparación de los espectros de la muestra y la biblioteca (un mínimo de coincidencia del 80 %), así como la comparación de su Índices de retención del programa de temperatura lineal (LTPRI).

Entre los posibles compuestos preliminares identificados, el 8-Hidroxicarvotanacetona, Fitol, Clionasterol y Lupeol sobresalen por presentar actividad anticancerígena en líneas celulares humanas. El 8-Hidroxicarvotanacetona presenta una potencial actividad citotóxica contra el cáncer de ovarios (OVCAR-8) y cáncer de colon (HCT-116) [53]. El Fitol sobresale por presentar una actividad citotóxica alta sobre las MCF-7 [54]. Por otro lado, Clionasterol presentó citotoxicidad contra cáncer de colon (Caco-2) y cáncer hepático (HepG2) [55]. Finalmente, el Lupeol presenta un nivel de citotoxicidad baja contra el cáncer de mama (MCF-7) [56]. A partir, de lo encontrado se puede apreciar la diversidad de compuestos con potencial anticancerígeno presentes en *cf. Aspidosperma excelsum* que según bibliografía la citotoxicidad varía dependiendo de la línea celular en las que son evaluados estos compuestos.

La Aspidocarpina resultó preliminarmente identificada como se observa en la Tabla 7, lo cual coincide en lo reportado por Robert [57] donde se menciona que la aspidocarpina es un producto natural presente en esta especie. Cabe resaltar que es un alcaloide del tipo indólico, uno de los miembros más numerosos de alcaloides presentes en la Familia Apocynaceae [13]. Sin embargo, en la literatura se menciona que presenta una actividad antiparasitaria [58]. Por lo que podríamos dar por descartado a este compuesto como uno de los responsables de la actividad citotóxica presentada en la MCF-7.

Tabla 7. Identificación por GC-MS de compuestos en el extracto alcaloideo de *cf. Aspidosperma excelsum*

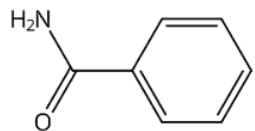
N°	Posible compuesto propuesto	CAS	Fórmula	Peso molecular	Tiempo de Retención (min)	LTPRI ^a		M ^b	Tipo de Compuesto
						Exp.	Lit.		
1	Benzamida	55-21-0	C ₇ H ₇ NO	121.14	7.40	1340	1344	930	Amida aromática
2	Aspidocarpina	466-45-5	C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₃	370.50	7.46	1346		850	Alcaloide indólico
3	8-Hidroxilinalool	64142-78-5	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170.25	7.67	1367	1361	940	Monoterpeno acíclico
4	2-Fenilacetamida	103-81-1	C ₈ H ₉ NO	135.16	8.02	1402	1402	880	Amida de ácido monocarboxílico
5	Tirosol	501-94-0	C ₈ H ₁₀ O ₂	138.16	8.26	1426	1432	860	Feniletanoide
6	8-Hidroxicarvotanacetona	7712-46-1	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168.23	8.37	1437	1436	910	Alcohol monoterpénico
7	Hidroxitolueno butilado	128-37-0	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	9.29	1524	1518	860	Fenólico
8	2,4-dihidroxibenzoato de metilo	2150-47-2	C ₈ H ₈ O ₄	168.15	9.39	1532		860	Fenólico
9	2-Metoxibenzamida	2439-77-2	C ₈ H ₉ NO ₂	151.16	9.71	1559		920	Amida aromática
10	Antiarol	642-71-7	C ₉ H ₁₂ O ₄	184.19	10.30	1609	1614	860	Fenólico
11	Coniferol	32811-40-8	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180.20	12.18	1747	1743	920	Monolignol
12	Loliolida	5989-02-6	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196.24	12.75	1787	1793	930	Lactona monoterpenoide

