

Especialización en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
JUAN N. CORPAS

Educación y Salud de Calidad
con Sentido Social

Trabajo de grado

Evaluación de actividad citotóxica de los extractos vegetales de
Chromolaena tacotana en células de cáncer de mama humano

Carlos Alberto Durán Quintero
Fernando Alexander Gómez Moreno
Leidy Viviana Castañeda Borda

FUNDACION UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y
FARMACOLOGÍA VEGETAL
BOGOTÁ D.C.
2021

Evaluación de actividad citotóxica de los extractos vegetales de *Chromolaena
tacotana* en células de cáncer de mama humano

Carlos Alberto Durán Quintero
Fernando Alexander Gómez Moreno
Leidy Viviana Castañeda Borda

Trabajo de investigación estudio primario

Director
Gina Marcela Méndez Callejas, MSc, PhD
Codirector
Diego Ricardo Muñoz Cendales, MSc, PhD

ESCUELA DE MEDICINA JUAN N. CORPAS
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y
FARMACOLOGÍA VEGETAL
BOGOTÁ D.C.
2021

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Bogotá, 26 de Noviembre de 2021

DEDICATORIA

A mi esposo (a) e hijos por su apoyo incondicional y sus consejos durante el transcurso de esta etapa académica por lo cual permitieron brindarme el aliento necesario para la culminación de mis estudios; Además por depositar toda su confianza en esta especialización. Solamente palabras de agradecimiento y de gratitud a ellos. A mis hermanos (as) y padres que hacen parte de mi familia porque los logros obtenidos sean un motivo de orgullo y de bienestar

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela de Medicina Juan N Corpas y a todos sus docentes que nos formaron como Especialistas en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal permitiendo así poder continuar nuestra labor de ayuda con la adquisición de estos nuevos conocimientos permitiéndonos continuar la constante búsqueda de bienestar de cada una de las personas que lo necesitan.

A los profesores Gina Méndez y Diego R. Muñoz, por brindarnos su apoyo y abriarnos las puertas de los laboratorios de Investigación en Productos Naturales y en Investigaciones Biomédicas y en Genética Humana y Aplicada de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, para realizar el desarrollo experimental de este trabajo y por ayudarnos en nuestra formación como nuevos investigadores, orientándonos y dedicándonos su tiempo para compartir con nosotros sus amplios conocimientos en este tema tan maravilloso que nos permitió como médicos explorar nuevos campos de la ciencia.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, por la financiación de esta investigación mediante el proyecto: "Relación estructura-actividad anti-cáncer de flavonoides aislados de *Chromolaena tacotana* sobre líneas celulares cancerosas de mama, próstata y cérvix" Código 125484467618, convocatoria 844-2019" -Contrato-407 de 2020.

Al Ministerio de Medio Ambiente por el otorgamiento del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados N° 291 del 21 de julio de 2020 suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, por medio del cual se ampara el uso para investigación del material vegetal que hace parte de esta investigación.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	13
1.1 OBJETIVO GENERAL	
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.2.1 DEFINICIÓN	
1.2.2 JUSTIFICACIÓN	14
1.3 MARCO TEÓRICO	15
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	18
1.4.1 MATERIALES	
1.4.2 METODOLOGÍA	
1.5 DESARROLLO DEL PROYECTO	20
1.5.1 ANÁLISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO	
1.6 CRONOGRAMA	25
1.7 CONCLUSIONES	26
1.8 RECOMENDACIONES	27
1.9 BIBLIOGRAFÍA	16

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Chromolaena tacotana</i>	15
Tabla 2. Material vegetal y obtención de extractos de los diferentes órganos de <i>C. tacotana</i>	21
Tabla 3. Valores de Concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) presentados por los diferentes extractos de las hojas, flores y madera de <i>C. tacotana</i> en la línea celular de cáncer de mama humano MCF7	22

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. <i>Chromolaena tacotana</i> en estado de floración	16
Figura 2. Proceso de molienda de hojas, inflorescencias y madera de <i>Chromolaena 19 tacotana</i>	20
Figura 3. Extracción por maceración con etanol al 96% de cada parte de la planta	20
Figura 4. Preparación de extractos etanólicos de los órganos de <i>C. tacotana</i>	21
Figura 5. Curvas de viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, presentadas por los diferentes extractos de las hojas (A, B, C), flores (D, E, F) y madera (G, H) de <i>C. tacotana</i>	23

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Imágenes de los datos obtenidos para las lecturas de los platos de 96 pozos.	30
Anexo B. Tablas en excel de los datos normalizados y organizados por las concentraciones evaluadas	31
Anexo C. Tablas en excel de los datos normalizados y organizados a las concentraciones evaluadas para los extractos evaluados en la línea celular MDAMB231	32

GLOSARIO

- 1. MTT:** Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT. Es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y con color amarillo, al reducirse, se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo se suele disolver en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido). Se considera que la acción sobre el MTT se debe principalmente a las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa, pero también pueden intervenir reductasas citosólicas o de otros compartimentos subcelulares. Las coenzimas reducidas resultantes (NADH Y NADPH) convertirán el MTT en su formazano.
- 2. DMSO:** El dimetilsulfóxido, es un líquido orgánico incoloro de fórmula química CH_3SOCH_3 que contiene sulfóxido, usado como disolvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 el DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos.
- 3. DMEM:** (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM), es el medio más adecuado para muchos fenotipos de células adherentes entre los medios definidos para el cultivo de células y tejidos. Es una fórmula complementaria mejorada que aumenta hasta cuatro veces el contenido de aminoácidos y vitaminas seleccionados del medio original.

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el potencial citotóxico de la planta *Chromolaena tacotana* frente a las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231. Inicialmente se preparó un extracto con etanol al 96% de las diferentes partes de la planta (hojas, madera y flores) secas y molidas para realizar un fraccionamiento posterior por Soxhlet de cada uno de los extractos, utilizando los solventes éter de petróleo, diclorometano y metanol en polaridad creciente. Cada uno de los extractos obtenidos fue evaluado en concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ frente a las dos líneas celulares, encontrando que ocho de los doce extractos evaluados presentaron actividad citotóxica en la línea celular MCF7, mientras que los extractos no mostraron ser citotóxicos en la línea celular MDAMB231. El extracto con mayor potencial citotóxico fue el extracto en diclorometano de las hojas, a partir del cual se obtuvo un IC_{50} de 47,0 $\mu\text{g/mL}$, seguido del extracto en éter de hojas IC_{50} de 78,8 $\mu\text{g/mL}$) y posteriormente del extracto en diclorometano de las flores con un valor de IC_{50} de 93,6 $\mu\text{g/mL}$.

