



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN FITOQUÍMICA, ANALÍTICA Y BIOLÓGICA DEL
EXTRACTO OBTENIDO DE VINCA DE MADAGASCAR**

(*CATHARANTHUS ROSEUS*)

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A N

pQFB. CRUZ LÓPEZ LORENA FAUSTINA

pQFB. GONZÁLEZ ROMERO MARIELA NATHALY

DIRECTOR DE TESIS

M.C. GONZÁLEZ CORONEL MARCO ANTONIO

PUEBLA, PUEBLA. JUNIO 2016





La Piedra

El distraído tropezó con ella.

El violento la utilizó como proyectil.

El emperador construyó, con ella.

El campesino cansado la utilizó como asiento.

Para los niños fue un juguete.

David mató a Goliat y

Miguel Ángel le sacó la más bella escultura.

En todos los casos,

la diferencia no estuvo en la piedra,

sino en el hombre.

No existe piedra en tu camino que no puedas

aprovechar para tu propio crecimiento.

Anónimo.

Agradecimientos

Queremos Expresar nuestro más sinceros agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la realización del esta tesis.

En primer lugar queremos agradecer a las instituciones por la ayuda brindada y que han hecho posible concretar la tesis de manera satisfactoria.

A la facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por brindarnos la oportunidad de desarrollarnos como profesionistas y por brindarnos el soporte institucional dado para esta tesis.

Al departamento de Química General, en especial al Dr. Albino Moreno y al M.C. Genaro Carmona, por brindarnos el espacio, los materiales y el equipo necesario para desarrollar cada etapa de este trabajo de tesis.

Al Centro de investigaciones en dispositivos semiconductores del Instituto de ciencia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de manera especial a la Dra. María J. Robles y al Dr. Javier Juárez, por su apoyo financiero, su ayuda desinteresada, sus consejos, paciencia y motivación constante.

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP), con el proyecto DSA/103.5/157749, por el apoyo financiero durante los últimos seis meses, sin el cual no hubiera sido posible la realización del presente trabajo de tesis.

Al proyecto MAJJ-EXC16-I por la ayuda proporcionada a lo largo de estos meses, para hacer posible esta tesis.

*Al Dr. Alfonso D. Fonseca, por brindarnos el apoyo para conseguir los contactos necesarios para la realización de la evaluación Biológica del extracto de *Catharanthus roseus*.*

*A los doctores Calvillo y Fonseca, por la ayuda brindada para la realización del estudio biológico del extracto de *Catharanthus roseus* en Líneas Celulares.*

*Al M. en C. Vladimir Carranza por la realizar los espectros de masas del extracto de *Catharanthus roseus*.*

A nuestro director de tesis M.C Marco A. González, por darnos la oportunidad de realizar este proyecto.

A nuestro sinodales, el Dr. Albino Moreno, la M.C. Patricia Mestiza y al M.C Genaro Carmona, por el interés, motivación, apoyo y crítica, necesarios para la realización de un buen trabajo de tesis.

A nuestras amigas, compañeras y colegas que a lo largo de la carrera nos brindaron su apoyo incondicional, por los consejos, por cada aprendizaje y aventuras que pasamos con cada una de ustedes. En especial a Merari, Rubí, Maricela, Gabriela, Miriam, María y Fernanda.

Finalmente, agradecemos a nuestras familias por su comprensión, apoyo y sacrificio que nos dieron para llegar a esta instancia, por apoyarnos de muchas formas durante el desarrollo de esta tesis, por enseñarnos a enfrentar los obstáculos y que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr nuestros objetivos.

Son muchas las personas que han formado parte de nuestras vidas como personas y ahora como profesionistas, de las que nos encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía. Algunas están aquí con nosotras, otros en nuestros recuerdos, sin importar donde se encuentren queremos agradecerles por forman parte de cada una de nosotras.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.” Albert Einstein

Muchas gracias

Lorena Faustina y Mariela Nathaly

Dedicatoria

Primeramente dedico este trabajo a dios por haberme dado la oportunidad de concluir mis estudios profesionales, por permitirme cerrar un ciclo maravilloso de mi vida y darme la fortaleza en los momentos difíciles.

Con todo mi amor para mis padres Pedro y Gloria por ser los pilares más importantes de mi vida, por demostrarme su cariño incondicional. Les agradezco por apoyarme en mis más anhelados sueños, porque me dieron la oportunidad de desarrollarme como persona y como profesionalista, no fue fácil llegar hasta aquí, pero siempre estuvieron conmigo con palabras de aliento y guiándome por el camino correcto.

A mi tía Lidia por ser mi segunda madre, por estar conmigo y compartir los momentos más significativos. A mis abuelos que son las personas más queridas, por demostrarme su cariño incondicional sin importar la distancia, sé que en estos momentos estarían felices y orgullosos de mí.

Lorena Faustina Cruz López.

La presente tesis se la dedico primeramente a Dios, quien me permitió empezar y ahora culminar mis estudios profesionales, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y por guiar mi camino durante todos estos años.

A mi gran y amado hermano Iván, a quien le agradezco profundamente esta gran oportunidad, sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí, por brindarme las herramientas necesarias para salir adelante en este mundo lleno de adversidades.

A mi amada madre Isabel por su comprensión, paciencia, tolerancia, confianza, principios y por supuesto su amor, las cuales considero bases importantes para destacar en todos los ámbitos a los que me enfrente.

A mi padre, hermanas y abuelita, por su apoyo y confianza que me impulsaron a seguir adelante con mi sueño.

Mariela Nathaly González Romero

Resumen

Catharanthus roseus o Vinca de Madagascar ha sido utilizada en la medicina popular desde hace siglos para el tratamiento de diabetes y cáncer entre otros padecimientos, se caracteriza por la presencia de 70 diferentes alcaloides de tipo indol, siendo los más importantes la vincristina y la vinblastina, por sus propiedades terapéuticas.

El objetivo principal del presente trabajo fue la de obtener el extracto de Vinca de Madagascar, utilizando diferentes solventes y métodos de extracción, así mismo llevar a cabo la evaluación fitoquímica, analítica y biológica del extracto, con el propósito de conocer la composición de la droga vegetal, caracterizar y confirmar la efectividad antineoplásica en células tumorales.

Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos acuoso, metanólico y etanólico de *Catharanthus roseus*, se determinó la presencia de taninos, flavonoides, glucósido cardiotónico, alcaloides y se identificaron los principios activos vinblastina y vincristina, esta última en cantidades pequeñas en la planta.

Las pruebas organolépticas que se realizaron a los tres extractos fueron color y olor, que son características de la planta. Así mismo se realizaron las pruebas fisicoquímicas en el extracto acuoso, obteniendo los resultados siguientes, pH de 4.90-4.91, densidad de 0.9959 g/cm³ y porcentaje de humedad de 85.82 %.

Se caracterizó el extracto etanólico mediante el uso de las técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Espectroscopia de UV-VIS. En el espectro de IR se observaron banda de absorción para grupos hidroxilos, metilos, metilenos en otros, en el segundo espectro que corresponde a UV-VIS, se observaron picos de máxima absorción para taninos hidrosolubles y taninos condensables.

La evaluación de la actividad biológica del extracto metanólico de la especie *Catharanthus roseus* en células, se realizó mediante método *in vitro* MTT (metil tiazol tetrazolio) un ensayo colorimétrico, rápido, cuantitativo que se utiliza para medir la viabilidad celular. Se calculó la IC₅₀ del extracto en células gliales del Sistema Nervioso Central la cual fue de 1.43±0.2 µM. Para evaluar la actividad antineoplásica se probó el extracto de *C. roseus* en células gliales, Leucemia, colon y Mama, teniendo resultados factible en células gliales con un 100% de inhibición del crecimiento.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	II
Dedicatoria	IV
Resumen	V
Índice de figuras	VIII
Indice de tablas.....	IX
Introducción	1
1. Antecedentes.....	4
1.1 El cáncer	4
1.1.1 Morbilidad y mortalidad.....	4
1.1.2 Causas del cáncer	5
1.1.3 Tipos de cáncer	8
1.2 Vinca de Madagascar (Catharanthus roseus).....	10
1.2.1 Descripción	10
1.2.2 Sinonimia	11
1.2.3 Taxonomía.....	11
1.2.4 Nombre común.....	11
1.2.5 Información botánica.....	12
1.2.6 Etnobotánica.....	12
1.3 Alcaloides de la vinca.....	13
1.3.1 Historia.....	13
1.3.2 Propiedades físicas y químicas	14
1.3.3 Propiedades farmacológicas	16
1.3.4 Mecanismo de acción de vinblastina	17
1.3.5 Mecanismo de acción de vincristina	17
1.3.6 Usos de la vincristina y vinblastina	17
1.3.7 Toxicidad.....	18
2. Plantamiento del Problema.....	18
3. Justificación	19
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivos.....	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
6. Metodología.....	20
6.1 Material de laboratorio.....	20

6.2 Equipo de laboratorio	21
6.3 Reactivos:	21
6.2 Muestreo	23
6.5 Obtención del extracto.....	23
6.6 Pruebas fitoquímicas	24
6.7 Análisis analítico	27
6.8 Caracterización del extracto	29
6.9 Evaluación biológica del extracto metanólico	30
6.9.1 Protocolo 1: Concentración inhibitoria en células gliales del SNC	30
6.9.2 Protocolo 2: Porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares	31
7. Resultados.....	32
7.1 Pruebas físicas	32
7.2 Pruebas fitoquímicas	32
7.3 Caracterización del extracto de <i>Catharanthus roseus</i>	34
7.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	34
7.3.2 Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-Vis)	35
7.4 Evaluación biológica	36
7.4.1 Determinación de citotoxicidad del extracto metanólico en líneas celulares	36
7.4.2 Determinación del % de inhibición del crecimiento.....	37
8. Discusión	37
9. Conclusión.....	39
10. Recomendaciones	40
Bibliografía.....	42
Glosario	50
Anexo 1: Metabolitos secundarios	54
Anexo 3: Pruebas fitoquímicas	62
Anexo 4: El ciclo celular.....	73
Anexo 5: Mitosis	75
Anexo 6: Celulas gliales	77
Anexo 7: Glioma	78
Anexo 8: Cultivo celular	79
Anexo 9: Ensayo MTT	80
Anexo 10: Espectrometría de masas	81

Índice de figuras

Figura 1: Fase de la aparición de un cáncer. I) Formación de un tumor primario benigno debido a un aumento de la proliferación, II) Posterior, se forma los tumores secundarios en sitios distantes como consecuencia de la invasión y la capacidad metastásica. _____	5
Figura 2: Proceso de los carcinógenos químicos en las células epiteliales. _____	6
Figura 3: <i>Catharanthus roseus</i> o Vinca de Madagascar. 1) Rama con hojas y flores. 2) flor. 3) corte longitudinal de la base y parte superior del conducto de la corola. 4) frutos. 5) semilla. _____	10
Figura 4: Distribución geográfica de la especie <i>Catharanthus roseus</i> en México. _____	12
Figura 5: Estructura de los principales alcaloides de la Vinca (<i>Catharanthus roseus</i>). _____	15
Figura 6: Mecanismo de acción de Vincristina y Vinblastina durante el ciclo celular. _____	16
Figura 7: Espectro de IR del extracto de <i>Catharanthus roseus</i> _____	34
Figura 8: Espectro de UV. Vis del extracto de <i>Catharanthus roseus</i> _____	35
Figura 9: Estructura molecular de la lactona de la familia Asteráceas _____	54
Figura 10: Estructura general de los glucósidos cardiotónicos. R=H es una aglicona; R= Gli es un Glicósido _____	55
Figura 11: Estructura general de las saponinas. _____	55
Figura 12: Estructura de las cumarina _____	56
Figura 13: Estructura de las quinonas. _____	57
Figura 14: Estructura de los principales flavonoides. _____	57
Figura 15: Principales estructuras de los taninos _____	58
Figura 16: Estructura química de alcaloides derivados del triptófano. _____	60
Figura 17: Biosíntesis de los metabolitos secundarios. _____	61
Figura 18: Ciclo celular. _____	74
Figura 19: Esquema general de la Mitosis. _____	76
Figura 20: Reacción enzimática del succinato deshidrogenasa mitocondrial en el ensayo MTT. _____	80
Figura 21: Espectro de masas del extracto acuoso por el método FAB+ _____	82
Figura 22: Espectro de masas del extracto etanólico por método de FAB+ _____	82

Indice de tablas

Tabla 1: Ejemplos de carcinógenos químicos y los órganos involucrados. _____	7
Tabla 2: Tipos de cáncer. Órganos y tejidos involucrados. _____	8
Tabla 3: Clasificación de los tumores _____	9
Tabla 4: Categoría taxonómica de <i>Catharanthus roseus</i> . _____	11
Tabla 5: Resultados de las pruebas fisicoquímicas y organolépticas. _____	32
Tabla 6: Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas a <i>Catharanthus roseus</i> para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos. _____	33
Tabla 7 : Actividad citotóxica del extracto metanólico de <i>Catharanthus roseus</i> sobre la línea celular del Sistema nervioso central (Glías) _____	366
Tabla 8: Resultados de % de inhibición del crecimiento celular _____	36

Introducción

Desde la antigüedad se han utilizado las plantas como remedios para aliviar diversas enfermedades, los conocimientos acerca de su uso provenían de la observación y de la experiencia empírica, dada la riqueza química de las plantas, estas fueron consideradas como fuente natural de numerosos medicamentos en la medicina tradicional o popular (Lock,1994).

Se estima que el número de plantas superiores angiospermas y gimnospermas a nivel mundial es de 250,000 y solamente alrededor de 6% se han investigado alguna actividad biológica y solo el 15% ha sido evaluado fitoquímicamente. Esta estimación es de gran importancia cuando se considera el amplio potencial de principios activos contenidos en la naturaleza que aún no han sido identificados y muchos menos evaluados dentro de un contexto médico (Mendoza, 2008).

En la actualidad esta información constituye un criterio de gran relevancia para el estudio fitoquímico y farmacológico de plantas medicinales, para el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas, búsqueda de nuevos fármacos, así como una orientación metodológica para la purificación de los extractos de las plantas en la que se buscan detectar o aislar los compuestos activos.

La fitoquímica estudia las moléculas implicadas en la actividad de las plantas, el conocimiento de sus estructuras y de su comportamiento. Con ello se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar que se conoce como pruebas fitoquímicas preliminares, que consisten en reacciones químicas que producen alteraciones rápidas en la estructura molecular del compuestos como la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular o formación de un complejo, lo cual resulta una manifestación sensible como el cambio de color, formación de un precipitado o desprendimiento de gas (Coy y Cuca, 2014).

México es un país de gran riqueza biológica debido a su topografía y variación climática, se han identificado alrededor de 4 000 especies de plantas con flores y atributos medicinales que corresponden al 15% de la flora mundial (Schelaepfer y Mendoza, 2010).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para

propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Schlaepfer *et al.* 2010)

Las plantas sintetizan y almacenan grandes cantidades de productos metabólicos primarios y secundarios. Los primeros abundan en la naturaleza, desempeñan un papel esencial en los procesos de fotosíntesis y respiración, por otro lado el segundo grupo son compuestos orgánicos que no están implicados directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta, sin embargo son responsables del olor, color, sabor y de las propiedades medicinales [Castillo y Martínez, 2007].