13	3-(4-hidroxibutil)-2-metilciclohexanona	91212-98-5	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184.27	14.16	1878	810	
14	Dihidrosiringenina	20736-25-8	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	212.24	14.49	1900	1906 880	Lignina
15	Palmitato de metilo	112-39-0	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.50	14.93	1927	1926 910	Ester metílico de ácido graso
16	Linolenato de metilo	301-00-8	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292.50	17.84	2104	2099 940	Ester metílico de ácido graso
17	Fitol	150-86-7	C ₂₀ H ₄₀ O	296.50	18.03	2116	2114 970	Alcohol diterpénico hidrogenado acíclico
18	Estearato de metilo	112-61-8	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	298.50	18.23	2128	2128 920	Ester metílico de ácido graso
19	Ácido linolénico	463-40-1	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.40	18.43	2141	2139 890	Ácido graso natural
20	Linolenato de glicerilo	18465-99-1	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	352.50	27.16	2701	2702 960	Monoéster de glicerina y ácido linolénico
21	Clionasterol	83-47-6	C ₂₉ H ₅₀ O	414.70	36.04	3348	3351 930	Lípido de esteroides (triterpeno)
22	Lupeol	545-47-1	C ₃₀ H ₅₀ O	426.70	37.55	3451	3451 910	Triterpenoide

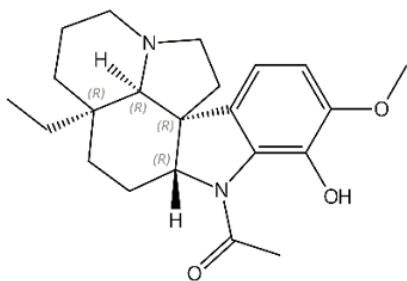
a: Índices de retención del programa de temperatura lineal, LTPRI, medidos (Exp.) y de la literatura (Lit.)

b: Coincidencia espectral con los espectros de referencia de la biblioteca NIST v2.4 %