Palabras Clave: *Chromolaena tacotana*, citotoxicidad, planta medicinal, cáncer.

INTRODUCCION

Desde tiempos remotos las plantas fueron utilizadas como herramientas para la prevención y el tratamiento de enfermedades basadas en las teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas de manera empírica. Durante siglos esta practica fue considerada como el sistema medico principal, pero con el paso de los años, durante la globalización los tratamientos tradicionales no fueron un objetivo relevante para la investigación clínica (1) cobrando fuerza la medicina occidental e imponiendo así sus tratamientos alopáticos basándose en los diferentes estudios, eficacia y la seguridad de estos.

De nuevo la medicina tradicional, incrementa su demanda gracias al reconocimiento, apoyo y aval de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2), actualmente se trabaja de manera integral con la medicina convencional usando los tratamientos alopáticos estandarizados científicamente y las practicas tradicionales caracterizadas por sus enfoques individualizados no convencionales que ayudan de manera conjunta a preservar la salud de los pacientes (3-4). El uso de las plantas medicinales ha adquirido un gran interés, por lo que se han realizado múltiples estudios acerca de sus propiedades y actividades biológicas.

Colombia es el segundo país del mundo con mayor biodiversidad biológica y por su ubicación geográfica cuenta con una gran variedad de especies vegetales que poseen gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, como lo son los sesquiterpenos, triterpenos, cumarinas y flavonoides con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas que contribuyen para la atención de enfermedades prevalentes según los datos de mortalidad y morbilidad más recientes (5-6).

La planta *Chromolaena tacotana* es una de esas especies vegetales, que pertenecen a la familia Asteraceae y se caracteriza por contener compuestos químicos con potencial biológico frente a células de cáncer humano (7). Esta especie ha sido objetivo de múltiples estudios donde se ha reportado que su principal grupo de metabolitos secundarios presentes en hojas e inflorescencias son los flavonoides, los cuales han presentado una potente actividad antioxidante y anticancerígena, demostrada en distintas líneas celulares de cáncer humano (8-9). En este trabajo se evaluará el potencial citotóxico de los extractos de hojas, flores y madera de *Chromolaena tacotana* obtenidos por extracción con solventes de distinta polaridad, frente a una de las patologías mas relevantes de nuestro país como es el cáncer de mama, por medio de las líneas celulares de cancer de mama humano MCF7 y MDAMB231.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades citotóxicas de *Chromolaena tacotana* en células de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231.

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos etanólicos por maceración de las hojas, flores y madera de *Chromolaena tacotana*.
- Realizar el fraccionamiento de cada uno de los extractos etanólicos por medio de Soxhlet con solventes en polaridad creciente, utilizando Éter de petróleo, Diclorometano y Metanol.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos obtenidos sobre las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231 por medio del ensayo del MTT.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en mujeres de todo el mundo y es considerado como el segundo tipo de cáncer que más muertes causa al año en este grupo poblacional. Actualmente el cáncer es una enfermedad considerada como un problema de salud pública y cada vez los tratamientos médicos utilizados en las quimioterapias están presentando mayores problemas de resistencia y toxicidad, disminuyendo considerablemente la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad. Los productos naturales históricamente han sido la base de la medicina tradicional y ofrecen una fuente inmensurable de nuevas moléculas con gran potencial antitumoral, lo que nos ha llevado a plantearnos la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe efecto citotóxico con el extracto alcohólico de *Chromolaena tacotana* en las células de cáncer de mama humano?

1.2.2 JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama en América Latina y el Caribe es considerado como una enfermedad de alto costo y es la segunda causa de mortalidad en las mujeres. Se estima que más de 462.000 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama y aproximadamente 100.000 mueren a causa de esta enfermedad cada año. Desafortunadamente los sistemas de salud cuentan con recursos limitados por tal motivo y debido a la inequidad, desconocimiento y falta de adecuados programas de prevención se han incrementado progresivamente las cifras de mortalidad (10).

Los tratamientos convencionales para el control de este tipo de patologías son muy costosos, además han demostrado ser poco efectivos y muy agresivos contra las células sanas subyacentes, generando en ocasiones complicaciones o efectos no deseados en los pacientes, mientras que los basados en plantas medicinales suelen ser de más bajo costo, de fácil acceso y generan menos efectos nocivos. Es así, que en la actualidad se ha acentuado el interés en realizar investigaciones que demuestran la efectividad de estas terapias alternativas, un ejemplo de ello son los estudios con las plantas que pertenecen al género *Chromolaena* (Asteraceae), donde algunas especies vegetales como *Chromolaena tacotana*, ha demostrado tener una amplia gama de actividades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras demostrando que pueden ser útiles para tratamientos de patologías prevalentes como el cáncer humano (6).

Por esta razón y teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se evaluará si existen propiedades citotóxicas de los diferentes extractos obtenidos de los órganos de *Chromolaena tacotana* en células de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231, con el fin de aportar posibles datos relevantes y así poder contribuir en avances farmacológicos futuros.

1.3 MARCO TEÓRICO

La familia *Asteraceae* es una de las familias de plantas con flores más grandes, con aproximadamente 130 especies que conforman el género, a pesar de su diversidad la mayoría de los miembros comparten acción caracterizada por una fuerte actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (6).

Colombia es un país destacado por la riqueza y diversidad de su flora con una amplia variedad de géneros de plantas, dentro de los que se destacan el género *Chromolaena* que se caracteriza por poseer múltiples metabolitos secundarios, como son los sesquiterpenos, triterpenos, prostaglandinas y compuesto de tipo fenólico tales como cumarinas y flavonoides, los cuales se han caracterizado por presentar un amplio espectro en diferentes tipos de actividades biológicas, especialmente contra el cáncer debido al efecto antioxidante y citoprotector que ejercen en las células (7).