La concentración y la calidad de los metabolitos secundarios, depende de diversos factores como la edad, clima, época del año, el tipo de suelo y la humedad (Ocegueda y Koleff, 2005). También se debe considerar el proceso de recolección, desecación, almacenamiento y el método de extracción.

Las plantas que contienen alcaloides han sido utilizadas como medicamentos, alimentos, estimulantes y venenos desde la antigüedad. Debido a la diversidad y a la complejidad de sus estructuras químicas, la nomenclatura de los alcaloides no ha sido esquematizada y su clasificación ha sido realizada por semejanza con estructuras más simples (Sharapin *et al.*, 2000]

En los últimos años las técnicas analíticas como la cromatografía, la espectroscopia, entre otros, han permitido el aislamiento, caracterización e identificación de pequeñas cantidades de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Chaparro, 2010).

Los estudios farmacológicos están dirigidos a demostrar la actividad biológica y la eficacia terapéutica del extracto, mediante modelos *in vivo* o *in vitro*. Los ensayos *in vivo* se emplean modelos animales y suelen diseñarse para definir la relación dosis-respuesta del efecto adverso observado (Hernández, 2011), mientras en los ensayos *in vitro* se realizan en ambientes controlados fuera de un organismo vivo, se utilizan medios de cultivos con distintos tipos de células y se administra distintas dosis del extracto, suele establecer la relación concentración-efecto, degeneración, evaluar la lisis celular y el daño concreto en receptores, membrana celular, núcleo celular etc. (Gil, 2011)

Los ensayos celulares han demostrado su utilidad en investigación y resultan fundamentales para poner en evidencia actividades biológicas de interés y efectos secundarios no deseables (Fernández, 2007), un ejemplo de estos ensayos es el MTT.

En el ensayo MTT o MTA, se utiliza la sal de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil tetrazolio), es un ensayo colorimétrico para la evaluación de la sensibilidad de los cultivos celulares neoplásicos, basado en la reducción del MTT soluble y amarillo por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, convirtiéndolo en MMT formazán un producto azul intenso e insoluble (Rodríguez, Vicente y Canteras, 1997).

De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, las plantas son utilizadas por el 80% de la población mundial para satisfacer o complementar sus necesidades médicas (OMS, 2004).

El cáncer es una de las principales enfermedades que se le atribuye una importante tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Escudero, 2013). Se entiende por morbilidad a los datos estadísticos que estima el riesgo, la evolución, surgimiento y posibles soluciones de alguna enfermedad en un determinado tiempo. Se prevé que el número de nuevos casos de cáncer aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015).

Esto conlleva a un problema de salud pública, ya que causa una enorme pérdida de vidas humanas y recursos económicos. Los estudios epidemiológicos han identificado un gran número de factores de riesgos o sucesos relacionados con la aparición de cáncer, que desencadenan diversos mecanismos genéticos y bioquímicos para la aparición del tumor, proceso al que se le conoce como carcinogénesis (Granados y Herrera, 2010).

Actualmente se han desarrollado innumerables fármacos por síntesis química y/o derivados de plantas con potencial para combatir la proliferación de células cancerosas, sin embargo no tienen los efectos deseados en la clínica, debido a la complejidad de la enfermedad. Los tratamientos actuales se basan en la cirugía, radiación y quimioterapia, siendo las plantas medicinales una alternativa (Sherapin *et al.*, 2000)

En el presente trabajo de investigación se realizó un estudio fitoquímico a tres extractos (etanólico, metanólico y acuoso) de *Catharanthus roseus* para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la planta, así mismo se llevó a cabo una evaluación analítica y biológica con el fin de evaluar la actividad anticancerígena.

1. Antecedentes

1.1 El cáncer

El cáncer engloba un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo (OMS, 2015). Desde el punto de vista biológico, se caracteriza por la alteración de equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular; su consecuencia es el desarrollo de una clona que puede invadir y destruir los tejidos adyacentes y diseminarse hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias u ocurre propagación metastásica (Granados *et al.* 2010).

1.1.1 Morbilidad y mortalidad

Basado en las últimas estadísticas sobre la incidencia de cáncer y sus tasas de mortalidad en todo el mundo, se calcula que en el 2012 el cáncer alcanzó los 14 millones de nuevos casos, una cifra que se prevé que aumente hasta los 22 millones anuales en los próximos dos decenios, en el caso de la mortalidad se calculan 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer y se prevé que el número aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015).

En el 2012, los cánceres diagnosticados con más frecuencia a nivel mundial fueron:

- Cáncer de pulmón: 1.8 millones de casos que es un total 13%
- Cáncer de mama: 1,7 millones que corresponde a 11,9%
- Cáncer colorectal: 1,4 millones que es un 9,7%

Los cánceres que provocan mayor número de muertes fueron:

- Cáncer de pulmón: 1,6 millones (19,4% total)
- Cáncer de hígado: 0.8 millones (9,1%)
- Cáncer de estómago 0.7 millones (8,8%)

Como consecuencia del incremento de incidencia del cáncer, más del 60% de todos los casos del mundo se producen en África, Asia, América central y América del sur y estas regiones registran un aproximado del 70% de las defunciones a nivel mundial (OMS, 2015).

1.1.2 Causas del cáncer

El cáncer es un amplio grupo de enfermedades y por consiguiente una amplia gama de causas, cada cáncer es diferente según su biología y patología (New medical, 2016).

El cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia, y la posterior adquisición por estas células de la capacidad invasiva que les permite escapar de un sitio natural en el organismo y colonizar, proliferar en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis. Si tiene lugar un aumento de crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se hallan, se habla de un tumor benigno, ver figura 1 (Muñoz, 1997). Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y agentes externos (OMS, 2015).

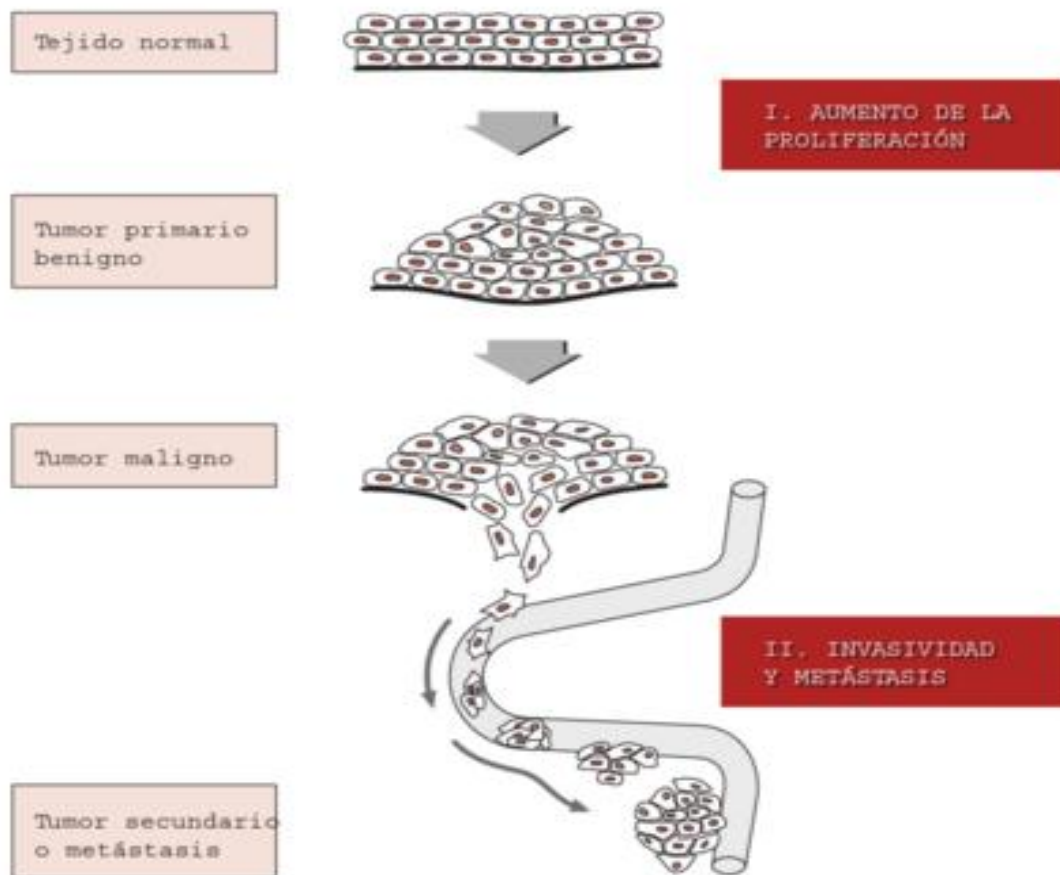


Figura 1: Fase de la aparición de un cáncer. I) Formación de un tumor primario benigno debido a un aumento de la proliferación, II) Posterior, se forma los tumores secundarios en sitios distantes como consecuencia de la invasión y la capacidad metastásica.

Según la OMS los factores de riesgos más comunes son:

- Consumo de tabaco y alcohol
- Exceso de peso y obesidad
- Factores dietéticos
- Infecciones crónicas
- Riesgos ambientales

Agentes cancerígenos

- Agentes cancerígenos químicos

Los carcinógenos químicos actúan sobre las células epiteliales y en particular en epitelios de revestimiento cuyas células tienen una organización estructural estratificada o pseudoestratificada (Arias, 2001).

La mayoría de los agentes químicos requieren de activación metabólica antes de reaccionar con componentes celulares, también depende de factores como raza, sexo, edad, dieta, el estado hormonal, presencia o ausencia de enzimas que la metabolizan (Medina y Martínez, 2009).

Los carcinógenos químicos actúan en la fase de iniciación y después en la promoción. La promoción y la progresión corresponden a la fase de hiperplasia, displasia y carcinoma in situ. La iniciación es una alteración bioquímica que no manifiesta morfología reconocible (Medina *et al.* 2009). Ver figura 2.

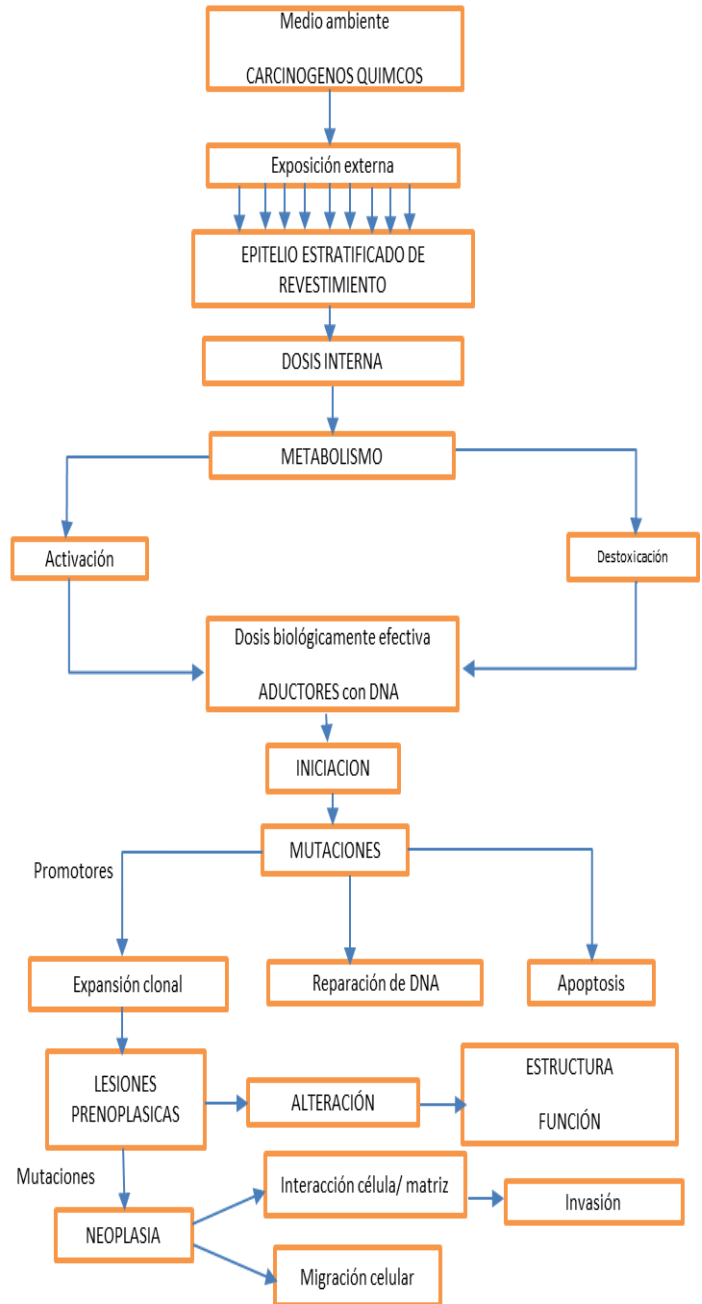


Figura 2: Proceso de los carcinógenos químicos en las células epiteliales.

Son numerosos los agentes químicos carcinógenos en el ser humano (Arias, 2001), además de la acción directa y la activación metabólica algunos actúan en órganos específicos y otros no son específicos e inducen tumores según la vía de exposición máxima (Medina *et al.* 2009). Ver tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos de carcinógenos químicos y los órganos involucrados.

Órgano	Carcinógeno químico
Pulmón	Arsénico, asbesto, éter, tabaco y gas mostaza
Vejiga	Bencidina, ciclofosfamida, tabaco
Estomago	Cromato de zinc
Piel	Arsénico, benzopireno
Hígado	Aflatoxina, cloruro de vinilo y bebidas alcohólicas
Boca Faringe Laringe Esófago	Bebidas alcohólicas, tabaco y gas mostaza

- Agentes cancerígenos físicos

Son principalmente las radiaciones ionizantes y la luz ultravioleta. Las radiaciones son responsables de alrededor de un 5% de los cánceres en el hombre, tiene un gran potencial mutagénico sobre el DNA, pueden ser directas o indirectas, mediante la interacción con otras moléculas y la formación de radicales libres que dañaran al DNA (Muñoz, 1997).

La radiación ultravioleta está asociada a la aparición de cánceres de piel de tipo melanoma. El mecanismo de acción mutagénica es la formación de dímeros de pirimidinas en el DNA y tiene efectos nocivos sobre el sistema inmune. Las radiaciones electromagnéticas que provienen de fuentes de emisiones industriales o caseras, como los aparatos de microondas tienen un posible efecto mutagénico a exposiciones prolongadas, aunque no han sido demostrados en su totalidad (Muñoz, 1997).

- Agentes cancerígenos biológicos

Los virus están implicados en el 15-20% de los cánceres humanos. El carcinoma hepatocelular y el carcinoma de cérvix uterino constituyen el 80% de los cánceres relacionados con virus (Arias, 2001).

Los virus oncogénicos incluyen al virus de Hepatitis B y C en el carcinoma hepatocelular, el virus Epstein-Barr en el carcinoma nasofaríngeo y el linfoma de Burkitt. Estos virus tienen la capacidad de retrotranscribir su ARN a DNA cuando penetran en una célula huésped (Arias, 2001).

1.1.3 Tipos de cáncer

El cáncer toma su nombre según el órgano en que comienza, aunque la metástasis emigre a otra parte del cuerpo, conserva el nombre original (Coleman, 2008). Ver tabla 2, continuación pág. 9.

Tabla 2: Tipos de cáncer. Órganos y tejidos involucrados.