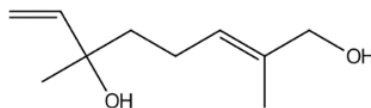
Realizado por: Loja Steven, 2023



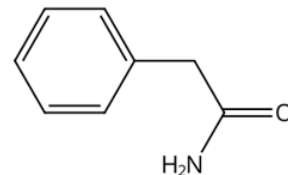
Benzamida



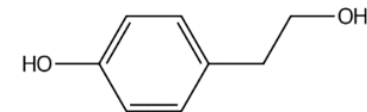
Aspilocarpina



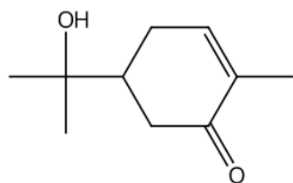
8-Hidroxilinalool



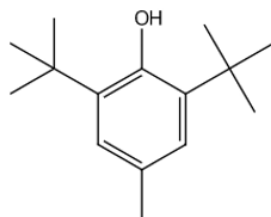
2-Fenilacetamida



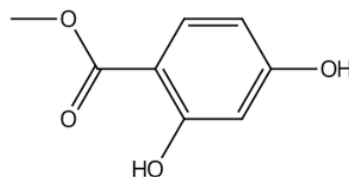
Tirosol



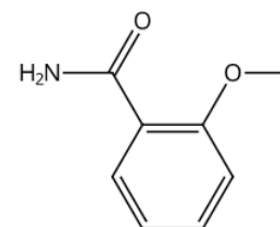
8-hidroxicarvotanacetona



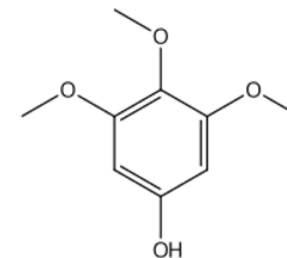
**Hidroxitolueno
butilado**



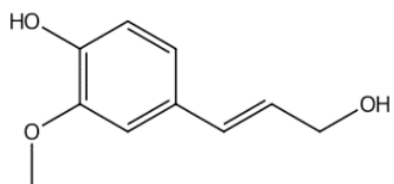
**2,4-dihidroxi benzoato
de metilo**



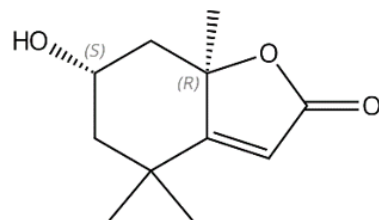
2-metoxibenzamida



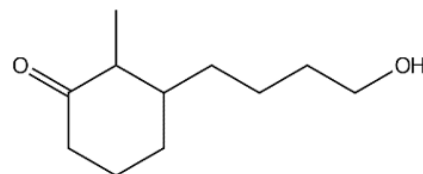
Antiarol



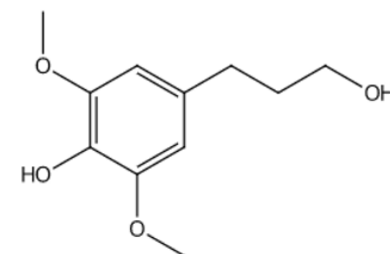
Coniferol



Loliolida



**3-(4-hidroxi butil)-2-
metilciclohexanona**



Dihidrosiringenina

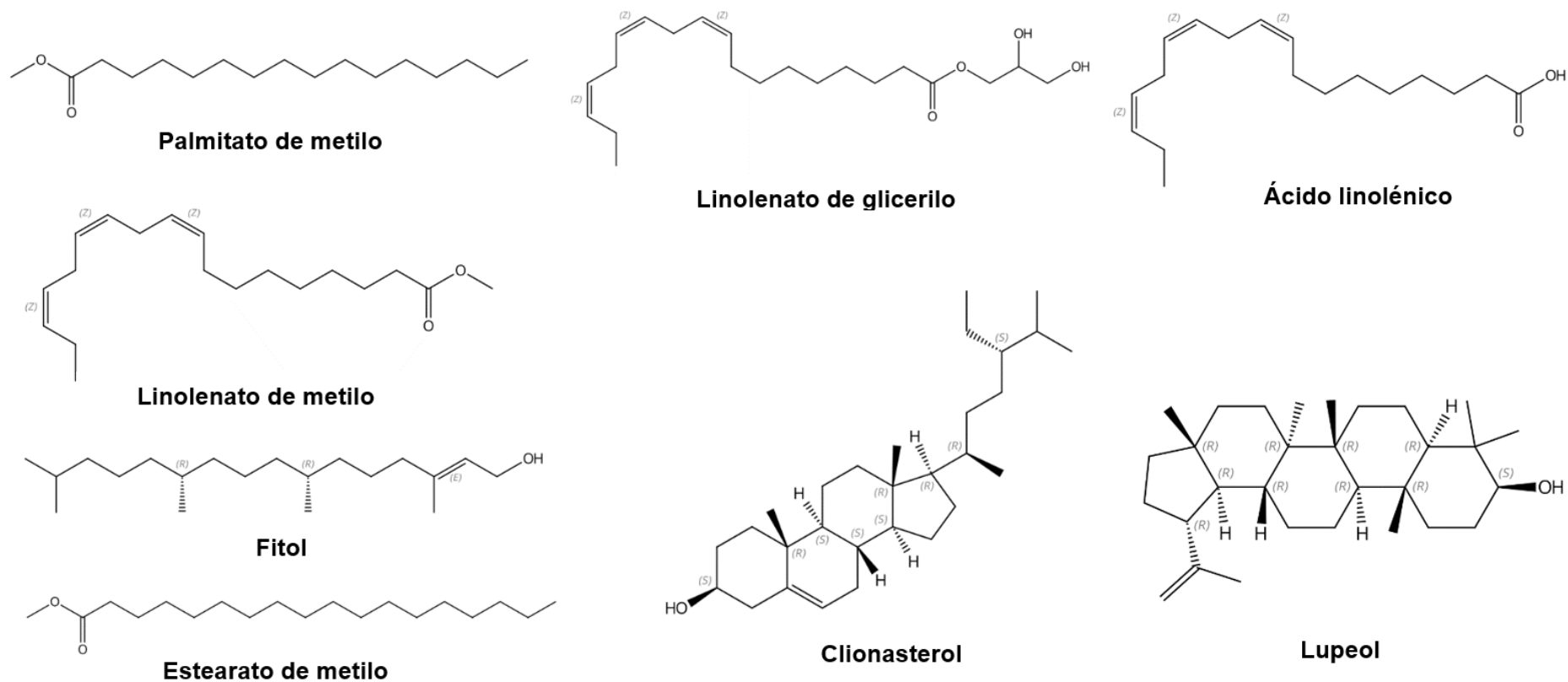


Figura 5. Estructuras químicas de los compuestos preliminarmente identificados por GC-MS.

Benzamida (1), Aspidocarpina (2), 8-Hidroxilinalool (3), 2-Fenilacetamida (4), Tirosol (5), 8-hidroxicarvotanacetona (6), Hidroxitolueno butilado (7), 2,4-dihidroxibenzoato de metilo (8), 2-metoxibenzamida (9), Antiarol (10), Coniferol (11), Loliolida (12), 3-(4-hidroxbutil)-2-metilciclohexanona (13), Dihidosiringenina (14), Palmitato de metilo (15), Linolenato de metilo (16), Fitol (17), Estearato de metilo (18), Ácido linolénico (19), Linolenato de glicerilo (20), Clionasterol (21), Lupeol (22).