La especie *Chromolaena tacotana* ha sido objetivo de estudios en los últimos años ya que se han aislado flavonoides citotóxicos en sus hojas e inflorescencias y cuyo potencial anticancerígeno ha sido demostrado en distintas líneas celulares de cáncer humano (8-9). Esta especie vegetal pertenece al género *Chromolaena* (*Asteraceae*) y su clasificación taxonómica se encuentra en la tabla 1. Es conocida con el nombre común de “almodraduz, chicharrón, chilquilla, chucha, salvia morada, sanalotodo” y se distribuye a lo largo del territorio nacional especialmente en las regiones Andina y del Caribe entre los 400 y 3470 m de altitud. Es un *arbusto* que mide hasta 2.5 metros de altura, crece en hábitats ecológicos, crece principalmente en borde de carreteras y caminos, bosques secundarios, matorrales, rastrojos, vegetación achaparrada, potreros y alrededores de lagunas. Además, se ha observado creciendo entre laderas potrerizadas con abundantes arrayanes, sabanas y remanentes de bosque con ramas cilíndricas, cubiertas por indumento piloso largo y denso. Hojas pecioladas de 2 cm de largo, ápice agudo, base cuneada u obtusa y margen aserrada-crenada, venas principalmente asimétricas con tonalidad ocasional violeta o Vinotinto. Sus ramas inferiores 4-40 cm de largo con porción terminal fértil 2-15 cm de largo y 9-184 capítulos, porción vegetativa 2-28.5 cm de largo, ebracteada o hasta con 13 pares de brácteas (10).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Chromolaena tacotana*

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Tribu	Eupatorieae
Género	<i>Chromolaena</i>
Especie	<i>Chromolaena tacotana</i> (klatt) R.M. King & H. Rob.



Figura 1. *Chromolaena tacotana* en estado de floración.

Según la Organización Panamericana de la Salud, el cáncer constituye la segunda causa principal de muerte en la América, la mayor frecuencia de diagnóstico de esta patología en hombres y mujeres corresponde a próstata (21.7%) y de mama (25.2%) respectivamente (11). Con el paso del tiempo se han determinado que debido a la complejidad de la enfermedad el tratamiento ideal debe ser basado principalmente en la cirugía, radiación y la quimioterapia, la selección de uno de ellos o su combinación depende de la etapa en la que se encuentre el tumor.

Actualmente, el principio de acción de estos fármacos se basa en inhibir el potencial replicativo celular, por lo que estos medicamentos también pueden ocasionar muerte a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente como son las células de la sangre causando graves efectos secundarios, en ocasiones más severos que la misma enfermedad. Por esta razón, las investigaciones más recientes tratan de enfocar la acción de los tratamientos directamente sobre las células tumorales incrementando la eficacia, reduciendo los efectos secundarios, con el fin de mejorar la calidad de vida del paciente (12).

Existe un gran número de trabajos relacionados con la búsqueda de compuestos que tengan la capacidad de combatir la enfermedad del cancer, sin afectar la salud física de los pacientes, con menos efectos nocivos y por el contrario garantizar el beneficio sin daño asociado, como se le atribuyen por ejemplo a los polifenoles que según numerosos estudios poseen un potente efecto como agentes antioxidantes y antiinflamatorios, así como la capacidad de modular diferentes eventos moleculares y vías de señalización asociadas con la supervivencia,

proliferación, diferenciación, migración, actividades hormonales y respuestas inmunes (13-14). Este es el caso del Polifenol E (único medicamento botánico aprobado por la FDA), el cual es una mezcla preparada de hojas de *Camelia sinensis* conocida como Planta de Té, que contiene compuestos fenólicos del tipo catequinas (15) conocidas por su acción antioxidante y citotóxica, las cuales ayudan a la protección celular de diferentes daños que incrementan el riesgo de cáncer. Es por esta razón, que en la actualidad se continúa estudiando diferentes especies vegetales con el fin de aportar efectos benéficos no convencionales, que puedan ayudar a conservar la salud mediante la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento obteniendo óptimos resultados, minimizando efectos nocivos y evitando así afectar el bienestar físico, mental y emocional en pacientes con patologías como el cáncer entre otras (16-17).

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 MATERIAL VEGETAL

La especie *Chromolaena tacotana*, fue colectada por los investigadores Gina Mendez, Crispin Celis y Diego Muñoz, el día 29 de enero de 2021 en la vía que conduce de San Francisco a La Vega (Cundinamarca). Coordenadas 5°0'51" N - 74°20'51" O; 1100 msnm. Un espécimen fue depositado en el Herbario de la Universidad Javeriana, donde el material vegetal fue clasificado por el biólogo Nestor García en el Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana, con el número de colección HPUJ30170.

1.4.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los diferentes órganos de *Chromolaena tacotana* se sometieron a un proceso de secado a la sombra y una posterior molienda. Luego el material vegetal seco y molido se sometió a un proceso de extracción por maceración con etanol al 96%, tanto para las flores, como las hojas y los tallos. Posteriormente, el solvente fue recuperador con ayuda de rotavapor y se obtuvieron los extractos etanólicos para cada órgano de la planta por separado. Después, los extractos etanólicos obtenidos fueron mezclados en un mortero con arena y sometidos a un fraccionamiento por Soxhlet utilizando solventes en polaridad creciente (éter de petróleo, diclorometano, metanol). Finalmente, se recuperaron cada uno de los solventes con ayuda del rotavapor y se obtuvieron los extractos de diferente polaridad.

1.4.3 CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron para el ensayo células de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231, las cuales fueron sometidas en un medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y 1% de antibiótico (penicilina-estreptomina, Lonza) en una incubadora en atmosfera húmeda a 37 °C en 5% de CO₂.

1.4.4 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y MDA231, fueron sembradas en platos de 96 pozos (10⁴ células/ pozo) en 100 µL de medio suplementado con 10% de SFB y 1% de penicilina/estreptomina y se dejaron por 24 horas en atmosfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Luego se retiró el medio y se aplica 100 µL de medio fresco, que contiene los extractos disueltos en concentraciones seriadas de (200, 100, 50, 25, 12.5 µg/mL). Después de 24 horas se retiró el medio y posteriormente, para evaluar el efecto citotóxico de los extractos vegetales se realizó el ensayo de reducción del MTT, agregando a cada pozo 100 µL de solución de MTT (0.5 mg/mL de MTT) y se dejaron incubar los platos por 4 horas en atmosfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Finalmente se removió el sobrenadante y se agregaron 100 µL de DMSO en cada unos de los pozos, y se midió la absorbancia a 595nm en un lector de platos Elisa. Los valores

de Concentración Inhibitoria 50-IC₅₀ (concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular) para los extractos obtenidos, se calcularon por medio de una curva dosis-respuesta usando el software GraphPad Prism.