Tipos de cáncer

Carcinoma	Adenocarcinoma	Células que cubren los conductos de las glándulas o células de tejido glandular. Cáncer de mama, pulmón, próstata, tracto gastrointestinal y estructura glandulares (salivales, páncreas y glándulas endocrinas)
	Carcinoma	Tipo de cáncer que empieza en tejido epitelial como piel, tracto gastrointestinal, bronquios, bocas
	Carcinoma in situ	Cáncer temprano que ocurre en una estructura glandular o envolvente. Cáncer de cérvix uterino, cabeza, cuello, pecho y piel, todavía no invaden tejido circundante
	Endometrial	Útero
	Hepatoma	Hígado
	Células no pequeñas, células pequeñas	Pulmón Cuello uterino o cérvix uterino
	Carcinoma escamoso	Células en la superficie del cuerpo o célula que envuelve las estructuras internas como boca, garganta bronquios y canal del recto
	Células transitoria	Vejiga
	Tumores de células	Surgen en los testículos u ovarios que son seminomas y noseninomas.

	germinales
Gliomas	Glioblastomas Cerebro Astrocitoma
Leucemia	Medula ósea, tejido suave en el centro de los huesos, donde las células de la sangre son producidas.
Linfoma	Enfermedad de Células en el sistema linfático que producen Hodgkin células inmune Linfoma no Hodgkin
Melanoma	Células pigmentadas, usualmente piel
Mesotelioma	Tejido que cubre los pulmones o cavidad abdominal
Mieloma múltiple	Células inmunes que produce anticuerpos
Sarcoma	Tejido óseo o conectivo, como músculos
Seminomas	Células germinales en los testículos u ovarios

En la práctica se emplea el término tumor para hacer referencia a una patología que produce un aumento de tamaño de la zona donde se asienta, originado por una proliferación celular exagerada y anómala. Cuando el tumor tiene un contenido líquido se denomina quiste. (Gutiérrez *et al.*1999) Ver tabla 3, continuación pág. 10.

Tabla 3: Clasificación de los tumores

Tipo de tumor

Benigno	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento limitado y lento • Remisiones espontaneas sin causas aparente • Se caracteriza por respetar las estructuras vecinas • Encapsulados • Produce compresión de tejidos circundantes • Crecimiento por expansión • No suele presentas diseminación
Maligno	<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento ilimitado • Desde fases precoces, tiende a invadir las estructuras colindantes • Crecimiento por infiltración por no estar encapsulado

-
- Destructivo
 - Invade vaso sanguíneos y linfáticos
 - Dan origen a tumores secundarios
 - Produce metástasis
-

1.2 Vinca de Madagascar (*Catharanthus roseus*)

1.2.1 Descripción

Hierba anual o perenne (Diego, Fonseca y UNAM, 2003) de tallo endurecido y ramificado.

Con hojas opuestas, cortas, peciolados, oblongos, ápice agudos, base cuneada (Restrepo *et al.* 2005) de 2 a 7 cm de largo y 1 a 4 cm de ancho (CONABIO, 2009).

Posee flores axilares de cinco pétalos, de color blanco, rosado o violáceo (Restrepo *et al.* 2005), de 2 a 3 cm de largo; corola en forma de trompeta, un tubo largo de 3 cm y angosto que remata en 5 lóbulos ampliamente obovados, de 1 a 2 cm de largos; 5 estambres, insertos sobre el tubo de la corola y alternado con sus lóbulos de filamento corto y antenas largas, aflechadas en la base (CONABIO, 2009).

El fruto es cilíndrico en pares con semillas pequeñas, negras y numerosas (Restrepo *et al.* 2005), mide cada uno de 2 a 3 cm de largo y 2 a 3 mm de ancho, se abren por la sutura ventral (CONABIO, 2009). Ver figura 3.

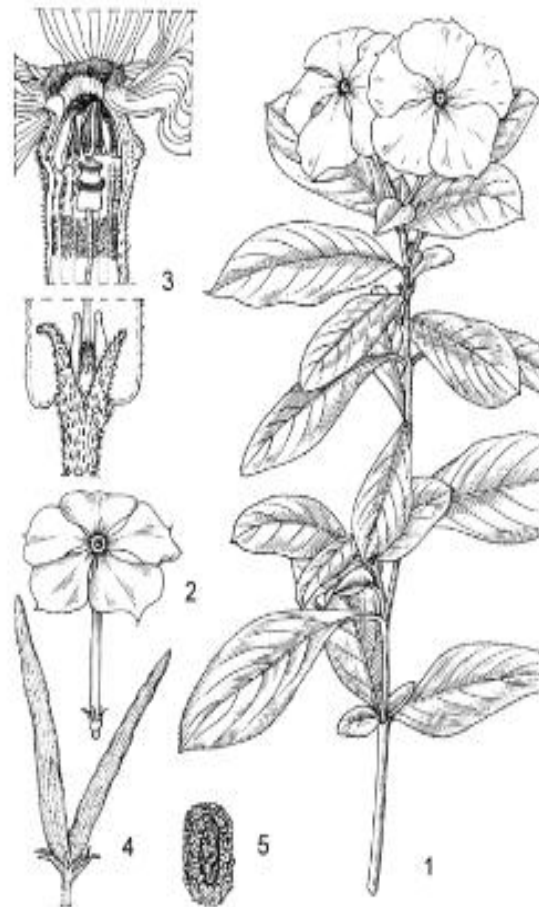


Figura 3: *Catharanthus roseus* o Vinca de Madagascar. 1) Rama con hojas y flores. 2) flor. 3) corte longitudinal de la base y parte superior del conducto de la corola. 4) frutos. 5) semilla.

1.2.2 Sinonimia

Vinca rosea L., *Annocallis rosea* (L.) Small, *Catharanthus roseus* var. *albus* G. Don, *C. roseus* var. *angustus* Bakh. F., *C. roseus* var. *nanus* Markgr, *Hottonia littoralis* Lour (Guillot, 2009).

1.2.3 Taxonomía

Tabla 4: Categoría taxonómica de *Catharanthus roseus*.

Reino	Plantae
:Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Rauvolfioideae
Tribu	Vinceae
Género	<i>Catharanthus</i>
Especie	<i>Catharanthus roseus</i>

1.2.4 Nombre común

En la mayor parte de México *Catharanthus roseus* es conocida como Teresita, Juan Dieguito, alegría y ninfa (Diego, *et al.* 2004), en Puebla se conoce como vinca o pervinca (Alvarado, 2003). En otras partes del mundo el nombre común es: Madagascar periwinkle, Rosy periwinkle, Perveche de Madagascar, Rose amère, Semprenoiva, flor de anjinho, pervinca de Madagascar, Boas noite, viuditas, mosqueta, maravilla de España, mulata o Mtunda (Schmelzer, 2008).

1.2.5 Información botánica

Catharanthus roseus pertenece a la familia *Apocynaceae*, es una planta endémica de Madagascar, es de amplia distribución geográfica, en México se puede encontrar en Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y Veracruz (Diego, Fonseca *et al.* 2004) . Ver figura 4.

El género *Catharanthus* tiene ocho especies, 7 especies son originarias de Madagascar, excepto *C. pusillus* que se encuentra en la india y Sri Lanka, la diferencia entre las especies es la composición de los alcaloides y la diferentes coloraciones en su corola (Schmelzer, Gurib, *et al.* 2008). Es una planta anual, su floración es todo el año (Diego *et al.* 2004) y es usualmente cultivada como planta de ornato o planta de jardín por su fácil mantenimiento (Schmelzer, *et al.* 2008).



Figura 4: Distribución geográfica de la especie *Catharanthus roseus* en México.

1.2.6 Etnobotánica

En África y Asia, la cocción total de la planta es usada como un agente hipoglucemiante oral, también se usa para el tratamiento de malaria, dengue, diarrea, diabetes, cáncer y dermatosis. El extracto preparado de las hojas es aplicado como agente antiséptico en heridas, erupciones de la piel y para tratar dolores de muela. Las partes aéreas son consideradas diaforéticas y diuréticas, se usan en la indigestión, disentería, teniendo

efectos purgativos y depurativos, en Uganda se utiliza en úlceras estomacales y en Togo la cocción de las raíces se emplea para el tratamiento de la dismenorrea. El uso principal de las partes aéreas de *Catharanthus roseus* es para la extracción de alcaloides (vincristina y vinblastina), prescrito para terapia anticancerígena y complemento para protocolos de quimioterapias (Schmmelzer, 2008).

En Quintana Roo se emplea las hojas para curar la viruela, salpullido, irregularidades de la menstruación, desparasitar, en el caso de almorranas y heridas, carnosidades de los ojos, fortalecimiento de la vista e incluso cuando hay dolor de cabeza como antiinflamatorio. En Yucatán, se usan las hojas machacadas para duchas vaginales cuando hay presencia de secreción vaginal amarillenta o café, acompañada de comezón y ardor (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009).

1.3 Alcaloides de la vinca

1.3.1 Historia

El extracto de *Catharanthus roseus* G. Don ha sido utilizado por la medicina popular desde hace siglos. En 1949, Ralph Noble un endocrinólogo de la universidad de Ontario (Canadá) habiendo tenido conocimiento del uso de los extractos en tratamiento de diabetes, lo aplicó administrando a ratas por vía oral en la cual no tuvo ningún efecto, pero por vía intravenosa las rata murieron a causa de una infección, en la cual se encontró que el extracto reducía drásticamente los leucocitos (Raviña, 2008)

En 1958 durante el congreso de la Academia de Ciencias de New York, Noble en colaboración con Charles Beer separan una fracción alcaloídica y aíslan un alcaloide denominada vincaleucoblastina (vinblastina), en ese mismo congreso Godon Svoboda y colaboradores estudian la planta y llegan a los mismos resultados. En 1961, Svoboda se dio cuenta del aislamiento de otro alcaloide que nombro leurocristina (vincristina) y mencionó el parecido con estructura química de la vinblastina, teniendo un perfil farmacológico y toxicológico diferente (Rivaña, 2008).

La síntesis biomimética de los alcaloides del grupo de la vinblastina fue llevada a cabo por primera vez por P. Potier, N. Langlois y colaboradores en el instituto de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, Francia, en 1976 (Rivaña, 2008).

1.3.2 Propiedades físicas y químicas

Los principales alcaloides de *Catharanthus roseus* son vincristina (VCR) y vinblastina (VBL), estos son compuestos químicamente relacionados y que están formados por dos sistemas de varios anillos enlazados por puentes carbono-carbono con la única diferencia entre ambos de un simple radical, pero ambos compuestos presentan diferencias importantes en cuanto a su espectro clínico y toxicológico (Ceorio, 1986).

La fórmula molecular de la vinblastina es $C_{46}H_{58}N_4O_9$ y se aisló por primera vez de la pervinca en 1958 y su estructura completa se estableció en 1965 (Weinenger y Stermitz, 1988).

- 1) Peso molecular: 810.97412 g/mol
- 2) Punto de fusión: 267 °C
- 3) Solubilidad: es insoluble en agua, éter de petróleo, solubles en alcoholes, acetona, acetato de etilo, cloroformo.
- 4) Presión de vapor: 1.03×10^{-27} mmHg a 25°C
- 5) Estabilidad se puede almacenar en el refrigerador por periodos de 30 días sin una pérdida significativa de la potencia (Goodman y Gilman, 1975).
- 6) Descomposición: cuando se calienta emite humo toxico de óxido nítrico
- 7) Rotación óptica específica: -28° a 26° c/D (c=1.01 en metanol)
- 8) Rotación óptica específica: -32° a 23° c/D (c=0.88 en metanol)
- 9) Absorción máxima (etanol): 214, 259 nm (LOG E= 4.73, 4.21)
- 10) UV máx. (Metanol): 212, 262, 282, 292 nm (ϵ log= 475, 4, 28, 4, 22, 4, 18)
- 11) Constante de disociación: $pK_{a1}=5,4$ y $pK_{a2}=7,4$

La vincristina es un alcaloide doble, resultante de la unión de dos unidades: una dihidroindólica (indolina) llamada vindolina y otra también indólica relacionada con la catarantina derivada de la carbometoxi-cleavamia (Raviña, 2008). Observar figura 5 pág. 15.

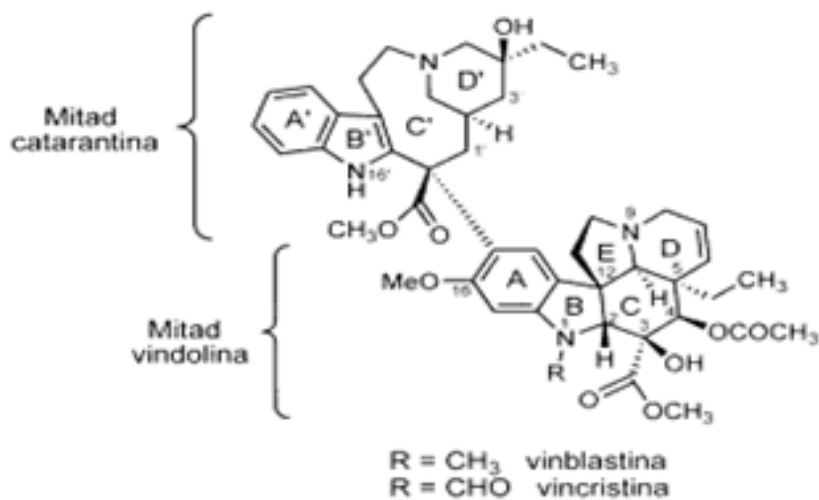


Figura 5: Estructura de los principales alcaloides de la Vinca (*Catharanthus roseus*).

La estructura de la vincristina es la misma que la vinblastina, excepto por el Radical (R) que es un aldehído (CHO), (Gennaro, Remington y Belluci, 2003), también se diferencia por la oxidación de N-metilo a N-formilo (Raviña, 2008).

- 1) Fórmula molecular: C₄₆H₅₆N₄O₁₀
- 2) Peso molecular: 824,95764 g/mol
- 3) Punto de fusión: 218-220 °C
- 4) Solubilidad: en agua 2.27 mg/L a 25°C
- 5) Estabilidad en solución salina fisiológica guardado en refrigeración hasta por 2 semana sin pérdida significativa de la potencia
- 6) Descomposición: cuando se calienta hasta su descomposición emite humos tóxicos de óxido nítrico
- 7) Constante de disociación: pKa: 5,0, 7,4 en el 33% dimetilformamida
- 8) Rotación óptica específica: 8.5 grados en 26 grados C / D (c = 0,8)
- 9) UV máx. (metanol): 218,252, 285, 293 nm (épsilon registro de 4,72, 4,24, 4,18, 4,23) sulfato
- 10) Propiedades espectrales: Rotación óptica específica: 17 grados a 25 grados C / D; 26,2 grados a 25 grados C / D (cloruro de etileno); absorción máx. (etanol): 220, 255, 296 nm (log absortividad molar = 4,65, 4,21, 4,18).

1.3.3 Propiedades farmacológicas

Los alcaloides de la *Catharanthus roseus* tienen actividad citotóxica proteica que se halla en la fracción soluble del citoplasma de todas las células. Está en equilibrio con una forma polimerizada en el aparato microtubular que forma el huso, a lo largo del cual emigran los cromosomas durante la mitosis. Los alcaloides a través de su enlace con la tubulina inhiben el proceso de ensamble de los microtúbulos y provoca la disolución del huso mitótico. La primera manifestación de la acción de estos fármacos es la detención de las células en la metafase de la mitosis como se observa en la figura 6. Estos alcaloides atraviesan la membrana celular por un proceso de transporte activo (Celorio, 1986).