Fuente: CAS SciFinder

CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados revelan la diversidad de compuestos con potencial anticancerígeno presentes en *cf. Aspidosperma excelsum* destacando así, la importancia de realizar estudios fitoquímicos bioguiados orientados a buscar o confirmar principios bioactivos.

Se pudo encontrar y caracterizar de manera preliminar metabolitos prometedores tales como 8-Hidroxicarvotanacetona, Fitol, Clionasterol y Lupeol, los cuales han sido reportados en la literatura como prometedores agentes anticancerígenos en distintas líneas celulares humanas. Cabe destacar que el Fitol sobresale entre los mencionados por presentar una elevada citotoxicidad frente a MCF-7 específicamente, línea celular humana en la que el extracto alcaloideo fue evaluado en esta investigación.

Asimismo, otro extracto que sobresale entre los obtenidos, es la fracción de AcOEt debido a que la placa de CCF de dicha fracción reveló 3 metabolitos con RF similares a las del extracto de cloroformo por lo que resulta óptimo para una extracción y/o purificación inicial mediante cromatografía de columna y así, poder evaluar estos metabolitos en las líneas celulares MCF-7 y PNT2 e inclusive en las líneas evaluadas por Cotacachi y poder constatar un posible o no aumento en la actividad citotóxica de estos extractos.

Las actividades a contemplar en futuros trabajos podrían enfocarse en el extracto de cloroformo y la partición de acetato de etilo que al tener ambos una actividad biológica mínima en las líneas celulares MCF-7 y PNT2 y mostrar productos con los mismos Rf en TLC, se podría aislar los metabolitos presentes en extracto mediante cromatografía en columna y determinar si es que la actividad biológica en estas dos líneas celulares aumenta en los productos aislados.

Para llevar a cabo un análisis más detallado de los alcaloides presentes en la especie se recomienda inyectar la fracción de hexano por GC-MS pero para identificar los posibles compuestos responsables de la actividad anticancerígena se inyectaría el extracto de cloroformo y fracción de AcOEt por HPLC-MS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*. 2020;10: 221. doi:10.3390/biom10020221
2. Bustamante H. Determinación de cardenólidos y actividad antiproliferativa de *Asclepias subulata* (Decne 1844) cultivada bajo estrés hídrico para el desarrollo de un potencial fitofármaco. Universidad de Sonora. 2018. Available: <http://148.225.114.121/handle/unison/4193>
3. Mayanga-Herrera A, Tapia-Rojas S, Fukusak- Yoshizawa A, Marcelo-Rodríguez Á, Amiel-Pérez J. Actividad citotóxica de la fracción clorofórmica de *Piper aduncum* y su efecto en el ciclo celular en líneas celulares de cáncer gástrico. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2020;37: 471–7. doi:10.17843/rpmesp.2020.373.5157
4. Montenegro, H. E., & Pineda D. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE HOJAS MADURAS DE *MYROSPERMUM FRUTESCENS*. *Rev Investig la Univ Panamá*. 2018;28. Available: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/342/3421366008/html/>
5. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng*. 2013;117: 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
6. Cevallos-Morillo C, Cisneros-Pérez P, Llive R, Ricaurte M, Reinoso C, Meneses MA, et al. Croton lechleri Extracts as Green Corrosion Inhibitors of Admiralty Brass in Hydrochloric Acid. *Molecules*. 2021;26: 7417. doi:10.3390/molecules26247417
7. Oliva Flores IC. Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos, de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: *Litsea glaucescens* HBK y *Litsea guatemalensis* Mez. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA. 2012. Available: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3288.pdf
8. Cuevas J. Perfil de alcaloides de algunas especies de la familia Cactaceae. 2018. Available: <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/1598/SSIT0015486.pdf?sequence=1>
9. Arévalo Torres, O. J. M., & Rengifo Pezo JA. AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ALCAOIDES INDÓLICOS DE LA CORTEZA DE *Aspidosperma schultesii* (Quillo Bordon). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. 2013. Available: https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/2961/T_615_321_A_68.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. Kagan IA, Flythe MD. Thin-layer Chromatographic (TLC) Separations and Bioassays of Plant Extracts to Identify Antimicrobial Compounds. *J Vis Exp*. 2014. doi:10.3791/51411
11. Chavez Caiza JC. Análisis de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de chiriyuyo (*Kalanchoe pinnata*) en muestras de agua cruda de diferentes fuentes. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR. 2017. Available: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/11537/1/T-UCE-0017-0039-2017.pdf>

12. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830: 3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008
13. Bhadane BS, Patil MP, Maheshwari VL, Patil RH. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phyther Res.* 2018;32: 1181–1210. doi:10.1002/ptr.6066
14. Ghosh S, Mahadani P, Sharma G. Identification of ethnomedicinal plants (Rauvolfioideae: Apocynaceae) through DNA barcoding from northeast India. *Pharmacogn Mag.* 2013;9: 255. doi:10.4103/0973-1296.113284
15. de Almeida VL, Silva CG, Silva AF, Campana PRV, Foubert K, Lopes JCD, et al. Aspidosperma species: A review of their chemistry and biological activities. *J Ethnopharmacol.* 2019;231: 125–140. doi:10.1016/j.jep.2018.10.039
16. Gracia M. CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO. 2009. Available: https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf
17. Correa-Barbosa, J., da Silva, M. C. M., Percário, S., Brasil, D. D. S. B., Dolabela, M. F., & Vale V. Aspidosperma excelsum y su potencial farmacológico: estudios in silico de predicción farmacocinética, actividad toxicológica y biológica. 2020. doi:10.33448/rsd-v9i10.8635
18. Montané X, Kowalczyk O, Reig-Vano B, Bajek A, Roszkowski K, Tomczyk R, et al. Current Perspectives of the Applications of Polyphenols and Flavonoids in Cancer Therapy. *Molecules.* 2020;25: 3342. doi:10.3390/molecules25153342
19. Cvejić J, Atanacković Krstonošić M, Mikulić M, Miljić U. Polyphenols. *Nutraceutical and Functional Food Components.* Elsevier; 2022. pp. 243–312. doi:10.1016/B978-0-323-85052-0.00012-X
20. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5: e47. doi:10.1017/jns.2016.41
21. LÓPEZ LUENGO MT. Flavonoides | *Offarm.* Offarm. 2002. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-flavonoides-13028951#:~:text=Los flavonoides se clasifican a,flavononas y sus correspondientes heterósidos>.
22. Guerrero Aleaga ND. Caracterización fitoquímica y actividad biológica de *Oryctanthus Spicatus* (Loranthaceae). Universidad Politécnica Salesiana. 2014. Available: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7084/1/UPS-QT05854.pdf>
23. Dey A, Mukherjee A, Chaudhury M. Alkaloids From Apocynaceae. 2017. pp. 373–488. doi:10.1016/B978-0-444-63931-8.00010-2
24. Valeria Romeo F, Fabroni S, Ballistreri G, Muccilli S, Spina A, Rapisarda P. Characterization and Antimicrobial Activity of Alkaloid Extracts from Seeds of Different Genotypes of *Lupinus* spp. 2018. doi:10.3390/su10030788
25. Ravi BG, Guardian MGE, Dickman R, Wang ZQ. Profiling and structural analysis of cardenolides in two species of *Digitalis* using liquid chromatography coupled with high-resolution mass