1.5 DESARROLLO DEL PROYECTO

Para obtener los extractos, se separaron los diferentes órganos de la planta y se sometieron inicialmente a un proceso de secado a la sombra y una posterior molienda (figura 2).



Figura 2. Proceso de molienda de hojas, inflorescencias y madera de *Chromolaena tacotana*

Una vez trituradas las diferentes partes de la planta, se depositaron en recipientes individuales de vidrio a los cuales se les adicionó etanol al 96%, se dejaron en maceración por un tiempo de 72 horas, con cuatro recambios de solvente cada uno, depositando la extracción total de cada órgano de la planta estudiado en un contenedor de vidrio por separado. Posteriormente se retiró el solvente sobrante de cada frasco hasta obtener los extractos etanólicos (figuras 3 y 4).



Figura 3. Extracción por maceración con etanol 96% de cada parte de la planta.



Figura 4. Preparación de extractos etanólicos de los órganos de *C. tacotana*.

Cada uno de los extractos etanólicos de *Chromolaena tacotana* (hojas, flores y madera), fueron sometidos a un fraccionamiento por Soxhlet utilizando solventes apolares, de polaridad media y polares respectivamente (éter de petróleo, diclorometano y metanol). La extracción con cada uno de los solventes se realizó de forma seriada y por periodos de 10 horas, comenzando con éter de petróleo, seguido de diclorometano y finalmente metanol. Cada extracto obtenido debe pasar de nuevo por el rotavapor para recuperar el solvente utilizado en el Soxhlet. A continuación, se relacionarán en la tabla 2 los datos del material obtenido en cada proceso descrito anteriormente.

Tabla 2. Material vegetal y obtención de extractos de los diferentes órganos de *C. tacotana*.

Tipo de extracto	Hojas (g)	Flores (g)	Madera (g)
Material vegetal seco y molido	403,2	617,9	822,0
Extracto etanólico	96,4	50,1	42,6
Extracto Eter	7,84	12,0	4,1
Extracto Diclorometano	35,8	11,6	3,4
Extracto Metanol	23,4	11,8	24,7

Posteriormente, con cada uno de los extractos obtenidos, se preparó una solución Stock (10 mg/mL) disolviendo 10 mg en 1mL de dimetil sulfoxido (DMSO) a partir de la cual se preparó la solución más concentrada tomando 40 μ L de solución Stock y diluyéndolos en 2 mL de medio suplementado para obtener la concentración de 200 μ g/mL y a partir de esta última y en concentraciones seriadas preparar las otras soluciones de extractos a evaluar (200, 100, 50, 25 y 12.5 μ g/mL).

Cada una de estas concentraciones seriadas fueron evaluadas por triplicado en las cajas de 96 pozos, previamente cultivadas con un volumen de 100 μ L de medio y 10⁴ células/pozo por un tiempo de 24h en atmósfera húmeda, con temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Después de las 24 horas se retiró el medio sobrenadante para así luego introducir la solución MTT (0,5mg/mL) y luego de 4 horas de incubación, se determinó la viabilidad celular con cada uno de los extractos, leyendo la absorbancia de cada una de las cajas a 570 nm en un lector

de placas Elisa y finalmente se trataron los datos para construir las gráficas de viabilidad celular como se muestra en Análisis y Desarrollo del proyecto.

1.5.1 ANÁLISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO

En total se evaluó el potencial citotóxico de 12 extractos que fueron obtenidos con solventes de distinta polaridad tanto de las hojas, flores y madera de la planta *C. tacotana* como se muestra en la figura 5. Para poder determinar el efecto citotóxico de los extractos obtenidos, se realizaron las curvas de viabilidad celular utilizando las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y MDAMB231. Esta viabilidad celular se determinó evaluando concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para cada uno de los extractos por un periodo de 24 horas de exposición a las células, de acuerdo a la metodología descrita anteriormente en la sección de materiales y métodos.

Los resultados mostraron que ocho de los doce extractos evaluados, presentaron un efecto citotóxico en la línea celular MCF7 y cinco de ellos mostraron valores de IC_{50} menores a 100 $\mu\text{g/mL}$, lo que demuestra el potencial citotóxico de *C. tacotana*, ya que se aprecia claramente que hay una disminución en la supervivencia celular que es dependiente de la concentración de los extractos evaluados (figura 5).

Tabla 3. Valores de Concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) presentados por los diferentes extractos de las hojas, flores y madera de *C. tacotana* en la línea celular de cáncer de mama humano MCF7.

Parte de la planta	Extracto	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Hojas	Etanol	118,5
	Eter	78,8
	Diclorometano	47,0
	Metanol	-
Flores	Etanol	90,2
	Eter	129,2
	Diclorometano	93,6
	Metanol	-
Madera	Etanol	-
	Eter	93,2
	Diclorometano	138,3
	Metanol	-

