



Evaluación citotóxica de las fracciones extraídas de Aranto (*Kalanchoe daigremontiana*)

Q. Alvarado Palacios², E. San Martín Martínez² y G. Pérez Ishiwara¹

¹ Departamento de Biomedicina, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.

Guillermo Massieu Helguera 239. Fracc. La Escalera, Ticomán D.F. C.P 07320 México D.F.

² Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional,
Legaria 694. Colonia Irrigación, 11500 México D. F.

Resumen

Se busca la evaluación citotóxica de las fracciones de aranto, con esto observar la efectividad antineoplásica comparada con otras especies de Aranto. Para esto, se realizará la caracterización etnobotánica, después las pruebas In vitro si tiene un efecto citotóxico se procede a usar técnicas cromatográficas, primero cromatografía en capa delgada (TLC), después cromatografía en columna (CC) y por último Cromatografía (HPLC). Los principios activos positivos nuevamente serán evaluados su citotoxicidad. [1]

Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte en México. Actualmente se emplea la quimioterapia y la radioterapia, pero presentan graves efectos secundarios al paciente. Se encontró que cinco bufadienolides aislado de las hojas de *Kalanchoe pinnata* y *K. daigremontiana* (Crassulaceae) fueron examinados y resulto que los bufadienolides son potenciales agentes quimiopreventivos del cáncer [2]. Los resultados de este trabajo se someteran a pruebas In vivo en ratas para verificar la efectividad del principio activo.

Procedimiento Experimental

Preparación del extracto de hojas de Aranto

Preparar según la técnica de maceración de acuerdo con cada fracción con un volumen de (10 ml): agua, etanol/agua 30:70, cloroformo, hexano, de acuerdo a su polaridad decreciente, siendo el agua la más polar, agregar 5 gramos de hojas secas y pulverizadas, filtrar para obtener la solución y concentrar a sequedad (aprox. 40 °C) para obtener el extracto de cada fracción seco.

Pruebas Citotóxicas In Vitro

La actividad citotóxica fue determinada de acuerdo con el método de [1]. El cual evalúa la citotoxicidad de las muestras en la línea celular: cáncer de glándula mamaria (MCF – 7), proporcionadas por la ENMH. Dicha línea celular será inoculada en microplatos de 96 posillos y llevada a incubación por 24 horas a 37 °C con 5 % CO₂. Al cabo de 24 horas se adicionarán las muestras a estas fracciones procedentes del extracto de Aranto, incubar por 48 horas. Retirar los microplatos de la incubadora, dejar reposar por 5 min. y realizar la fijación de las células con ácido tricloroacético. Teñir los microplatos con una solución de sulforodamina por 15 min, luego enjuagar con ácido acético 1% y secar al aire. Adicionar Tris base 10 mM a cada posillo del microplato y se colocará en el lector de platos ELISA (Inc Modelo ELX –

1200). Aquellas fracciones que presenten un porcentaje de crecimiento de células cancerosas (%G) menor al 50 %, serán ensayadas nuevamente, para determinar finalmente la GI₅₀ (concentración a la cual se inhibe el 50 % del crecimiento de las células cancerosas), se considerarán activas aquellas fracciones con una GI₅₀ menor a 10 μ m/ml.

Cromatografía líquida delgada (TLC)

Se usará como muestra problema el extracto de cada fracción; para la fase fija se ocuparán placas de silicagel (Sigma Aldrich) y con la ayuda de un capilar (2-3 dosis), secar a temperatura ambiente para que el diámetro de la muestra no sea mayor a 0.5 cm, para la fase móvil; diferentes solventes (10 ml): agua, etanol/agua 30:70, cloroformo, hexano, de acuerdo a su polaridad decreciente, y como reveladores: Yodo y ácido sulfúrico al 10%, luz UV a 254 nm.

Cromatografía de Columna (CC)

Preparar una columna con 150 g de silicagel 60 en hexano CH₂Cl₂ (1:1). El extracto se colocará en un vaso de precipitados de 50 ml, correr la muestra en la columna cromatográfica de 50 cm de longitud y emplear los siguientes sistemas de elusión de polaridad creciente.

Diclorometano CH₂Cl₂, Diclorometano: Acetato de Etilo CH₂Cl₂: EtOAc (1:1), CHCl₃: MeOH (1:1).

Técnica HPLC

El análisis se realizará sobre un Equipo HPLC Walter. El software del equipo fue Milenio 32. La columna es una C18 de 3.9 x 300 mm. Para la separación e identificación se realizará por cromatografía HPLC, colocar 3 gotas de la muestra (0.5 g), en 25 ml de disolvente, previo a la inyección a la columna filtrar las muestras con una membrana Millipore de 0.45 mm. Para fase móvil se utilizará un sistema binario, de los cuales ácido fórmico al 0.2 % (un disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B). [3]

Referencias

- 1) A. Jorge, G. Prashad, B. Vasquez, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. **22**: 004 (2005)
- 2) U. Supratman, T. Fujita, K. Akiyama, H. Hayashi, A. Murakami, H. Sakai, K. Koshimizu, H. Ohigashi, *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 947-949 (2001)
- 3) C. Yang, Z. Lvlon, L. Qionglin, B. Kaishun, W. Yiming, L. Guoan, *Journal of Chromatography B*, **853**: 227–233 (2007)