- spectrometry. *J Chromatogr A*. 2020;1618: 460903. doi:10.1016/j.chroma.2020.460903
26. Cotacachi Latacumba PE. Identification of Oleandrin and other Cardenolides with Anticancer Activity in Methanolic Extracts from Plants of the Apocynaceae Family. Universidad Regional Amazónica Ikiam. 2020. Available: https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/557
 27. Krishna, A. B., Manikyam, H. K., Sharma, V. K., & Sharma N. Plant Cardenolides in Therapeutics. *Int J Indig Med Plants*. 2015. Available: https://www.researchgate.net/profile/Vinay-Kumar-Sharma/publication/282148235_Plant_Cardenolides_in_Therapeutics/links/5604db5a08ae8e08c08ac276/Plant-Cardenolides-in-Therapeutics.pdf
 28. Diederich M, Muller F, Cerella C. Cardiac glycosides: From molecular targets to immunogenic cell death. *Biochem Pharmacol*. 2017;125: 1–11. doi:10.1016/j.bcp.2016.08.017
 29. Wen S, Chen Y, Lu Y, Wang Y, Ding L, Jiang M. Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. *Fitoterapia*. 2016;112: 74–84. doi:10.1016/j.fitote.2016.04.023
 30. Rebouças S de O, da Silva J, Bertoni RS, Decker N, Santos MS dos, Rossatto RR, et al. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. *J Ethnopharmacol*. 2013;147: 474–480. doi:10.1016/j.jep.2013.03.041
 31. Toro-Uribe S, Ibañez E, Decker EA, Villamizar-Jaimes AR, López-Giraldo LJ. Food-Safe Process for High Recovery of Flavonoids from Cocoa Beans: Antioxidant and HPLC-DAD-ESI-MS/MS Analysis. *Antioxidants*. 2020;9: 364. doi:10.3390/antiox9050364
 32. Arai MA, Akamine R, Hayashi N, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. The Notch Inhibitors Isolated from *Nerium indicum*. *J Nat Prod*. 2018;81: 1235–1240. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b01031
 33. Basiru, A., Ibukun, E., Edobor, G., Ojo, O., Onikanni S. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF PHYTOCHEMICALS IN SENECIO BIAFRAE LEAF. 2013. Available: https://www.researchgate.net/publication/256564657_QUALITATIVE_AND_QUANTITATIVE_ANALYSIS_OF_PHYTOCHEMICALS_IN_SENECIO_BIAFRAE_LEAF
 34. S. K. Malik MA& FK. QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ESTIMATION OF TERPENOID CONTENTS IN SOME IMPORTANT PLANTS OF PUNJAB. *Pak J Sci*. 2017;69. Available: https://www.researchgate.net/publication/318224877_QUALITATIVE_AND_QUANTITATIVE_ESTIMATION_OF_TERPENOID_CONTENTS_IN_SOME_IMPORTANT_PLANTS_OF_PUNJAB_PAKISTAN
 35. Arauz GEU. Estudio químico de un extracto alcaloideo de *Latua pubiflora* (Griseb (Latúa) y evaluación farmacológica de los compuestos alcaloideos. Universidad Austral de Chile. 2004. Available: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fcu.42e/pdf/fcu.42e.pdf>
 36. Medina MB. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. *J Agric Food Chem*. 2011;59: 1565–1571. doi:10.1021/jf103711c
 37. Wang W, Li J, Zhang H, Wang X, Fan J, Zhang X. Phenolic compounds and bioactivity evaluation of aqueous and methanol extracts of *Allium mongolicum* Regel. *Food Sci Nutr*. 2019;7: 779–787.