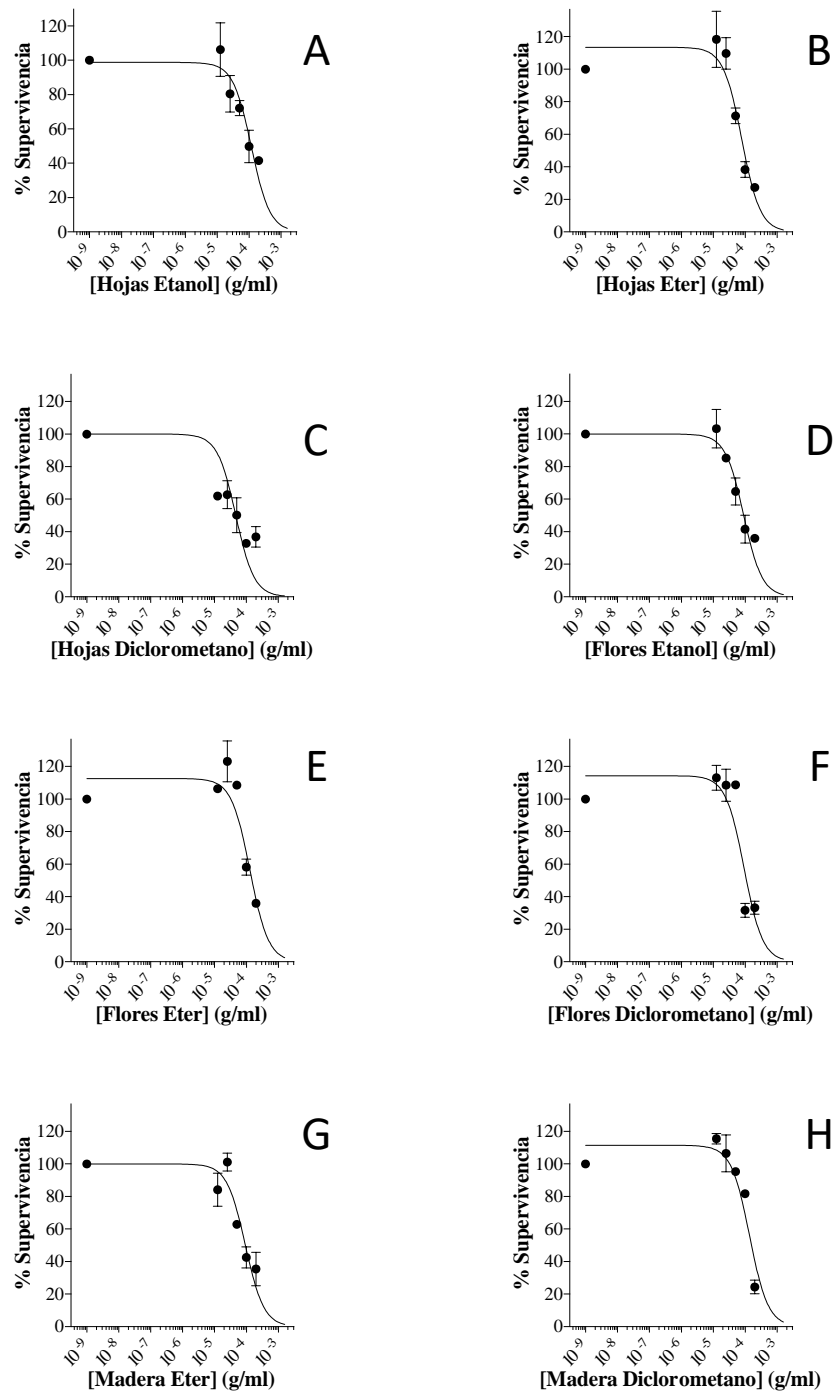


Figura 5. Curvas de viabilidad celular en la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, presentadas por los diferentes extractos de las hojas (A, B, C), flores (D, E, F) y madera (G, H) de *C. tacotana*.

Los valores obtenidos de concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) se presentan en la tabla 3. El extracto que mostró tener el mayor potencial citotóxico fue el extracto en diclorometano de las hojas, a partir del cual se obtuvo un IC_{50} de 47,0 $\mu\text{g/mL}$, seguido del extracto en éter de hojas (IC_{50} de 78,8 $\mu\text{g/mL}$) y posteriormente del extracto en diclorometano de las flores (IC_{50} de 93,6 $\mu\text{g/mL}$).

Estos resultados son consistentes con reportes previos en los cuales han demostrado la presencia de diferentes flavonoides que fueron aislados del extracto de diclorometano de las hojas de *C. tacotana* y que mostraron tener actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano de pulmón (A549), colon (HT29) y próstata (PC3) (18). Respecto a la otra línea celular evaluada en este trabajo, ningún extracto mostró tener un efecto citotóxico menor a 100 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular MDAMB231 a las concentraciones que se utilizaron en este ensayo.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los extractos etanólicos de *C. tacotana*, tienen una cierta selectividad por la línea celular MCF7 respecto a la línea celular MDAMB231. Esta selectividad puede estar dada principalmente por las diferencias entre estos dos tipos celulares de cáncer de mama, ya que las células MCF7 son positivas para receptores de estrógeno y progesterona, mientras que las células MDAMB231 son negativas para receptores de estrógeno y progesterona, lo que convierte a esta última en un tipo de cáncer más agresivo y con opciones de tratamiento limitadas, ya que el tratamiento con los medicamentos de terapia hormonal no es útil en estos tipos de cáncer.

Los estudios realizados en *C. tacotana* han demostrado la presencia de diferentes metabolitos secundarios, principalmente de tipo flavonoide que se encuentran tanto en sus hojas como en sus flores y los cuales pueden ser en gran parte, los responsables de la citotoxicidad de los extractos en las líneas celulares evaluadas. Aunque ninguno de los extractos obtenidos en metanol presentó actividad citotóxica para ninguna de las líneas celulares evaluadas, es importante resaltar que los extracto en éter de petróleo sí mostraron tener un efecto citotóxico moderado tanto para los obtenidos de madera, como para hojas y flores, razón por la cual merecen un estudio posterior mucho más profundo respecto a su contenido de metabolitos secundarios.

1.6 CRONOGRAMA

Actividad/mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Colección de la planta										
Secado y molienda										
Preparación de Extracto										
Extracción por Soxhlet										
Actividad Biológica										
Redacción del escrito										

1.7 CONCLUSIONES

De *Chromolaena tacotana*, se obtuvieron doce extractos aislados con solventes de diferentes polaridades de sus hojas, tallo y flores, evaluando la actividades citotóxica de cada uno de ellos en líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y MDAMB231. Solo ocho extractos frente a la línea celular MCF7 mostraron actividad citotóxica, de los cuales cinco mostraron valores de IC₅₀ menores de 100 µg/mL, lo que demuestra su efectividad en ocasionar algún tipo de daño celular sobre estas células mientras que en la línea celular MDAMB231 no arrojó resultados positivos.

Dentro de los extractos destacados con efecto citotóxico se encuentra el diclorometano de las hojas con un IC₅₀ de 47,0 µg/mL, seguido del extracto en éter de hojas con un valor de IC₅₀ de 78,8 µg/mL y posteriormente del extracto en diclorometano de las flores que presentó un valor de IC₅₀ de 93,6 µg/mL.