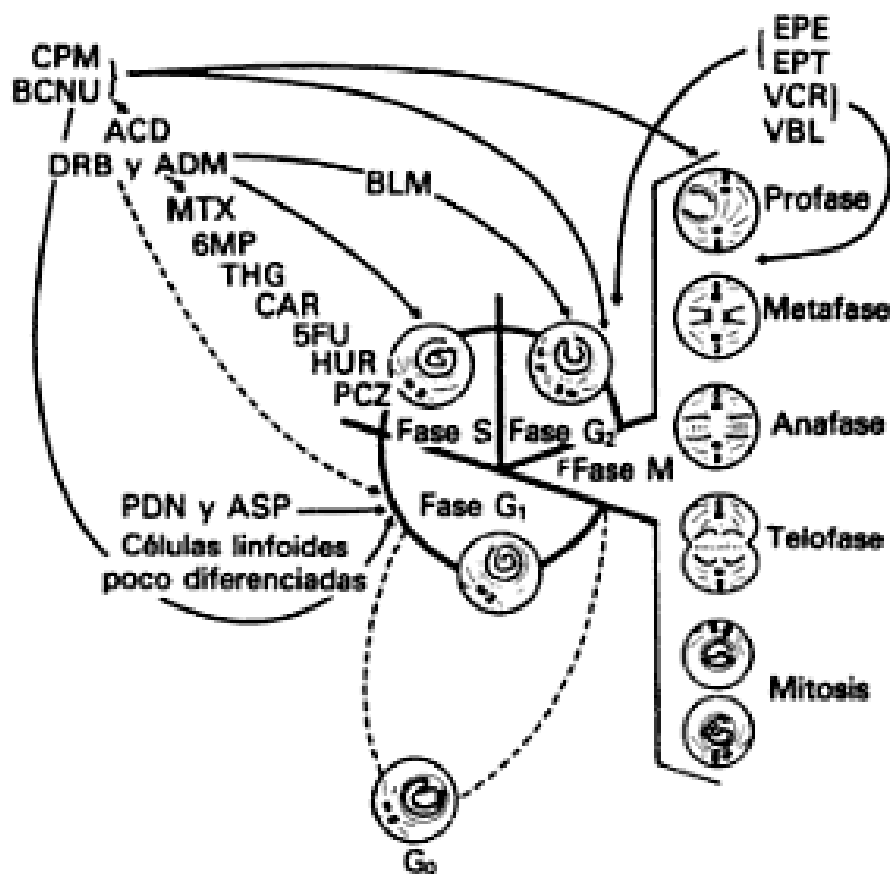


Figura 6: Mecanismo de acción de Vincristina y Vinblastina durante el ciclo celular.

1.3.4 Mecanismo de acción de vinblastina

La vincristina se une a la fracción β de la tubulina evitando la dimerización de las subunidades α y β y con ello inhiben la polimerización a microtúbulos lo que impide la formación de los husos mitóticos en las células, este efecto inhibitor produce la detención de la mitosis en la metafase, con lo que se interrumpe la división celular, y que más tarde desencadena citólisis, ejerciendo un fuerte efecto leucopénico (Rivaña, 2008) por interferencia con el metabolismo de glutamato y el aspartato. En el plasma, alrededor del 75% de la vinblastina se encuentra unida a la proteína, su cinética es tricompartmental, con una segunda fase asociada con una vida media de 1 a 1,5 horas y una vida media de eliminación de 18 a 40 horas. Se metaboliza sobre todo en hígado (Gennaro *et al.* 2003), y la excreción fecal de la vinblastina es solo del 10% (Celorio, 1986), su dosis debe reducirse a la mitad en pacientes con disfunción hepática (Gennaro *et al.* 2003).

1.3.5 Mecanismo de acción de vincristina

La vincristina interfiere en el montaje de los microtúbulos mediante la combinación con la tubulina; este efecto altera diversos procesos celulares como la formación de husos y la mitosis. También suprime la síntesis de RNA y proteína. Se elimina con rapidez de la sangre y posee una cinética tricompartmental con vida media de 0.08, 2.3 y 85 horas (Gennaro *et al.* 2003). Un 70% de la dosis de VCR es excretada por las heces principalmente como metabolito resultantes de su metabolismo hepático y excreción biliar (Celorio, 1986). La vincristina difiere en la mayoría de otros agentes antineoplásicos por la baja incidencia de depresión de la médula ósea (Gennaro *et al.* 2003), aun cuando produce parestesias y debilidad muscular (Raviña, 2008).

1.3.6 Usos de la vincristina y vinblastina

La vinblastina es un componente del régimen multidroga de primera línea para el tratamiento de carcinoma testicular, linfoma de Hodgkin, cáncer de vejiga y un agente alternativo para el tratamiento de carcinosarcoma, los carcinomas espinocelulares de

cabeza y cuello, carcinoma de la célula renal, el neuroblasto, cáncer de mama, carcinoma cervical, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, y la micosis fungoide. También se utiliza en los tratamientos de linfoma, leucemia linfocítica, el sarcoma de células reticulares y enfermedad de Letterer-Siwe (Gennaro *et al.* 2003).

La vincristina es la segunda droga antineoplásica utilizada con mayor frecuencia y es en particular útil para el tratamiento de procesos malignos hemáticos. La vincristina es un componente del 27 régimen combinado de primera línea para el tratamiento de pacientes con leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica crónica en fase aguda, Linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma histiocítico difuso, linfoma folicular, carcinoma cervical, carcinoma broncogénico, tumor de Wilms, meduloblastoma, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de Ewing o rhabdomyosarcoma embrionario y un agente alternativo para el tratamiento de cáncer de mama, carcinoma cervical, carcinoma testicular, glioblastoma y leucemia linfocítica crónica. Hay que tener en cuenta que la vincristina se prefiere utilizar solo en la inducción de remisiones y no como tratamiento de mantenimiento debido a que la administración crónica se asocia con mayor riesgo de neurotoxicidad (Gennaro *et al.* 2003).

1.3.7 Toxicidad

Los principios activos vincristina y vinblastina son alcaloides binarios, y ejercen actividad antimitótica, inhibiendo la formación de microtúbulos en el ciclo celular. Como los microtúbulos también intervienen en la neurotransmisión, estas sustancias son neurotóxicas y provoca convulsiones, dolores, pérdida de reflejo y otros trastornos secundarios como deficiencia respiratoria (Castillo *et al.* 2007).

2. Plantamiento del Problema

Actualmente de acuerdo con la OMS, el cáncer es la primera causa de muerte en el mundo (SSA, 2014) en México se reportan más de 128 000 casos al año por lo que es la tercera causa de muerte según lo reportado por la Unión Internacional contra el cáncer (UICC) en 2013 (Cruz *et al.* 2015).

Existen 100 tipos de cáncer, la mayoría son curables si son detectados en etapas tempranas (OMS, 2015). De ahí el interés del presente trabajo de centrar el análisis en los metabolitos secundarios, específicamente los alcaloides Vinblastina y Vincristina, contenidos en *Catharanthus roseus* los que según reportes de Maryam Moudi y colaboradores en 2013, presentan actividad antineoplásica, aunado a esto *Catharanthus roseus* presenta una actividad hipoglucemiante por lo que es utilizada para tratar la diabetes; otros usos dados a esta planta, están relacionados con padecimientos como malaria, dengue, diarrea, dermatosis, como agente antiséptico en heridas, erupciones de la piel y así como para tratar dolores de muela, como diaforético y diurético, por mencionar algunos.

3. Justificación

México es un país con una gran diversidad en fauna y flora, dentro de la gran variedad de la flora existen plantas que tienen utilidad en la industria farmacéutica pues a partir de ella se sintetizan principios activos que tienen efectos positivos en la clínica, a partir de ello la intención del trabajo es obtener un extracto de la planta denominada *Catharanthus roseus* misma que sin ser endémica del país, ha tenido una buena adaptación al clima, lo que le ha permitido extenderse su cultivo como planta de ornato. Esta planta, tiene en su composición sulfato de vincristina y vinblastina mismos que son activos que tienen gran uso como antineoplásicos por lo que se llevaron a cabo pruebas fitoquímicas, para identificar la presencia de dichas sustancias, así mismo se realiza la caracterización mediante la Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Espectroscopia de UV-VIS.

4. Hipótesis

Hipótesis nula

Vincristina y Vinblastina son alcaloides obtenidos a partir de las hojas de la planta Vinca de Madagascar que tienen propiedades antineoplásicas.

Hipótesis alternativa

Vincristina y Vinblastina son alcaloides obtenidos a partir de las hojas de la planta Vinca de Madagascar que no presentan propiedades antineoplásicas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Obtener el extracto de *Catharanthus roseus* utilizando diferentes solventes y métodos de extracción así mismo llevar a cabo la de la identificación, caracterización, evaluación analítica y biológica del extracto

5.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluación fitoquímica de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *Catharanthus roseus*.
- 2) Realizar pruebas fisicoquímicas al extracto acuoso.
- 3) Caracterización del extracto mediante las técnicas de: Espectroscopia de Infrarrojo (IR) en la región lejano, medio y cercano, Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-Vis).
- 4) Evaluar las propiedades antineoplásicas del extracto en células *in vitro*

6. Metodología

El material utilizado para esta tesis:

6.1 Material de laboratorio.

- Mortero
- Tubos de ensayo
- Pinzas para tubo de ensayo
- Pipeta
- Anillo metálico
- Embudo
- Matraz de aforación 50 mL
- Vaso de precipitado 500 mL
- Parrilla eléctrica
- Manta de calentamiento

6.2 Equipo de laboratorio

- Equipo soxhlet
- Estufa
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Espectrofotómetro IR

6.3 Reactivos:

Los disolventes empleados son:

- Etanol (reactivo ASC $\geq 99.5\%$ de Sigma- Aldrich)
- Agua destilada
- Metanol (reactivo ASC $\geq 99.9\%$ de Sigma- Aldrich)

Reactivos para la caracterización

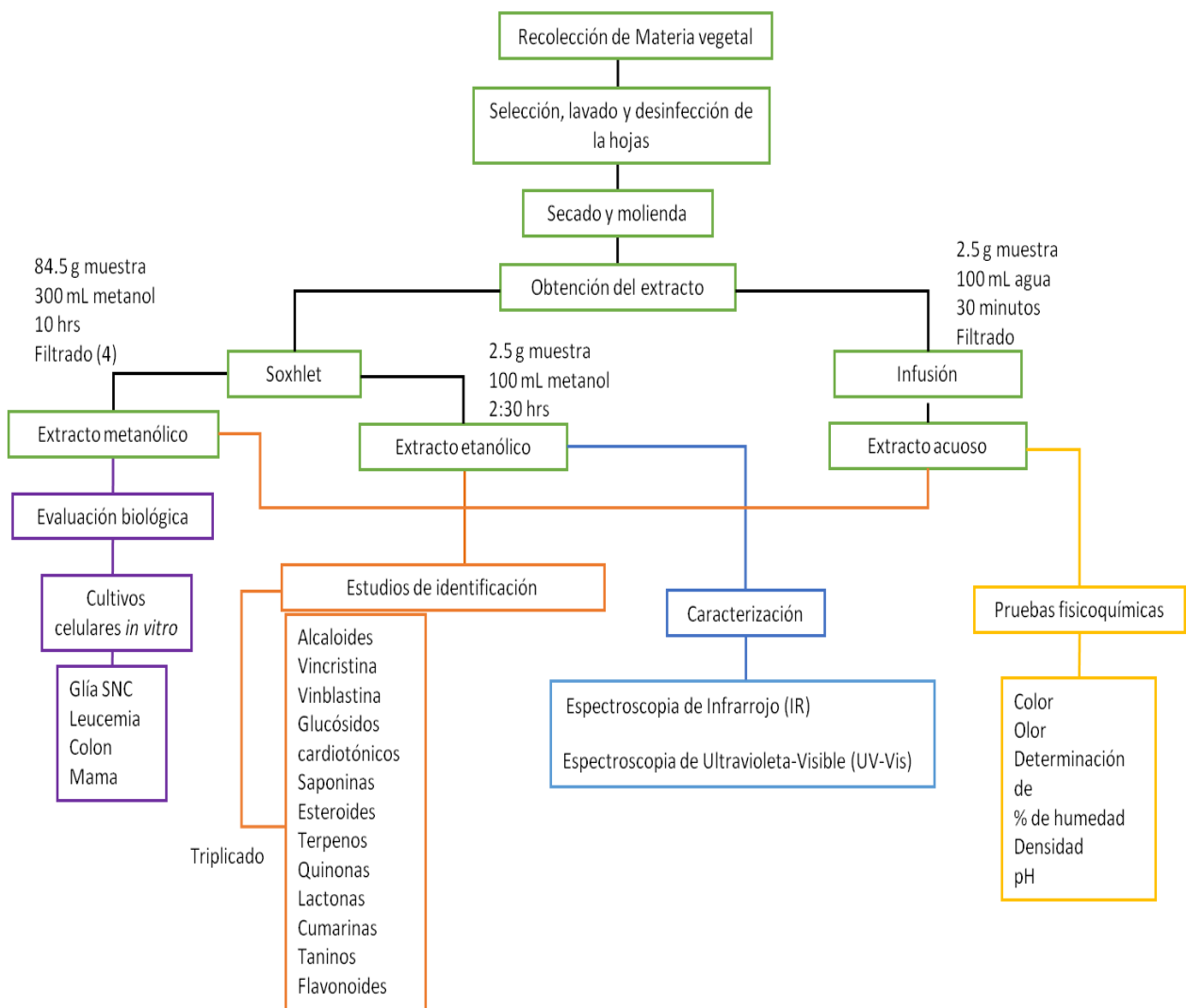
- Bromuro de potasio (Reactivo ASC $\geq 99.0\%$ Sigma- Aldrich)
- Acetona (Reactivo ASC $\geq 99.5\%$ Sigma- Aldrich)

Reactivos para pruebas fitoquímicas

- Ácido clorhídrico (34-37% de Sigma-Aldrich)
- Cloruro de sodio (grado reactivo ACS de Sigma-Aldrich)
- Cloruro férrico (grado reactivo, 99.13% de Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de amonio (grado reactivo ACS, 28.0-30.0% de Sigma-Aldrich)
- Magnesio (grado reactivo ACS, 98% de Sigma-Aldrich)
- Piridina (grado reactivo ACS, $\geq 99.0\%$ de Sigma-Aldrich)
- Nitroprusiato de sodio (grado reactivo ACS, $\geq 99.0\%$ de Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio (pellets, 99.9% de Sigma-Aldrich)
- Cloroformo (anhídrido. $\geq 99\%$ de Sigma-Aldrich)
- Anhídrido acético (grado reactivo ACS, $\geq 98.0\%$ de Sigma-Aldrich)
- Ácido acético (grado reactivo ACS, $\geq 99.7\%$ de Sigma-Aldrich)
- Sulfato ferroso amónico (grado reactivo ACS, 98.5 -104.5% de Sigma-Aldrich)

- Cloruro de bario (grado reactivo ACS, 99.0-100% de Sigma-Aldrich)
- Ácido fosfórico (85% en H₂O de Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial (grado reactivo ACS, ≥ 99.7% de Sigma-Aldrich)
- Zinc en polvo (grado reactivo ACS, ≥ 99.8% de Sigma-Aldrich)
- Acetona (grado reactivo ACS, ≥99.5% de Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Meyer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Erlich

Diagrama de trabajo



6.2 Muestreo

Las plantas de *Catharanthus roseus* var. *albus* y var. *roseus*, se obtuvieron en la localidad de Cabrera, Municipio de Atlixco, Puebla, en el Mega viveros Manuel Gómez Morín.