doi:10.1002/fsn3.926

38. Morsy N. Quantitative estimations of the abundant constituents of *alotropis procera*. *Main Gr Chem*. 2017;16: 17–26. doi:10.3233/MGC-160218
39. Calderón-Montaño J, Burgos-Morón E, Orta M, Mateos S, López-Lázaro M. A Hydroalcoholic Extract from the Leaves of *Nerium oleander* Inhibits Glycolysis and Induces Selective Killing of Lung Cancer Cells. *Planta Med*. 2013;79: 1017–1023. doi:10.1055/s-0032-1328715
40. Trujillo-Chacón LM, Pastene-Navarrete ER, Bustamante L, Baeza M, Alarcón-Enos JE, Cespedes-Acuña CL. In vitro micropropagation and alkaloids analysis by GC–MS of Chilean Amaryllidaceae plants: *Rhodophiala pratensis*. *Phytochem Anal*. 2020;31: 46–56. doi:10.1002/pca.2865
41. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., & Verdian-rizi M. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J Pharm Sci*. 2008.
42. Mohammed AE, Abdul-Hameed ZH, Alotaibi MO, Bawakid NO, Sobahi TR, Abdel-Lateff A, et al. Chemical Diversity and Bioactivities of Monoterpene Indole Alkaloids (MIAs) from Six Apocynaceae Genera. *Molecules*. 2021;26: 488. doi:10.3390/molecules26020488
43. Pereira M de M, Jácome RLRP, Alcântara AF de C, Alves RB, Raslan DS. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Quim Nova*. 2007;30: 970–983. doi:10.1590/S0100-40422007000400037
44. de Araújo JX, Antheaume C, Trindade RCP, Schmitt M, Bourguignon J-J, Sant’Ana AEG. Isolation and characterisation of the monoterpene indole alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. *Phytochem Rev*. 2007;6: 183–188. doi:10.1007/s11101-006-9044-y
45. Chávez Gonzales, Luz Marina; Gutiérrez Condori DA. Estudio fitoquímico y evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *Tanacetum vulgare* L., ‘Palma real.’ Universidad Privada Norbert Wiener. 2013. Available: [http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/52/014 EAP FARMACIA Y BIOQUIMICA ESTUDIO FITOQUIMICO PALMERA REAL %28 CHAVEZ y GUTIERREZ%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/52/014_EAP_FARMACIA_Y_BIOQUIMICA_ESTUDIO_FITOQUIMICO_PALMERA_REAL_%28_CHAVEZ_y_GUTIERREZ%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
46. Dueñas-Deyá, A., Castañeda-Bauta, R., Martín-Cruz, L., Ojito-Ramos, K., & Guerra-de-León JO. Estudio fitoquímico de la especie endémica cubana *Zanthoxylum pseudodumosum*, una planta con potencial actividad antifúngica. *Rev Cuba Química*. 2020;32: 406–419. Available: <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v32n3/2224-5421-ind-32-03-406.pdf>
47. Contreras J. Resistencia de células de adenocarcinoma de cervix humano (HeLa) al veneno del alacrán mexicano *Centruroides limpidus limpidus*. Universidad Autónoma del Estado de México. 2013. Available: [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/64377/MCARN JOSÉ MARÍA ELOY CONTRERAS ORTIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/64377/MCARN_JOSÉ_MARÍA_ELOY_CONTRERAS_ORTIZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
48. Mondal A, Gandhi A, Fimognari C, Atanasov AG, Bishayee A. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. *Eur J Pharmacol*. 2019;858: 172472. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172472

49. Palmer AC, Sorger PK. Combination Cancer Therapy Can Confer Benefit via Patient-to-Patient Variability without Drug Additivity or Synergy. *Cell*. 2017;171: 1678-1691.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.11.009
50. Valares Masa C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Universidad de Extremadura. 2011. Available: <https://dehesa.unex.es/handle/10662/477>
51. Kobayashi K. Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol Manag*. 2004;4: 1–7. doi:10.1111/j.1445-6664.2003.00112.x
52. Mogollon NGS, Ribeiro FA de L, Lopez MM, Hantao LW, Poppi RJ, Augusto F. Quantitative analysis of biodiesel in blends of biodiesel and conventional diesel by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta*. 2013;796: 130–136. doi:10.1016/j.aca.2013.07.071
53. Andrade L, Lima T, Amaral R, Pessoa C, Filho M, Soares B, et al. Evaluation of the Cytotoxicity of Structurally Correlated p-Menthane Derivatives. *Molecules*. 2015;20: 13264–13280. doi:10.3390/molecules200713264
54. Pejic B, Kojic V, Bogdanovic G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Nat Prod Res*. 2014;28: 2053–2056. doi:10.1080/14786419.2014.921686
55. Endrini S, Rahmat A, Ismail P, Taufiq-Yap YH. Cytotoxic effect of γ -sitosterol from Kejibeling (*Strobilanthes crispus*) and its mechanism of action towards c-myc gene expression and apoptotic pathway. *Med J Indones*. 2015;23: 203–8. doi:10.13181/mji.v23i4.1085
56. C. Gallo M, Sarachine M. Biological Activities of Lupeol. *Int J Biomed Pharm Sci*. 2009. Available: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0906/IJBPS_3\(S11\)/IJBPS_3\(S11\)46-66o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/0906/IJBPS_3(S11)/IJBPS_3(S11)46-66o.pdf)
57. G. M. T. R, Ahond A, Poupat C, Potier P, Jollès C, Jousselin A, et al. Aspidosperma de Guyane: Alcaloïdes de *Aspidosperma marcgravianum*. *J Nat Prod*. 1983;46: 694–707. doi:10.1021/np50029a018
58. Morales-Jadán D, Blanco-Salas J, Ruiz-Téllez T, Centeno F. Three Alkaloids from an Apocynaceae Species, *Aspidosperma spruceanum* as Antileishmaniasis Agents by In Silico Demo-case Studies. *Plants*. 2020;9: 983. doi:10.3390/plants9080983