Los resultados obtenidos confirman los reportes de estudios anteriores donde se demostró que gracias a la acción de los flavonoides aislados del extracto de diclorometano de las hojas de *C. tacotana* existe una actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer humano de pulmón (A549), colon (HT29) y próstata (PC3).

1.8 RECOMENDACIONES

Es importante continuar estudiando a *Chromolaena tacotana*, ya que gracias a sus metabolitos secundarios principalmente la acción de los flavonoides se convierte en una especie de mucha riqueza científica y vale la pena seguir estudiando su potencial.

Podría convertirse en una herramienta terapéutica a futuro con la que se le dará una mejor calidad de vida a los pacientes que padecen este tipo de patologías mortales que alteran su equilibrio físico, mental y psicológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Fabio Firenzuoli y Luigi Gori, Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues, Evid Based Complement Alternat Med. 2007 Sep; 4(Suppl 1): 37–40.
2. Gustavo Nigenda, Ph.D.,(1) Gerardo Mora-Flores, B.A.,(1) Salvador Aldama-López, M.D.,(1) Emanuel Orozco-Núñez, B.A.(1), La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia, Salud pública Méx vol.43 no.1 Cuernavaca ene./feb. 2001.
3. Organización Mundial de la Salud, Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional, 2014-2023.
4. <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional>
5. https://ipt.biodiversidad.co/sib/resource?r=puj_002, Plantas medicinales endémicas de Colombia, Última versión Publicado por Pontificia Universidad Javeriana en Jan 17, 2018.
6. Agata Rolnik¹, Beata Olas¹: The Plants of the *Asteraceae* Family as Agents in the Protection of Human Health, Int J Mol Sci.2021 Mar 16;22(6):3009.doi: 10.3390/ijms22063009
7. Espitia de Perez,C, Química del género *Chromolaena*. Revista Académica de Ciencias 141-145
8. Lilian Maritza Gómez Calderón, Angie Cristina Gutiérrez Otalora, Actividad antioxidante de flavonoides de las hojas de *Chromolaena tacotana* (Klatt) R.M. King & H. Rob. Trabajo de grado, Bogotá 2016
9. Vera Delgado, Karen Alejandra, Evaluación del potencial antiproliferativo de dos chalconas Aisladas de inflorescencias de *Chromolaena tacotana* r.m. king & h. Rob sobre líneas celulares de cáncer de colon, Trabajo de grado, Bogotá 2020.
10. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11266:october-breast-cancer-awareness-month&Itemid=41587&lang=es
11. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/floradecolombia/es/description/26/>
12. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15716:country-cancer-profiles-2020&Itemid=72576&lang=es
13. Schlaepfer Loraine, Mendoza-Espinoza José Alberto, Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México, Volumen 41 • Número 4 • Octubre - diciembre 2010
14. Yue Zhou,¹ Jie Zheng,¹ Ya Li,¹ Dong-Ping Xu,¹ Sha Li,² Yu-Ming Chen,¹ and Hua-Bin Li^{1,3}, Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer, Nutrients. 2016 Aug; 8(8): 515
15. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/polyphenon-e>
16. Maritza Gallegos-Zurita^{1,a,b}, Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador, An. Fac. med. vol.77 no.4 Lima oct./dic. 2016

17. <https://scielosp.org/pdf/rpsp/2004.v16n3/218-221/es>
18. Rodriguez, J.; Gómez, L.; Gutierrez, A.; Mendez-Callejas, G.; Reyes, A.; Tellez, L.; Rodriguez, O.; Torrenegra, R. *Chromolaena tacotana* (Klatt) R. M. King and H. Rob. Source of Flavonoids with Antiproliferative and Antioxidant Activity. *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 11(19), DOI: 10.17485/ijst/2018/v11i19/12287

ANEXO A

Imágenes de los datos obtenidos para las lecturas de los platos de 96 pozos en el lector de placas ELISA.

Model 680 Microplate Reader S/N 18852		MCF72					
Raw data report		Ex 7-12					
02/09/2021 12:55:47							
Lab. name: MICROBIOLOGIA							
Kit name : MTT poInt G13							
Reading mode: Sinele							
Measurement Filter: 595nm(5)							
	1	2	3	4	5	6	
7.5	BA	0.031	0.330	0.314	0.376	0.258	0.382
7.5	B	0.114	0.328	0.326	0.438	0.235	0.419
7.5	C	0.096	0.344	0.274	0.330	0.323	0.320
7.5	D	0.091	0.345	0.354	0.309	0.314	0.309
7.5	E	0.100	0.293	0.452	0.282	0.301	0.320
7.5	F	0.106	0.362	0.324	0.294	0.342	0.305
	G	0.081	0.345	0.298	0.269	0.340	0.088
	H	0.104	0.316	0.289	0.155	0.386	0.090
	7	8	9	10	11	12	
	A	0.143	0.320	0.249	0.297	0.384	0.326
	B	0.150	0.287	0.247	0.369	0.363	0.356
	C	0.124	0.261	0.243	0.341	0.324	0.322
	D	0.111	0.220	0.285	0.355	0.343	0.238 13
	E	0.191	0.280	0.283	0.337	0.467	0.281
	F	0.188	0.087	0.295	0.362	0.364	0.232
	G	0.189	0.061	0.346	0.368	0.352	0.293 14
	H	0.307	0.072	0.357	0.456	0.397	0.310

Model 680 Microplate Reader S/N 18852		MCF71					
Raw data report		Ex 1-6					
02/09/2021 12:53:46							
Lab. name: MICROBIOLOGIA							
Kit name : MTT poInt G13							
Reading mode: Sinele							
Measurement Filter: 595nm(5)							
	1	2	3	4	5	6	
15	BA	0.027	0.166	0.070	0.170	0.078	0.177
15	B	0.103	0.187	0.061	0.297	0.086	0.151
15	C	0.105	0.227	0.071	0.259	0.084	0.135
15	D	0.099	0.176	0.086	0.253	0.080	0.154
14	E	0.139	0.191	0.089	0.261	0.078	0.150
14	F	0.155	0.284	0.108	0.346	0.108	0.153
14	G	0.106	0.217	0.189	0.321	0.108	0.233
13	H	0.179	0.283	0.167	0.108	0.154	0.185
	7	8	9	10	11	12	
	A	0.249	0.286	0.100	0.204	0.149	0.262
	B	0.272	0.230	0.124	0.284	0.129	0.264
	C	0.255	0.198	0.082	0.252	0.271	0.259
	D	0.237	0.207	0.182	0.226	0.312	0.112 13
	E	0.312	0.218	0.142	0.083	0.263	0.104
	F	0.244	0.089	0.153	0.092	0.378	0.119
	G	0.257	0.083	0.211	0.090	0.281	0.225 14
	H	0.261	0.093	0.214	0.151	0.325	0.267