La parte utilizada de la especie *Catharanthus roseus* var. *albus* y var. *roseus* fueron las hojas. La toma de muestra de las hojas se realizó en las primeras horas de la mañana, las hojas recogidas eran jóvenes pero completamente desarrolladas, se realizó la selección de las hojas sanas en forma manual, se inició el desojado por la parte inferior de la planta hacia la superior, evitando el desojado de solo una zona. Posteriormente se lavó con agua corriente para eliminar tierra adherida, se desinfectó con Hipoclorito de Sodio, el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente a la sombra durante 5 a 10 días y luego se molieron hasta obtener un polvo seco.

6.5 Obtención del extracto

Para la obtención de los componentes químicos de las hojas de *C. roseus*, se sometieron a procesos de extracciones diferentes, para las dos primeras muestras se utilizó el método de Soxhlet y la tercera muestra por el método de infusión. Una vez que se obtuvieron las muestras, los extractos se conservaron en refrigeración a 4°C en frascos ámbar hasta su uso.

6.5.1 Extracto acuoso

Para obtener el extracto acuoso, se colocaron 2.5 g de la muestra en un vaso de precipitados con 100 mL de agua destilada previamente calentado a punto de ebullición, se dejó reposar durante 30 minutos y luego se realizó un filtrado.

6.5.2 Extracto etanólico

Se preparó el extracto etanólico colocando 2.5 g de muestra en un cartucho de papel filtro de 5 cm x 10.5 cm y se colocó dentro del equipo Soxhlet. Se usaron 100 mL de etanol grado reactivo como solvente, se llevó a cabo el proceso por 3 horas a una temperatura de 78 °C con agitación constante.

6.5.3 Extracto metanólico

Para la obtención del extracto metanólico se pesaron 84.5 g de muestra y se colocó en cartuchos de 5 cm x 10.5 cm. En un matraz colector se adiciono 300 mL de metanol grado reactivo como solvente, el proceso se llevó a cabo durante 10 horas a temperatura y agitación constante.

6.6 Pruebas fitoquímicas

Se realizó un análisis fitoquímico cualitativo para determinar los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos. El análisis incluyo las pruebas de identificación para los grupos químicos como alcaloides, vincristina, vinblastina, saponinas, flavonoides, taninos, glucósidos cardiotónicos, lactonas, cumarinas, entre otros, que se detallaran más adelante. Cada una de las pruebas se hizo por triplicado en los tres extractos, con el fin de corroborar los primeros resultados obtenidos.

6.6.1 Prueba para Alcaloides

Se adiciona en 3 tubos de ensayo 1 mL de extracto, se aciduló con 1 mL de ácido clorhídrico al 5%. Al primer tubo se agrega dos gotas de reactivo de Dragendorff, al segundo dos gotas del reactivo de Wagner y al tercero de uno a dos gotas del reactivo de Meyer (Marcano *et al.* 2002). La presencia de alcaloides se detecta al producirse una precipitación.

Reactivo de Dragendorff: Precipitado naranja o rojiza.

Reactivo de Wagner: precipitado marrón.

Reactivo de Meyer: Precipitado blanco.

6.6.2 Prueba para Vincristina

Disolver 10 mg de sulfato férrico amónico en 1 ml de ácido fosfórico, se transfieren 3 gotas de esta solución a un tubo de ensayo con 0,5 mL del extracto y calentar en baño de María durante 10 minutos; una coloración rosa indica la presencia de vincristina (OMS, 2015)

6.6.3 Prueba para Vinblastina

Se disuelve 1 mL de extracto en 2 mL de agua, se agrega 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y 1 mL de cloruro de bario. Una prueba positiva da formación a un precipitado blanco (OMS, 2015)

6.6.4 Taninos (Prueba de Cloruro férrico)

En un tubo de ensayo adicionar 2.5 mL del extracto y 1 mL de agua destilada, luego añadir de 5 a 10 gotas de FeCl_3 al 5% (Sharapin *et al.*2000). La aparición de una coloración verde, azul, rojo- vino indica prueba positiva para taninos.

- Una coloración azul son taninos gálicos.
- Una coloración verde son taninos catéquicos.
- Una coloración rojo-vino son compuesto fenólicos en general.

6.6.5 Flavonoides (Prueba de Shinoda)

En un tubo de ensayo con 2 ml del extracto, se agregan de 2 a 3 virutas de magnesio y 1 mL de HCl concentrado (Castillo y Ramírez, 2006). Después del desprendimiento de hidrogeno hay un desarrollo inmediato de la coloración que es indicativo de la presencia de flavonoides (Lock, 1997).

- flavonas y flavonoles: Amarillo a rojo,
- flavonoles: Rojo a magenta,
- flavonas: rojo, magenta, violeta y azul
- isoflavonas: amarillo
- isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración

6.6.6 Lactonas (Prueba de Legal)

Se adicionó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto con 2 a 3 gotas de piridina, seguido de una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y después se añaden 4 gotas de NaOH al 2N. Si se observa una coloración roja intensa indica presencia de lactonas (Marcano *et al.* 2002).

6.6.7 Glucósidos cardiotónicos (ensayo de Keller-Kiliani)

Se adiciona en un tubo de ensayo 2 mL del extracto, se disuelve en 1 mL de ácido acético glacial, posteriormente se agregan 1 a 6 gotas de FeCl_3 y 6 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La presencia de un color verde-azul (Osaman y Eltohami, 2013), violeta o púrpura indica glucósidos cardiacos (Martínez *et al.* 2008)

6.6.8 Cumarina (Reactivo de Erlich)

A 1mL del extracto se le agregan gotas de reactivo de Erlich (1mL), La prueba es positiva si da una coloración naranja (Plazas, 2012).

6.6.9 Esteroides (Prueba de Liebermann-Burchard)

En un tubo de ensayo con 1 ml del extracto, se añade 5 mL de cloroformo y 5mL de anhídrido acético. La prueba es positiva si existe a formación de un anillo de color azul-verde (Plazas, 2012).

6.6.10 Saponinas (Prueba de espuma)

En un tubo de ensayo se adicionaron 1mL del extracto y 4 mL de agua destilada, tapar la solución, luego agitar vigorosamente por 2 minutos, la formación de espuma estable por 20 minutos indica prueba positiva. (Mujeeb *et al.* 2014).

6.6.11 Terpenos (Prueba de Salkowki)

Se coloca 1 mL del extracto en un tubo de ensayo, luego cuidadosamente se añadió 2 mL de cloroformo y 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. La presencia de una coloración marrón rojizo significa la presencia de terpeno (Plazas, 2012).

6.6.12 Quinonas (Comportamiento ácido base)

En dos tubo de ensayo se agrega zinc en polvo, se disuelven ambos tubos con 0.2 mL del extracto. En el primer tubo se le trata con 2 gotas de HCl concentrado, al siguiente tubo se añade NaOH al 40%. La prueba es positiva si la fase alcalina adquiere una coloración amarilla indica presencia de quinonas (Plazas, 2012).

6.7 Análisis analítico

6.7.1 Pruebas organolépticas (Sensoriales)

Color y olor

6.7.2 Determinación de humedad por desecación de estufa.

1. La capsula se calentó en la estufa a 120°C por una hora. Se dejó enfriar en un desecador y se pesó.
2. En la capsula se depositó la cantidad de muestra preparada (5g)
3. Se puso en la estufa y se calentó a 105°C.
4. Terminado el tiempo de calentamiento, la capsula se pasó al desecador y se pesó.
5. Se repitió la operación de calentamiento y pesado por 30 minutos, hasta obtener un peso constante.

Expresión de resultados:

El porcentaje de humedad se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad (perdida de desecación)} = \frac{(P_1 - P_2) \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Dónde:

P_1 = peso de la cápsula más la muestra antes de desecación.

P_2 = peso de la cápsula más la muestra antes desecada.

6.7.3 Determinación de pH

1. La determinación se hizo por duplicado usando el extracto acuoso.
2. Se colocó en un vaso de precipitado 10 g de muestra con 10 mL de agua destilada previamente calentada y se dejó enfriar.
3. Se homogenizó la muestra.
4. Se introdujo el electrodo del potenciómetro en el vaso de precipitados con la muestra, evitando que no tocara las paredes.

6.7.4 Determinación de densidad relativa a 25°C por método de picnómetro según la norma NMX-F-075-1987.

1. Preparación del picnómetro.
 - 1.1 El picnómetro se lavó y se enjuagó con agua destilada, se secó en la estufa a 100 °C por una hora, y se dejó enfriar durante media hora, en el desecador y pesó tres veces hasta tener masa constante (M).
2. Peso del picnómetro con agua.
 - 2.1 Se llenó totalmente el picnómetro con agua destilada a 20°C, y se tapó cuidadosamente evitando que se formaran burbujas de aire.
 - 2.2 Se sumergió en un baño María de 25°± 2°C durante 30 minutos controlando la temperatura del baño, se extrajo del baño, se secó y se pesó (M1).
3. El picnómetro se vació y luego se lavó con etanol, se dejó secar y se pesó (m).
4. Peso del picnómetro con muestra.
 - 4.1 Se llenó el picnómetro con la solución acuosa de *Catharanthus roseus*, se tapó evitando la formación de burbuja de aires, se sumergió en baño de agua a 25°C±

2°C durante 30 minutos controlando la temperatura con el termómetro del picnómetro.

4.2 Se sacó el picnómetro y se secó a temperatura ambiente por 30 minutos y se pesó (M2).

Expresión de resultados:

La densidad relativa se calcula de la siguiente manera:

$$G_1 = M_1 - M$$

$$G_2 = M_2 - M$$

$$\delta = \frac{G_1}{G_2}$$

En donde:

M1= Masa del picnómetro con muestra

M2= Masa del picnómetro con agua

M = Masa del picnómetro vacío

G1 =Masa neta del extracto acuoso de *Catharanthus roseus*

G2 = Masa neta del agua

• = Densidad relativa de *Catharanthus roseus*

T (°C) con respecto al agua de la misma Temperatura

6.8 Caracterización del extracto

6.8.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

1. Preparación de la muestra: Se realizó la extracción etanólica, luego se realizó un concentrado del extracto con el rota vapor, para la eliminación del solvente.
2. Preparación de la pastilla de KBr: Se mezcló un mg o menos de la muestra con aproximadamente 100-300 mg de KBr en mortero.
3. Se presionó la mezcla en el troquel especial entre 700 y 1000 Kg/cm² hasta obtener un disco.
4. El disco se colocó en la trayectoria del haz del instrumento para su estudio.

6.8.2 Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-Vis)

1. Se realizó el extracto alcohólico.
2. La celda que se utilizó se enjuagó cinco veces con etanol.
3. Se realizó la medida de un blanco, luego se comenzó a medir la muestra.

6.9 Evaluación biológica del extracto metanólico

Para evaluar la viabilidad y la citotoxicidad del extracto metanólico de *C roseus* se usó el ensayo de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) de acuerdo con el protocolo sugerido por la Dra. Calvillo y colaboradores.

6.9.1 Protocolo 1: Concentración inhibitoria en células gliales del SNC

La línea celular (U251) prolifera en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), y una mezcla de antibióticos-antimicótico. En cada placa se depositó por triplicado en un volumen de 100 μ l/pozo una densidad de inóculo de 5×10^4 cel/ml, y se incubaron por 24 hrs a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ para favorecer la estabilidad de las células antes de adicionar las sustancias a probar. El compuesto se solubilizo en agua. Para la curva concentración respuesta se agregaron 100 μ l de la solución con el compuesto a probar, la concentración final en el pozo correspondió a: 31, 10, 3.1 y 1 μ M. Nuevamente la microplaca es incubada por 48 hrs bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación las células, se fijan *in situ* añadiendo 50 μ l de una solución de ácido tricloroacético frío al 50% incubadas a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se efectuó añadiendo 100 μ l de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida fue removido con lavados de ácido acético al 1% y se dejaron secar al ambiente. Las placas teñidas y secas se les agrego 100 μ l de un buffer de tris y se agitan por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515nm. Los datos se procesaron empleando el promedio de la DO de los 3 pozos/línea celular tratada con el compuesto (DO_t), los 3 pozos tratados con agua y pozos de testigos, es decir aquellos que no tiene células pero

si compuesto (DO_b). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\%IC = 100 - (DO_t - DO_b / DO_c - DO_b) * 100$$

6.9.2 Protocolo 2: Porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares

Las líneas celulares fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), y una mezcla de antibióticos-antimicótico. En cada placa se depositaron dos líneas celulares por triplicado en un volumen de 100 µl/pozo en una densidad de inóculo de 5000 a 10,000 cel/ml, y se incubaron por 24 hrs a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ para favorecer la estabilidad de éstos antes de adiciona la sustancia a probar. Para un screening primario el compuesto problema, se tomó una alícuota de la solución stock y se diluyo en medio de cultivo suplementado. Se agregaron 100µl de la solución con el compuesto a probar quedando la concentración final a 25 µg/ml. Nuevamente la microplaca es incubada por 48 hrs bajo las condiciones antes mencionadas. Al finalizar el periodo de incubación las células, se fijan in situ añadiendo 50µl de una solución de ácido tricloroacético frío al 50% incubada a 4°C por 60 minutos. Se desechó el sobrenadante y las placas fueron lavadas 5 veces con agua y secadas al ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se efectuó añadiendo 100µl de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB) e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida fue removido con lavados de ácido acético al 1% y se dejaron secar al ambiente. Las placas teñidas y secas se les agrego 100µl de un buffer de tris y se agitan por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515nm. Los datos se procesaron empleando el promedio de la DO de los 3 pozos/línea celular tratada con el compuesto (DO_t), los 2 pozos tratados con el extracto y 2 pozos de testigos, es decir aquellos que no tiene células pero si compuesto (DO_b). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\%IC = 100 - (DO_t - DO_b / DO_c - DO_b) * 100$$

7. Resultados

7.1 Pruebas físicas

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas fisicoquímicas y organolépticas efectuado al extracto.

El pH, densidad y porcentaje de humedad se realizó solo al extracto acuoso, las pruebas sensoriales u organolépticas se analizó en los tres extractos.

Tabla 5: Resultados de las pruebas fisicoquímicas y organolépticas.

Pruebas fisicoquímicas	Resultados
Color	Verde oscuro en extracto etanólico Verde oscuro en extracto metanólico Amarillo claro en extracto acuoso
Olor	Característico
pH	4.90 – 4.91
Densidad	0.9959 g / cm ³
% de humedad	85.82 %

7.2 Pruebas fitoquímicas

En la tabla 6 de la pág. 33, se muestra los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares. Los tres extractos analizados evidenciaron la presencia de alcaloides, vinblastina, flavonoides, taninos, glucósidos cardiotónicos, no se detectó presencia de saponinas en el extracto acuoso y etanólico, sin embargo hay presencia de saponina en el extracto metanólico. Otro de los resultados que varían es la presencia de pequeñas cantidades de vincristina en el extracto acuoso. Según reportes de Bernal, Cruz y Sáenz, en su trabajo de tesis reportan la presencia de alcaloides, glucósidos cardiotónicos, taninos y sesquiterpenlactonas en *Catharanthus roseus*.