Model 680 Microplate Reader S/N 18852		Dexp 2					
Raw data report		MOA					
20/08/2021 14:24:14							
Lab. name: MICROBIOLOGIA							
Kit name : 6TT poYnt Y13							
Reading mode: Sinele							
Measurement Filter: 595nm(5)							
	1	2	3	4	5	6	
	A	0.131	0.580	0.479	0.595	0.586	0.556
	B	0.561	0.502	0.521	0.506	0.521	0.503
	C	0.504	0.460	0.466	0.460	0.484	0.462
	D	0.526	0.450	0.478	0.484	0.500	0.503
	E	0.535	0.453	0.472	0.494	0.499	0.478
	F	0.524	0.455	0.480	0.471	0.514	0.487
	G	0.523	0.397	0.470	0.451	0.483	0.454
	H	0.531	0.367	0.513	0.499	0.500	0.553
	7	8	9	10	11	12	
	A	0.582	0.573	0.559	0.524	0.589	0.564
	B	0.522	0.512	0.507	0.479	0.503	0.503
	C	0.477	0.472	0.468	0.387	0.466	0.483
	D	0.489	0.495	0.493	0.410	0.472	0.493
	E	0.498	0.488	0.497	0.412	0.474	0.494
	F	0.520	0.502	0.510	0.497	0.485	0.487
	G	0.483	0.485	0.487	0.486	0.469	0.487
	H	0.509	0.539	0.501	0.516	0.527	0.533 13.4

Model 680 Microplate Reader S/N 18852		Dexp MOA					
Raw data report							
20/08/2021 14:25:49							
Lab. name: MICROBIOLOGIA							
Kit name : 6TT poYnt Y13							
Reading mode: Sinele							
Measurement Filter: 595nm(5)							
	1	2	3	4	5	6	
	A	0.072	0.508	0.417	0.479	0.474	0.449
	B	0.538	0.467	0.447	0.427	0.438	0.415
	C	0.485	0.422	0.415	0.379	0.425	0.392
	D	0.493	0.430	0.407	0.420	0.430	0.412
	E	0.493	0.451	0.445	0.430	0.426	0.340
	F	0.489	0.426	0.436	0.393	0.468	0.360
	G	0.492	0.392	0.443	0.334	0.448	0.344
	H	0.497	0.416	0.478	0.392	0.445	0.476
	7	8	9	10	11	12	
	A	0.479	0.499	0.496	0.508	0.497	0.499
	B	0.456	0.463	0.442	0.465	0.452	0.468
	C	0.411	0.422	0.434	0.404	0.434	0.402
	D	0.468	0.426	0.448	0.429	0.456	0.452
	E	0.438	0.464	0.454	0.429	0.449	0.458
	F	0.459	0.476	0.456	0.450	0.459	0.501 13.2
	G	0.412	0.458	0.424	0.456	0.435	0.480
	H	0.475	0.490	0.449	0.493	0.475	0.491B

Anexo B.

Tablas en excel de los datos normalizados y organizados a las concentraciones evaluadas para los extractos evaluados en la línea celular MCF7

[µg/L]	H-EtOH			H-eter			H-CH2CL2			H-MeOH			F-EtOH			F-CH2CL2		
200	0,103	0,105	0,099	0,07	0,061	0,071	0,108	0,078	0,086	0,233	0,185	0,249	0,089	0,083	0,093	0,083	0,092	0,09
100	0,139	0,155	0,106	0,086	0,089	0,108	0,084	0,08	0,078	0,272	0,255	0,237	0,1	0,124	0,082	0,151	0,149	0,129
50	0,179	0,166	0,187	0,189	0,167	0,17	0,108	0,108	0,154	0,312	0,244	0,257	0,182	0,142	0,153	0,271	0,312	0,263
25	0,227	0,176	0,191	0,297	0,259	0,253	0,177	0,151	0,135	0,261	0,286	0,23	0,211	0,214	0,204	0,378	0,281	0,325
12,5	0,284	0,217	0,283	0,261	0,346	0,321	0,154	0,15	0,153	0,198	0,207	0,218	0,284	0,252	0,226	0,262	0,264	0,259
0	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246	0,246

%VC

[µg/L]	H-EtOH			H-eter			H-CH2CL2			H-MeOH			F-EtOH			F-CH2CL2		
200	41,870	42,683	40,244	28,455	24,797	28,862	43,902	31,707	34,959	94,715	75,203	101,220	36,179	33,740	37,805	33,740	37,398	36,585
100	56,504	63,008	43,089	34,959	36,179	43,902	34,146	32,520	31,707	110,569	103,659	96,341	40,650	50,407	33,333	61,382	60,569	52,439
50	72,764	67,480	76,016	76,829	67,886	69,106	43,902	43,902	62,602	126,829	99,187	104,472	73,984	57,724	62,195	110,163	126,829	106,911
25	92,276	71,545	77,642	120,732	105,285	102,846	71,951	61,382	54,878	106,098	116,260	93,496	85,772	86,992	82,927	153,659	114,228	132,114
12,5	115,447	88,211	115,041	106,098	140,650	130,488	62,602	60,976	62,195	80,488	84,146	88,618	115,447	102,439	91,870	106,504	107,317	105,285
1	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

[µg/L]	F-MeOH			M-EtOH			M-Eter			M-CH2CL2			M-MeOH			12		
200	0,114	0,096	0,091	0,314	0,373	0,274	0,155	0,258	0,235	0,088	0,090	0,143	0,087	0,061	0,072	0,337	0,362	0,368
100	0,100	0,106	0,081	0,354	0,452	0,324	0,323	0,314	0,301	0,150	0,124	0,111	0,249	0,247	0,243	0,456	0,384	0,363
50	0,104	0,330	0,326	0,298	0,289	0,376	0,342	0,340	0,386	0,191	0,188	0,189	0,285	0,282	0,295	0,324	0,343	0,467
25	0,344	0,345	0,293	0,438	0,330	0,309	0,382	0,418	0,320	0,307	0,320	0,287	0,345	0,357	0,297	0,364	0,352	0,397
12,5	0,362	0,345	0,316	0,282	0,294	0,269	0,309	0,320	0,305	0,261	0,220	0,280	0,369	0,341	0,355	0,326	0,356	0,322
0	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302	0,302

%VC

[µg/L]	F-MeOH			M-EtOH			M-Eter			M-CH2CL2			M-MeOH			12		
200	37,811	31,841	30,182	104,146	123,582	90,879	51,410	85,572	77,944	29,187	29,851	47,430	28,856	20,232	23,881	111,774	120,066	122,056
100	33,167	35,158	26,866	117,413	149,917	107,463	107,131	104,146	99,834	49,751	41,128	36,816	82,587	81,924	80,597	151,244	127,363	120,398
50	34,494	109,453	108,126	98,839	95,854	124,710	113,433	112,769	128,027	63,350	62,355	62,687	94,527	93,532	97,844	107,463	113,765	154,892
25	114,096	114,428	97,181	145,274	109,453	102,488	126,700	138,640	106,136	101,824	106,136	95,191	114,428	118,408	98,507	120,730	116,750	131,675
12,5	120,066	114,428	104,809	93,532	97,512	89,221	102,488	106,136	101,161	86,567	72,968	92,869	122,388	113,101	117,745	108,126	118,076	106,799
0	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

Anexo C.

Tablas en excel de los datos normalizados y organizados a las concentraciones evaluadas para los extractos evaluados en la línea celular MDAMB231

[µg/L]	H-EtOH			H-eter			H-CH2CL2			H-MeOH			F-EtOH			F-CH2CL2		
200	0,538	0,485	0,493	0,417	0,447	0,415	0,392	0,474	0,438	0,344	0,476	0,479	0,476	0,458	0,49	0,429	0,45	0,456
100	0,493	0,489	0,492	0,407	0,445	0,436	0,425	0,43	0,426	0,456	0,411	0,468	0,496	0,442	0,434	0,493	0,497	0,452
50	0,497	0,508	0,467	0,443	0,478	0,479	0,468	0,448	0,445	0,438	0,459	0,412	0,448	0,454	0,456	0,434	0,456	0,449
25	0,422	0,43	0,451	0,427	0,379	0,42	0,449	0,415	0,392	0,475	0,499	0,463	0,424	0,449	0,508	0,459	0,435	0,475
12,5	0,426	0,392	0,416	0,43	0,393	0,384	0,412	0,34	0,36	0,422	0,426	0,464	0,465	0,404	0,429	0,499	0,468	0,432
0	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486	0,486

%VC

LOG[µg/L]	H-EtOH			H-eter			H-CH2CL2			H-MeOH			F-EtOH			F-CH2CL2		
2,301	110,814	99,897	101,545	85,891	92,070	85,479	80,742	97,631	90,216	70,855	98,043	98,661	98,043	94,336	100,927	88,363	92,688	93,924
2,000	101,545	100,721	101,339	83,831	91,658	89,804	87,539	88,568	87,745	93,924	84,655	96,395	102,163	91,040	89,392	101,545	102,369	93,100
1,699	102,369	104,634	96,189	91,246	98,455	98,661	96,395	92,276	91,658	90,216	94,542	84,861	92,276	93,512	93,924	89,392	93,924	92,482
1,398	86,921	88,568	92,894	87,951	78,064	86,509	92,482	85,479	80,742	97,837	102,781	95,366	87,333	92,482	104,634	94,542	89,598	97,837
1,097	87,745	80,742	85,685	88,568	80,947	79,094	84,861	70,031	74,150	86,921	87,745	95,572	95,778	83,213	88,363	102,781	96,395	88,980
1	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000

[µg/L]	F-MeOH			M-EtOH			M-Eter			M-CH2CL2			M-MeOH			12		
200	0,561	0,504	0,526	0,479	0,521	0,466	0,499	0,586	0,521	0,454	0,553	0,582	0,502	0,485	0,539	0,412	0,497	0,486
100	0,535	0,524	0,523	0,478	0,472	0,480	0,484	0,500	0,499	0,522	0,477	0,489	0,559	0,507	0,468	0,516	0,589	0,503
50	0,531	0,580	0,502	0,470	0,513	0,595	0,514	0,483	0,500	0,498	0,520	0,483	0,493	0,497	0,510	0,466	0,472	0,474
25	0,460	0,450	0,453	0,506	0,460	0,484	0,556	0,503	0,462	0,509	0,573	0,512	0,487	0,501	0,524	0,485	0,469	0,527
12,5	0,455	0,397	0,367	0,494	0,471	0,451	0,503	0,478	0,487	0,472	0,495	0,488	0,479	0,387	0,410	0,564	0,503	0,488
0	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533	0,533

%VC

log[µg/L]	F-MeOH			M-EtOH			M-Eter			M-CH2CL2			M-MeOH			12		
2,301	105,253	94,559	98,687	89,869	97,749	87,430	93,621	109,944	97,749	85,178	103,752	109,193	94,184	90,994	101,126	77,298	93,246	91,182
2,000	100,375	98,311	98,124	89,681	88,555	90,056	90,807	93,809	93,621	97,936	89,493	91,745	104,878	95,122	87,805	96,811	110,507	94,371
1,699	99,625	108,818	94,184	88,180	96,248	111,632	96,435	90,619	93,809	93,433	97,561	90,619	92,495	93,246	95,685	87,430	88,555	88,931
1,398	86,304	84,428	84,991	94,934	86,304	90,807	104,315	94,371	86,679	95,497	107,505	96,060	91,370	93,996	98,311	90,994	87,992	98,874
1,097	85,366	74,484	68,856	92,683	88,368	84,615	94,371	89,681	91,370	88,555	92,871	91,557	89,869	72,608	76,923	105,816	94,371	91,557
1,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000