Tamizaje fitoquímico

Tabla 6: Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas a *Catharanthus roseus* para determinar los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

Prueba fitoquímica	Metabolitos	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto metanólico
Reactivo Dragendorff	Alcaloides	++	+++	+
Reactivo Wagner	Alcaloides	++	++	+
Reactivo Meyer	Alcaloides	+	++++	++
Prueba de Vincristina	Alcaloides	+	-	-
Prueba de Vinblastina	Alcaloides	++++	++++	+++
Prueba de cloruro férrico	Taninos	++	++	++
Prueba de Shinoda	Flavonoides	++++	+	++
Prueba de Legal	Lactonas	-	-	-
Ensayo de Keller-Kiliani	Glucósidos cardiotónicos	+	++++	++
Reactivo de Erlich	Cumarinas	-	-	-
Prueba de Liebermann-Burchard	Esteroides	-	-	-
Prueba de espuma	Saponinas	-	-	++
Prueba de Salkowki	Terpenos	-	-	-
Comportamiento ácido base	Quinonas	-	-	-

+ Prueba positiva en baja concentración.

++ Prueba positiva en mediana concentración.

+++ o más Prueba positiva en alta concentración.

- Prueba negativa

7.3 Caracterización del extracto de *Catharanthus roseus*

7.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Técnica de FTIR

En la figura número 7, muestra el espectro de IR con transformadas de Fourier del extracto etanólico al 80% de *Catharanthus roseus*.

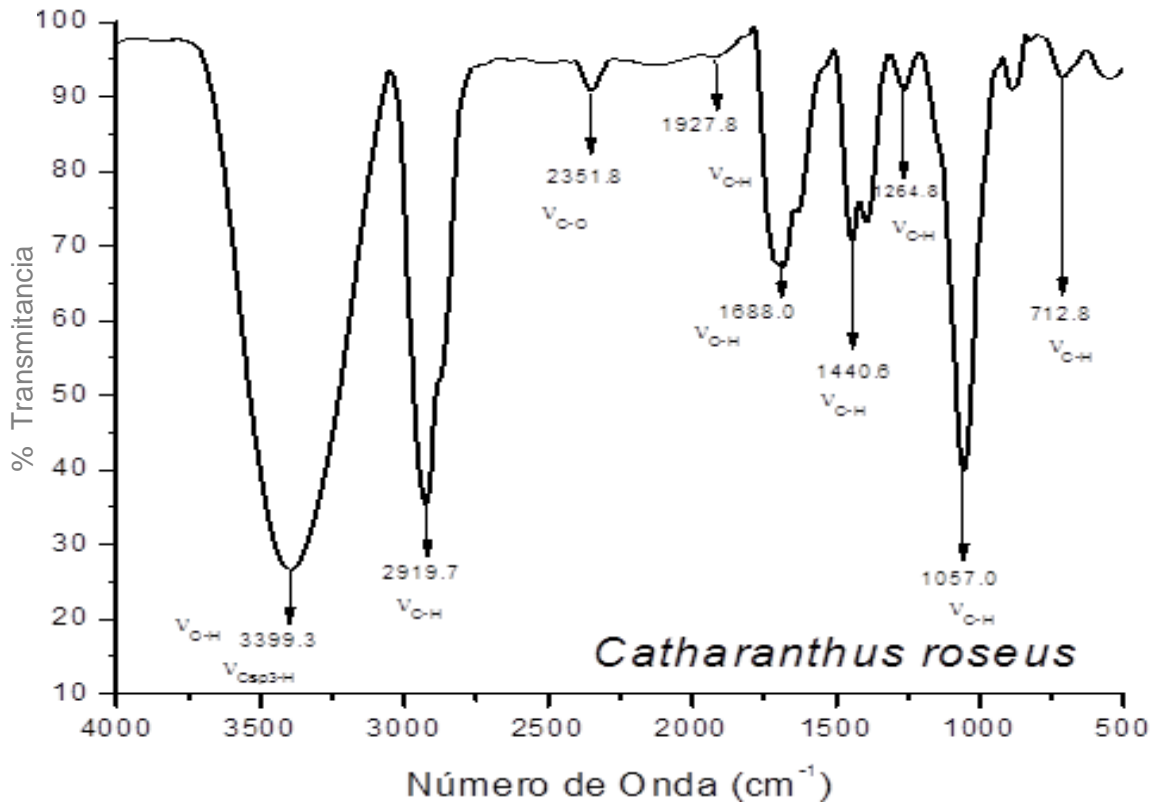


Figura 7: Espectro de IR del extracto de *Catharanthus roseus*

El espectro de FTIR del extracto de *Catharanthus roseus*, muestra una banda de absorción ubicada en 3 399.3 cm⁻¹ se observa una banda de absorción ancha, que identifica al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos hidroxilos (nO-H) asignados a los grupos hidroxilos (OH-) del agua (H-OH) y al modo de vibración (nN-H) del extracto de *Catharanthus roseus*. Hacia 2 919.7 cm⁻¹, se localizan los modos de vibración tipo alargamiento (nCsp²-H) de los grupos C-H metilos y metilenos, además del modo de vibración del CH₃ fuera de fase degenerada dCH₃. En 2857.0 cm⁻¹ se presenta el modo de vibración de estiramiento nCsp²-H. La banda de absorción en 1 688.0 cm⁻¹, representa a los modos de vibración (nC=N), del tipo flexión (nOH), y a la deformación dHOH del agua coordinada, así como el modo de vibración (nC-C). A 1 440.6 cm⁻¹ se localizan las vibraciones de tipo alargamiento simétricas nCOO⁻ y el modo de vibración de

doblaje de deformación fuera de fase degenerado dCH_3 . En $1\,372.0\text{ cm}^{-1}$ se ubican los modos de vibración de formación en fase dCH_3 tipo torsión y el modo de vibración de doblaje de deformación dCH_3 , así como el modo de vibración de (nC-CO-C) . La banda localizada en $1\,264.8\text{ cm}^{-1}$ de absorción es asignada al modo de vibración tipo alargamiento de los grupos C-C (nC-C), y C-O (nC-O) asignada al monómero. La banda ubicada en 1057.0 cm^{-1} corresponde al modo de vibración (nCH_2) tipo balanceo, así como también se le asocia al modo de vibración (nO-C-C). Hacia regiones de baja energía del espectro infrarrojo en 712.0 cm^{-1} , 594.0 cm^{-1} y 540.0 cm^{-1} se ubican los modos de vibración de doblaje fuera del plano (gC-H) de las olefinas.

Esto corresponde a las sustancias activas encontradas en el extracto de *Catharanthus roseus*, de acuerdo a las pruebas fitoquímicas correspondientes.

7.3.2 Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-Vis)

Técnica de Ultravioleta-Visible (UV-VIS)

La figura 8, muestra los espectros de UV-VIS del extracto etanólico de *Catharanthus roseus*.

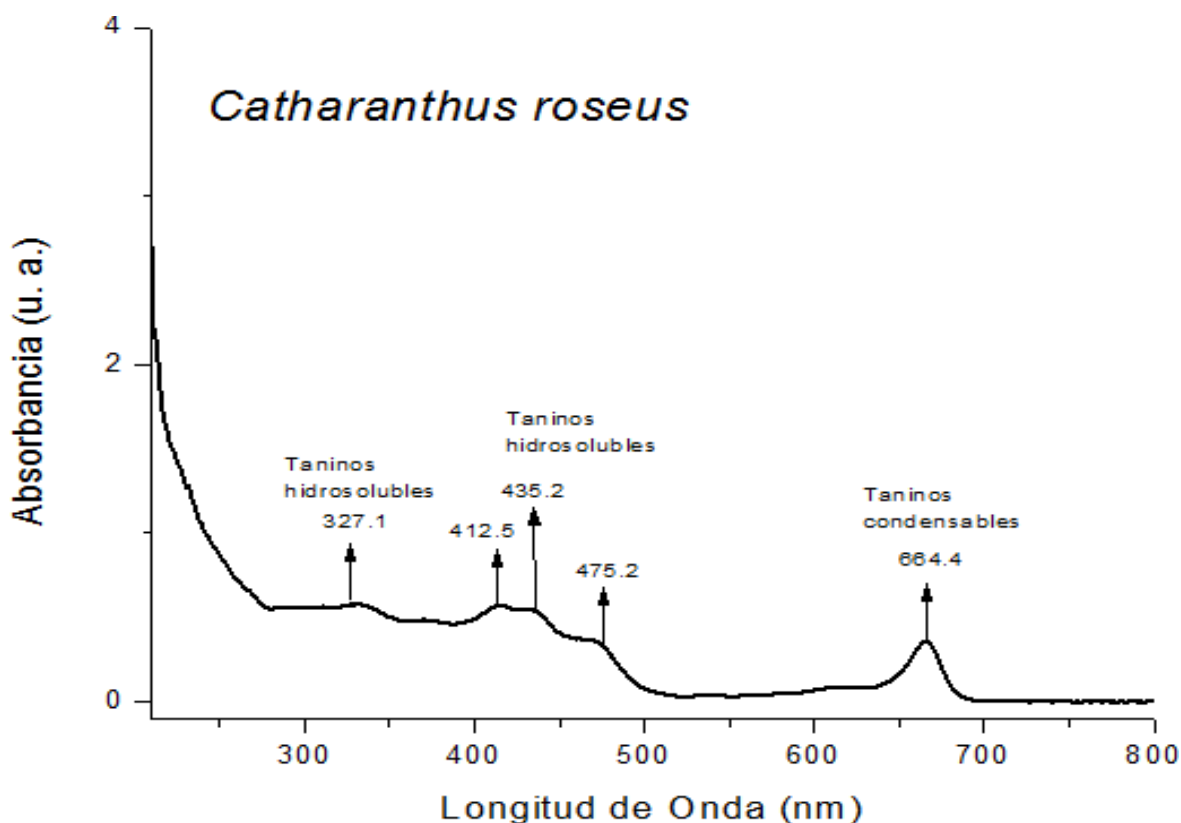


Figura 8: Espectro de UV. Vis del extracto de *Catharanthus roseus*

El espectro de UV-VIS del extracto de *Catharanthus roseus* presenta tres picos de máxima absorción. Uno en la región del espectro visible cuyo valor de longitud de onda se encuentra en 664.4 nm el cual corresponde a los taninos condensables. Entre 412.5 nm, 435.2 nm y 475.2 nm; se ubica el segundo pico de máxima absorción (en los límites del espectro ultravioleta y visible) correspondiente a los taninos hidrosolubles y alcaloides, el tercer pico de máxima absorción localizado en la región del espectro ultravioleta de longitud de onda igual a 327.1 nm auxóchromos o cromóforos de los heterociclos aromáticos de cinco miembros, al dieno homoanular, a los bencenos monosustituidos por grupos auxóchromos y a los derivados bencénicos.

7.4 Evaluación biológica

7.4.1 Determinación de citotoxicidad del extracto metanólico en líneas celulares

Para este ensayo se realizó una curva dosis-respuesta con el fin de identificar la concentración inhibitoria al 50 %, evaluada en células Gliales del Sistema Nervioso Central, teniendo como resultado un IC_{50} de $1.43 \pm 0.2 \mu M$, así mismo se repitió el mismo procedimiento con el estándar (Cisplatino), obteniendo un IC_{50} de $5.31 \pm 0.7 \mu M$. Ver tabla 7.

Estas concentraciones se evaluaron en diferentes líneas celulares (glías, leucemia, colon y mama), cuyos resultados se observan en la tabla 8.

Tabla 7: Actividad citotóxica del extracto metanólico de *Catharanthus roseus* sobre la línea celular del Sistema nervioso central (Glías)

Muestra	Código	Células	IC_{50} (μM) U251	% citotoxicidad PBS (50 μM)
Extracto de planta	5435	Glías	1.43 ± 0.2	No citotóxica
Cisplatino	Estándar	Glías	5.31 ± 0.7	No citotóxica

7.4.2 Determinación del % de inhibición del crecimiento

Tabla 8: Resultados de % de inhibición del crecimiento celular.

Muestra	Código	% de Inhibición del crecimiento				
		U251	K562	HCT-15	MCF-7	PBS
Extracto	STE4905	100	94.77±5.2	96.06±3.9	64.3±26.6	No citotóxica
Cisplatino	Estándar	100	100	100	100	No citotóxica

U251= glía de sistema nervioso central, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama

8. Discusión

El cáncer representa una importante causa de muerte a nivel mundial, hasta el momento, no hay un tratamiento adecuado para este padecimiento, sin embargo la bibliografía menciona que los alcaloides de la Vinca obtenidos de *Catharanthus roseus* han ayudado a combatirlo interfiriendo en el montaje de los microtúbulos mediante la combinación con la tubulina este efecto determina la interrupción de la mitosis en la metafase (Gennaro *et al.*2003).

En el presente de trabajo de tesis, se llevaron a cabo estudios, al extracto de *Catharanthus roseus*, con el fin de caracterizar y probar las propiedades anticancerígenas de los alcaloides presentes; parte de estos análisis fue la determinación de la densidad (0.9959 g/cm³), % humedad (85.82 %) y pH (4.90- 4.91). Estos parámetros son de importancia, dado que de estos depende el crecimiento de bacterias, hongos y de la hidrólisis de los componentes de la planta, que provocan el deterioro de las drogas a estudiar, causando que los resultados no sean viables.

Los métodos de extracciones que se realizaron, al igual que los solventes utilizados se seleccionaron para lograr obtener el extracto en la condiciones necesarias para obtener resultados confiables en las pruebas fitoquímicas y así ser utilizados en los estudios biológicos.

Posteriormente se realizó las pruebas fitoquímicas preliminares, en las que se encontraron, flavonoides, taninos, glucósidos cardiotónicos y alcaloides, es impórtate mencionar que la prueba de más importancia es la de los alcaloides porque indican la posible presencia de los metabolitos que se desean evaluar. En las pruebas de alcaloides se realizaron cinco métodos rápidos para su verificación, dos de estas pruebas son específicas para vincristina y vinblastina que es de interés para el estudio, dado que son empleados como antineoplásicos.

En los resultados de las pruebas para alcaloides con los reactivos de Meyer, Wagner y Dragendorff, mostraron la presencia de alcaloides en los diferentes extractos, aunado a esto no indica la presencia de vincristina y vinblastina, por lo cual se realizó pruebas específicas para estos dos alcaloides. Las últimas dos pruebas mostraron presencia de vincristina y vinblastina, esta última en mayor proporción, mientras que no se observó con claridad vincristina, lo cual sugiere que hay una menor cantidad o no está presente en la planta.

La caracterización del extracto de *Catharanthus roseus*, se realizó mediante la espectroscopia de ultravioleta visible y espectroscopia de infrarrojo por FTIR, los datos obtenidos en los diferentes espectros no muestra con certeza la presencia de los metabolitos de interés para el presente trabajo, que son los alcaloides. Esto se puede deber a que existen alcaloides que carecen de cromóforos y no absorben en esta región de UV-vis, es el caso de alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos o terpénicos. La bibliografía menciona que los alcaloides que tienen átomos con electrones solitarios, dobles o triples en enlaces aislados absorben a una longitud de onda de entre 150 a 200 nm del ultravioleta lejano.

En relación a los resultados obtenidos en el espectro del IR, proporciona información sobre la presencia o ausencia de los sustituyentes de las moléculas presentes en el extracto. En el libro Remington farmacia menciona que el espectro infrarrojo de cada alcaloide es exclusivo, si se dispone de un espectro de referencia es posible que se puedan identificar correctamente los alcaloides de interés.

Los resultados obtenidos, deben ser considerados como preliminares, dado que no realizamos una segunda lectura del extracto obtenido, que nos permitiera verificar la presencia de los alcaloides VCR y VBL.

La evaluación del IC_{50} permitió conocer la concentración μM a la cual se ve el efecto inhibitorio del extracto en el 50% de la población celular, debido a su acción farmacológica ya que esta actúa en la metafase de la mitosis.

El efecto antineoplásico del extracto destaco en las células gliales con un 100% de inhibición al igual que el estándar, cabe destacar que el cisplatino presento el mismo efecto inhibitorio en todas las líneas celulares utilizadas. Sin embargo el efecto de la muestra disminuye en las otras líneas celulares, esto se puede atribuir a la presencia de otros metabolitos secundarios presentes, a que los alcaloides de interés farmacológico son por lo general utilizados como terapia alternativa para diferentes tipos de cáncer como son el de mama y colon por lo que su acción farmacológica se ve alterada.

9. Conclusión

Las plantas medicinales tienen una amplia fuente de metabolitos secundarios, con diversas actividades biológicas, en el análisis fitoquímico preliminar efectuado sobre la muestra de hojas de *Catharanthus roseus* en el extracto acuoso, etanólico y metanólico, evidencian la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides y glucósido cardiotónicos.

La presencia de vincristina en *Catharanthus roseus* se hizo evidente en el extracto acuoso, los resultados no son concluyentes, debido a que en la prueba fitoquímica para vincristina se observó una coloración muy tenue, lo cual puede deberse a la escasa presencia del alcaloide en la planta y a que los alcaloides son termolábiles.

Con la prueba preliminar para Vinblastina se confirmó que hay mayor proporción este alcaloide en *Catharanthus roseus*.

De los extractos etanólico y acuso se obtuvo un resultado negativo para saponinas, mientras que para el extracto metanólico se observó una prueba positiva, por lo que se considera negativa la prueba ya que dos extractos no presenta saponinas, otra razón puede deberse a la cantidad de materia vegetal empleada para la pruebas.

En la caracterización del extracto etanólico de *Catharanthus roseus* por espectroscopia infrarrojo y espectroscopia ultravioleta-visible, no son representativos para confirmar que la planta efectivamente contiene los alcaloides de interés farmacológico.

Al llevar a cabo las pruebas de densidad, % de humedad y pH, nos permiten proponer condiciones de secado y almacenaje de la planta en estudio, dado que no hay referencias bibliográficas que nos indique los valores para la conservación de la *Catharanthus roseus*.

El extracto metanólico de *Catharanthus roseus* si contiene los alcaloides VCR y VBL.

El extracto antes mencionado tiene la capacidad de inhibir células gliales, de leucemia, colon y mama, por lo que viable utilizar el método de extracción de Soxhlet.

10. Recomendaciones

Catharanthus roseus posee componentes termolábiles, es conveniente utilizar métodos de extracciones en los cuales la temperatura sean baja como es el método de maceración o percolación.

Utilizar mayor cantidad de materia vegetal para verificar que están presentes lo alcaloides de interés.

Proponer el estudio de otras plantas con propiedades medicinales, para identificar la presencia de alcaloides y saber si contiene mayor cantidad de vincristina y vincristina, para no utilizar una gran cantidad de muestra y tener un rendimiento menor a lo deseado. Ya que estos alcaloides son de gran uso en la medicina para el tratamiento del cáncer.

Evaluar otros usos que tenga *Catharanthus roseus* puesto que diversas sustancias que se identificaron en el estudio tienen utilidad en otros padecimientos por ejemplo la malaria, dengue, diabetes, dolores de muela etc.

Caracterizar los extractos mediante Cromatografía de líquidos de alta resolución con el fin de corroborar la presencia de los alcaloides de interés médico.

Aislar por cromatografía cada uno de los alcaloides y analizarlos por separado para tener una mejor caracterización.

Evaluar biológicamente el extracto acuoso y etanólico en diferentes líneas celulares.

Evaluar biológicamente el extracto metanólico en líneas celular en glías del sistema nervioso central, que confirmen su efecto terapéutico.

Bibliografía

1. Lock, O. (1994). *Métodos de estudios de productos naturales*. Fondo editorial: PUCP
2. Mendoza, P. N. (2008). *Farmacología médica*. México: Médica Panamericana.
3. Coy, B. C. A. Parra, J. & Cuca, S. L. E. (2014). *Caracterización química de aceites esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie rupati heptaphylla (rutaceae)*. Revista Elementos. Vol. 4, Núm. 4, 31-39. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. URL: <http://journal.poligran.edu.co/index.php/elementos/article/view/513>.
4. Schlaepfer, L. & Mendoza, E. J. A. (2010). *Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 41, Núm. 4, 18-27. Fecha de consulta 2 de marzo de 2016. URL: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57916060003.pdf>
5. Ocegueda, S. Moreno, E. & Koleff, P. (2005). *Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica*. CONABIO, Biodiversitas 62, 12-15. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2016. URL: <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv62art3.pdf>
6. Castillo, G.E. & Martínez, S. I. (2016). *Manual de fitoterapia*. Polonia: Elsevier España.
7. Sharapin, N., Machado, R. L., Pinzón, S. R., Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo., & Convenio Andrés Bello. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santa fé de Bogotá: CYTED.
8. Chaparro, P. A. P. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad antimicrobiana*. (tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá.
9. Hernández, H. G. (2011). *Tratado de medicina farmacéutica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
10. Gil-Loyzaga, P.E. (2011). *Cultivo de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid: Editorial Visión Libros.
11. Organización Mundial de la Salud. (2015). *Cáncer: Datos y cifras*. Fecha de consulta: 8 de marzo de 2016, de OMS. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
12. Escudero de los Ríos, P. M. (2013). *Oncología: Tópicos selectos*. México: Alfíl.

13. Granados, G. M. & Herrera G. A. (2010) *Manual de oncología: procedimientos médicos quirúrgicos*. México: McGraw-Hill
14. Organización Mundial de la Salud (2015). *La batalla mundial contra el cáncer no se ganara únicamente con tratamientos: Medidas de prevención eficaces que es preciso adoptar urgentemente para frenar la crisis del cáncer*. Fecha de consulta: 09 de abril de 2016. URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/>
15. New medical: Life sciences & medicine (2016). *¿Qué causa el cáncer?* Fecha de consulta: 09 abril de 2016. URL: [http://www.news-medical.net/health/What-Causes-Cancer-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-Causes-Cancer-(Spanish).aspx)
16. Arias, J. (2001). *Generalidades médico-quirúrgicas*. Madrid: Casa Editorial Mares - Editorial Tébar.
17. Medina, V. E. A & Martínez, M. R. (2009). *Fundamento de oncología*. México: Universidad Autónoma de México.
18. Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nueva terapias*. [En línea]. Fecha de consulta 09 de abril de 2016. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=BV-p7tv6lvIC&pg=PA19&dq=agentes+cancerigenos+fisicos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj9oeKA6ofMAhUCyYMKHUNnBqEQ6AEILzAE#v=onepage&q=agentes%20cancerigenos%20fisicos&f=false>
19. Coleman, C. N. (2008). *¿Qué hacer con un diagnóstico de cáncer?: La información para atender, hacerse cargo, elegir tratamientos y lograr la sanación*. México DF: Editorial Pax México.
20. Gutiérrez, E. B., & Centro de Humanización de la Salud. (1999). *Manual básico para gerocultores y auxiliares geriátricos*. Madrid: Cáritas
21. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana (2009). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana: Vicaria* [En línea]. México: Universidad Autónoma de México. Fecha de consulta: 9 de abril de 2016. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7793>
22. Restrepo, F. M. Quintero, A. P. R. Fraume, R. N. & otros (2005). *El milagro de las plantas: aplicaciones medicinales y orofaríngeas. Manual*. Colombia: Fundación hogares juveniles campesinos. Fecha de consulta 18 de septiembre de 2015. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=ss3tcgKqh_UC&pg=PT80&dq

- =vinca+de+madagascar&hl=es&sa=X&ved=0CEAQ6AEwBzgUahUKEwicyl-n-IrIAhVHziAKHSapA7g#v=onepage&q=vinca%20de%20madagascar&f=false
23. Guillot, O. D. (2009). *Catharanthus roseus*. *Flora ornamental Española: aspectos históricos y principales especies*. No 8. Pág. 73-74. Fecha de consulta: 8 de septiembre de 2015. URL: http://www.floramontiberica.org/Bouteloua/Monografia_Bouteloua_08.htm
 24. Diego, P. N., Fonseca, R. M., & Universidad Nacional Autónoma de México. (2004). *Apocynaceae*. México: UNAM, Facultad de Ciencias.
 25. Alvarado-Cárdenas, L. O., & Universidad Nacional Autónoma de México. (2003). *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 38. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
 26. Schmelzer, G. H., Gurib-Fakim, A., Arroo, R., Lemmens, R. H. M. J., & AGROOH. (2008). *Medicinal plants 1*. Wageningen: PROTA Foundation.
 27. Raviña, R. E. (2008). *Medicamentos: Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
 28. Diego, P. N., Fonseca, R. M., & Universidad Nacional Autónoma de México. (2004). *Apocynaceae*. México: UNAM, Facultad de Ciencias.
 29. Schmelzer, G. H., Gurib-Fakim, A., Arroo, R., Lemmens, R. H. M. J., & AGROOH. (2008). *Medicinal plants 1*. Wageningen: PROTA Foundation.
 30. Celorio, A. (1986). *Fundamentos de oncología ginecológica*. Madrid: Diaz de Santos.
 31. Weininger, S. J., & Stermitz, F. R. (1988). *Química orgánica*. Barcelona: Reverté.
 32. Goodman, LS, y A. Gilman. (eds.) *La base farmacológicas de la terapéutica*. 5ª Ed. New York: Macmillan Publishing
 33. Pubchem: (2015). Sulfato de Vincristina. Química de base de datos. Fecha de consulta: 18 de marzo de 2015. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
 34. Pubchem: (2015). Sulfato de Vinblastina. Química de base de datos. Fecha de consulta: 18 de marzo de 2015. Disponible en: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
 35. Raviña, R. E. (2008). *Medicamentos: Un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela
 36. Gennaro, A. R., Remington, J. P., & Belluci, S. (2003). *Remington farmacia*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana

37. Mathé, G. (1977). *La quimioterapia y la inmunoterapia del cáncer*. Triangulo. Vol. 16, número 3 y 4.
38. Gómez, F. M. E., & Campos, M. A. (2009). *Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental*. México: Medica Panamericana.
39. Organización Mundial de la Salud. (2015). *Cáncer: datos y cifras sobre el cáncer. Enfermedades no transmisibles: perfiles de países 2014*. Fecha de consulta 09 de septiembre de 2015. URL: www.who.int/cancer/about/facts/es/
40. Secretaria de Salud (SSA): Subsecretaria de prevención y promoción de la salud (2014). *Los 5 tipos de cáncer que más afecta a mexicanos*. Fecha de consulta: 09 de septiembre de 2015. URL: <http://www.spss.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
41. Cruz, K. L. M., Monroy, M. A, Ramírez, M. T.A., Reyna, R. P. & Vargas, M. N. (2015). *Fisiopatología del cáncer*. Educación y salud: Boletín Científico de Ciencia de la Salud del ICSA. Vol. 3, No. 6. Fecha de recuperación: 09 de septiembre de 2015. URL: <http://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icsa/n6/contents.html>
42. Moundi, M. Go, R. Yong Seok Yien, C & Nazre, M. (2013). *Vinca alkaloids. International Journal of Preventive Medicine*. Vol. 4 No. 11. Fecha de recuperación: 09 de septiembre de 2015. URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3883245/>
43. Coy, B. C. A. Parra, J. & Cuca, S. L. E. (2014). *Caracterización química de aceite esenciales e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rtaceae)*. Revista elementos No 4: Bogotá, Colombia
44. Castillo, M. S. A. & Ramírez, G. I. E. (2006). *Ensayo preliminar para la obtención natural a partir de especies vegetales comestibles (Tesis de licenciatura)*. Universidad de El Salvador, Centro América. San Salvador .Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/4989/1/16100351.pdf>
45. Lock, S. U. O. (1997). *Colorantes naturales*. Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial.
46. Osman, M. E. Ahmed, E. M. & Eltohami, M. S. (2013). *Evaluación fitoquímica preliminar y la semilla análisis inmediato de Surib (Sesbanialeptocarpa DC.)*. Sudan Journal of Medical Sciences. Vol. 8. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2015. Disponible en: [http://www.sudjms.net/issues/8-1/html/7\) Preliminary%20phytochemical%20evaluation%20and%20seed%20proximate%20analysis%20of%20Surib%20\(Sesbanialeptocarpa%20DC.\).htm](http://www.sudjms.net/issues/8-1/html/7)Preliminary%20phytochemical%20evaluation%20and%20seed%20proximate%20analysis%20of%20Surib%20(Sesbanialeptocarpa%20DC.).htm)

47. OMS (2015). Pruebas básicas para medicamentos: sustancias farmacéuticas, plantas medicinales y formas farmacéuticas. Portal de información: medicamentos esenciales y productos de salud [versión electrónica]: Ginebra. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh1795s/4.html>
48. Organización Mundial de la Salud (2015). Pruebas básicas para medicamentos: sustancias farmacéuticas, plantas medicinales y formas farmacéuticas. Portal de información: medicamentos esenciales y productos de salud [versión electrónica]: Ginebra. Fecha de consulta: 2 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh1789s/4.html>
49. Mujeeb, Farina. Preeti, Bajpai & Neelam Pathak (2014), Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International. Fecha de consulta: 28 de Mayo del 2015. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/497606>
50. Sabri Fátima, Zohra., Belarbi, Meriem., Sabri, Samira., Alsayadi Muneer, M.S. (2012). Phytochemical Screening and identification of some compounds from Mallow. Scholars Research Library. Fecha de consulta: 28 de Mayo del 2015. URL: <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>
51. Plazas, G. E.A. (2012). Análisis fitoquímicos preliminares y de actividad biológica de cuatro especies nativas de las áreas rurales del distrito capital. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis: Centro de Investigación y Desarrollo científico. Fecha de consulta: 07 de julio del 2015. Disponible en: http://repositorio.jbb.gov.co/handle/001/57/browse?type=title&sort_by=1&order=ASC&rpp=25&etal=5&null=&offset=134
52. Martínez, M. A & colaboradores. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Fecha de consulta: 2 septiembre de 2015. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/manual2008.pdf>.
53. Angulo, C. R. (2006). Lulo: El cultivo: *Solanum quitoense* Lam. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2015. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=_mjUUDHQwfcC&pg=PA62&dq=determinacion+de+humedad+de+plantas+por+estufa&hl=es&sa=X&ved=0CDMQ6AEwBWoVChMIpaLPjoeFyAIVj12SCh3drwLc#v=onepage&q&f=false

54. Bermejo, Z. A Pereira, C. S. Cintra, J. M. L. & Morales, T. G. (2014). Determinación de parámetros químicos-físicos de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia aredarach* (Pursiana). *Revistas Habanera de Ciencia Médica*. Fecha de consulta: 18 de Septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1804/180432616004.pdf>
55. Normas Mexicana (1987). NMX-F-075-1987. Alimentos. Determinación De La Densidad Relativa En Aceites Y Grasas Vegetales o Animales. Foods. Vegetables or Animals Oils and Fats. Specific Gravity Determination. Normas Mexicanas. Dirección General DE NORMAS. Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-075-1987.PDF>
56. Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2003). *Biología: La Vida en la Tierra*. México: Pearson Educación.
57. Campbell, N. A., Reece, J. B., & Cwi, S. (2007). *Biología*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
58. Bailey, P. S., Bailey, C. A., & Escalona, G. H. J. (1998). *Química orgánica: Conceptos y aplicaciones*. México: Prentice Hall.
59. Urroz, C. (1991). *Elementos de anatomía y fisiología animal*. San José, C.R: UNED
60. Valverde, V. T., Meave, C. J. A., Carabias, L., & Cano, S. Z. (2005). *Ecología y medio ambiente*. México: Pearson Educación.
61. Montaner, J. (2007). *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. Barcelona, España: Marge Médica Book.
62. Fernández, C. L. Ma. (2007). *Estudio de la toxina DSP producida por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y su transformaciones en los moluscos. Gestión y mitigación de los episodios tóxicos* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela. España.
63. Carvajal, R. L., Hata, U. Y., Sierra, M. N. & Rueda, N. D. (2009). *Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (Strychnos schultesiana krukoff)*. *Revista colombiana forestal* Vol.12. Fecha de recuperación: 09 de septiembre de 2015. URL: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a11.pdf>
64. Rodríguez, V. J., Vicente, O. V. & Canteras, J. M. (1997). *Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas*

- de melanoma. Sociedad Española de Anatomía Patológica, vol. 30, No 1. Fecha de recuperación 27 de mayo de 2016. URL: <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/3.pdf>
65. Yen, S. S. C., Jaffe, R. B., Barbieri, R. L., & Cohen, M. (2001). *Endocrinología de la reproducción: Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Buenos Aires, Argentina: Media Panamericana.
 66. Miale, J. B. (1985). *Hematología, medicina de laboratorio*. Barcelona: Editorial Reverté.
 67. Clínica, Universidad de Navarra. (2015). *Diccionario médico*. URL: <http://www.cun.es/diccionario-medico>
 68. Castaño, O. M. E. & Zapata, J. J. C. *Principio de virología: cultivo celular*. Fecha de recuperación: 29 de mayo de 2016. URL: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/252/252>
 69. Diccionario de biología. (2004). Madrid: Editorial Complutense.
 70. Montiel, M. (1991). *Introducción a la flora de Costa Rica*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
 71. Castaño, O. M. E & Zapata, J. J. C (2000). *Biogénesis: Cultivo celular*. Fecha de recuperación: 30 de mayo de 2016. URL: <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/252>
 72. Firpo, C. A. N. (2010). *Manual de ortopedia y traumatología*. Buenos Aires, Argentina.
 73. American Brain Tumor Association (2012). *Glioblastomas y astrocitoma maligno*. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2016. URL: <http://www.abta.org/resources/spanish-language-publications/glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf>
 74. Reyes, B. G. A. (2009). *Gliomas del adulto: acercamiento al diagnóstico y tratamiento*. Acta Neuro Colomb Vol. 25 No. 1. Fecha de consulta 30 de Mayo de 2016: URL: http://www.acnweb.org/acta/2009_25_1_34.pdf
 75. American Brain Tumor Association (2014). *Glioma*. Fecha de consulta: 30 de Mayo de 2016. URL: <http://www.abta.org/brain-tumor-information/types-of-tumors/glioma.html>
 76. Morgan, S.J & Darling D.C. (1995). *Cultivo de células animales*. España: Editorial Acribia.

77. Watson, J. D. (2005). *Biología molecular del gen*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
78. Cregan, E. R. C. (2007). *All About Mitosis and Meiosis: Life Science*. Huntington Beach: Teacher Created Materials Pub.
79. Saladin, K. S. (2013). *Anatomía y Fisiología: La Unidad entre Forma y Función*. México: Mc Graw Hill.
80. Quiñones, L., Ampuero, E., & Argandoña, J. (2004). Histocitosis de Células de Langerhans Aguda Diseminada (Enfermedad de Letterer-Siwe): Reporte de un Caso Clínico. *Revista Dental de Chile*, 95 (3), 19-22.
81. Vitrocell Embriolife (2009). *Medio de cultivo: Medio RPMI 1640*. Fecha de recuperación 31 de mayo de 2016. URL: http://www.vitrocell.com.br/esp/vitrocell_esp_bularpmi.html
82. Biblioteca virtual en salud. *Concentración 50 Inhibidora*. Fecha de consulta 02 de junio de 2016. URL: http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decssserver/?IsisScript=.%2Fcgi-bin%2Fdecssserver%2Fdecssserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepag e&interface_language=e&search_language=e&search_exp=IC50

Glosario

Agentes cancerígenos: Son sustancias capaces de producir una alteración celular que incide el proceso de la carcinogénesis. Cualquier agente físico, químico o biológico que es capaz de originar un cáncer en el organismo.

Almorranas: Se conoce como hemorroides, se designa a la inflamación y dilatación de las venas que terminan en el recto y en el ano.

Angiosperma: Del griego *angion*, vaso o contenedor. Está constituido por todas las plantas con flores, las semillas de las angiospermas se desarrollan dentro de cámaras denominadas ovarios, que se originan dentro de las flores y maduran para formar frutos.

Ápice: extremo de un órgano situado en el punto opuesto de donde se origina.

Áster: Es una estructura proteica de la célula formado por filamentos que parten de la centrosfera y forman la envoltura más exterior del centrosoma.

Carcinogénesis: Proceso que se define como la capacidad que adquiere la célula de multiplicarse incontroladamente y de invadir otros órganos.

Células epiteliales: Son asociaciones de células unidas estrechamente unidas entre sí formando láminas, limitan las cavidades internas como las superficies libres del cuerpo.

Centriolo: Estructura de la célula animal compuesta por cilindros de tripletes de microtúbulos distribuidos en un patrón 9+0. Una célula animal tiene habitualmente un par de centriolos que participan en la división celular.

Centrómero: Región centralizada que une a la dos cromátidas hijas.

Centrosoma: Material presente en el citoplasma de todas las células eucariontes, importante durante la división celular; centro de organizador de los microtúbulos

Clona: Grupos de organismo o células que tienen origen en un único individuo, tras la reproducción asexual, y que por tanto, son genéticamente idénticos en su totalidad.

Concentración 50 Inhibidora: Concentración de un compuesto necesaria para reducir *in vitro*, el crecimiento poblacional de organismo, incluidas las células eucariotas, en un 50%. Se utiliza también como patrón de citotoxicidad en las células eucariotas en cultivo.

Corola: Cubierta o verticilo interior de las flores completas, que protege los órganos de la reproducción. Está formada por hojas modificadas, llamadas pétalos, que pueden estar soldados o separados.

Cotiledón: son las hojas primordiales que se encuentran en el germen de la semilla.

Cromatina: Complejo de DNA y proteína que constituye el cromosoma eucariótico. Cuando la célula no se está dividiendo la cromatina existe en forma de una masa de fibras muy delgada y muy larga, que no es visible con el microscopio óptico.

Cromosoma: Estructura en forma de filamento que se encuentra en el núcleo y contiene los genes. Cada cromosoma consiste en una molécula muy larga de DNA con sus proteínas asociadas.

Cultivo celular: Conjuntos de técnicas que permiten el mantenimiento de células, *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, con los nutrientes y condiciones apropiadas.

Diaforético: que induce una abundante sudoración.

Dicotiledóneas: Son plantas cuyos embriones de las semillas presentan dos cotiledones.

Dismenorrea: Es la aparición de dolor uterino asociado con la menstruación.

Displasia: Anomalía en el desarrollo de un tejido, de un órgano o de una parte anatómica del organismo.

Enfermedad de Letterer-Siwe: Es la proliferación de histiocitos en todos los tejidos, especialmente en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Puede haber también infiltración difusa o nodular de células mononucleares grandes y alguna célula gigante multinuclear.

Epitelio estratificado: son epitelios que están constituido por más de una capa de células, las que no están totalmente en contacto con la membrana basal

Epitelio pseudoestratificado: Está constituido por una hilera de células de morfología variable en la que no todas las células alcanzan la superficie libre. Los núcleos se observan a diferentes alturas, dando el aspecto de un epitelio estratificado, suele presentar cilios.

Gimnosperma: Del griego *gymnos*, desnuda y *sperm*, semilla. Se agrupan en conjunto como plantas con “semillas desnudas”, porque sus semillas no están encerradas en cámaras.

Hiperplasia: Aumento en el tamaño de un tejido o de un órgano logrado por el incremento en el número de sus componentes celulares.

Histocitosis: El término es referido a un grupo de patologías del sistema inmune.

Huso mitótico: Ensamblaje de microtúbulos y proteínas asociadas que interviene en los movimientos de los cromosomas durante la mitosis.

Incidencia: Se define como el número de casos nuevos de una enfermedad que se producen durante un periodo específico en una población con riesgo de sufrir la enfermedad.

Línea celular: células que se usan a menudo en estudios de cultivo celular que se sometieron a modificaciones genéticas que les permiten crecer en forma indefinida.

Magnoliophyta: Plantas con flores

Magnoliopsida: Dicotiledóneas

Medio RPMI 1640: Es una mezcla de sales enriquecida con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Morbilidad: Son indicadores que estiman el riesgo de enfermedad, cuantifica su magnitud e impacto, consta de la incidencia y de la prevalencia.

Mortalidad: Se refiere a los sujetos que mueren en un determinado lugar a consecuencia de cualquier patología o por una causa específica, durante un periodo dado. Expresa la magnitud con la que se presenta la muerte en una población en un lapso de tiempo determinado.

Mutágeno: Agente químico o físico que interactúa con el DNA y produce una mutación.

Neurotoxicidad: Conjunto de los efectos secundarios de un tratamiento sobre el sistema nervioso, que puede afectar al cerebro o a la médula espinal (neurotoxicidad central) o a las raíces nerviosas, plexos o nervios (neurotoxicidad periférica).

Óbito: Fallecimiento de una persona.

Oblongo: Hojas más alargadas que anchas

Obovado: Contorno en forma de huevo, pero con la parte más ancha en la zona apical.

Pecíolo: Parte de la hoja que une la lámina con el tallo.

Perene: Planta cuyo ciclo vegetativo se extiende más de dos años. Poseen tallos fértiles, portadores de flores y tallos estériles.

Perestasia: Pérdida transitoria parcial o total de la sensibilidad.

Planta vascular: Planta con tejido vascular. Las plantas vasculares incluyen todas las especies actuales, excepto musgos, hepáticas y antoceros.

Prevalencia Tiene que ver con la existencia de casos (nuevos y viejos) de enfermedad en un determinado momento o en un determinado periodo. Es una proporción de la población que padece la enfermedad en estudio en un momento dado.

Proliferación celular: Aumento del número de células como resultado del crecimiento y la multiplicación celular.

Radiaciones ionizantes: se denomina cuando tiene la energía suficiente para provocar la separación de uno o más electrones de un átomo o de una molécula. Como consecuencia, producen liberación de grandes cantidades de energía capaz de romper los enlaces químicos de la molécula de DNA y de las proteínas.

Sistema anular de esteroides: Los sustituyentes tienen cuatro anillos fusionados, tres anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros que contribuyen a funciones de regulación hormonal.

Spermatophyta: Plantas con semillas.

Tumor de Willms: Tipo de cáncer de riñón que aparece en la infancia, en la que uno o los dos riñones resultan afectados, se asocia con supresiones cromosómicas.

Traqueobionta: Son plantas vasculares.

Tubulina: Proteína de un grupo que se encuentra en concentraciones altas en el citoplasma de las células, elementos fundamentales de los microtúbulos, que participan en la multiplicación y el movimiento de las células.

Viabilidad: Alude a la capacidad de una célula para realizar sus procesos fisiológicos y bioquímicos en lo que respecta a su metabolismo y su capacidad de división.

Anexo 1: Metabolitos secundarios

Son compuestos orgánicos que no están implicados directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta, su distribución con frecuencia es en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas. En la actualidad se conoce que sus funciones están relacionadas con sistemas defensivos o de excreción, en general son responsables del color, olor y sabor de las plantas, incluyendo también sus propiedades medicinales (Castillo y Martínez, 2007).

Según su estructura química, se reconoce tres grupos de metabolitos secundarios:

- 1) Compuestos terpénicos, formados principalmente por la vía del mevalonato.
- 2) Los compuestos nitrogenados, que son los alcaloides y glucósidos cianógenos. Formados por la vía de los aminoácidos
- 3) Los compuestos fenólicos, como los taninos y los flavonoides. La mayoría formados por la vía del sikimato o vía de los acetatos.

Compuestos terpénico y esteroides

Los terpenos son compuestos que resultan de la polimerización de unidades isoprenicas. Los esteroides y los triterpenos proceden de la vía de esculeno del mevalonato

- Sesquiterpenos

Estructuras formadas por la condensación isoprenica, se encuentran formadas por los aceites esenciales y lactonas sesquiterpénicas.

LACTONAS

Son compuestos minoritarios pero muy activos, sus propiedades medicinales son anticoagulantes, antiespasmódico, mucolíticos y muy hipotérmicos. Esta es casi exclusiva en la familia de *Asteráceas*. Ver figura 9.

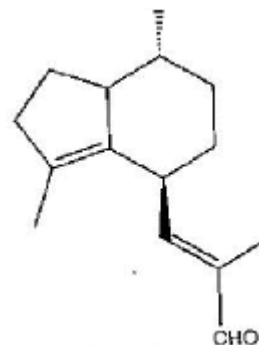


Figura 9: Estructura molecular de la lactona de la familia *Asteráceas*

- Triterpenos

Compuestos biosintetizados por condensación isoprénica.

GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

Son compuestos con una estructura compuesta por un núcleo esteroidal glicosilado (2 desoxiazúcares) y una lactona insaturada de 5 o 6 miembros (Carbajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009). Son capaces de modular el funcionamiento cardiaco y sobre la circulación aurícula – ventricular. Ver figura 10.

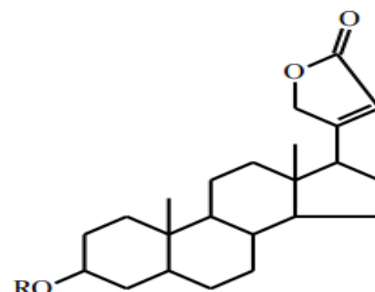


Figura 10: Estructura general de los glucósidos cardiotónicos. R=H es una aglicona; R= Gli es un Glicósido

SAPONINAS

Son heterósidos formadas por una parte glucídica (azúcar) y una parte no glucídica (aglicón) denominada sapogenina, ver figura 11. Se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Se forma espuma debido a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua.

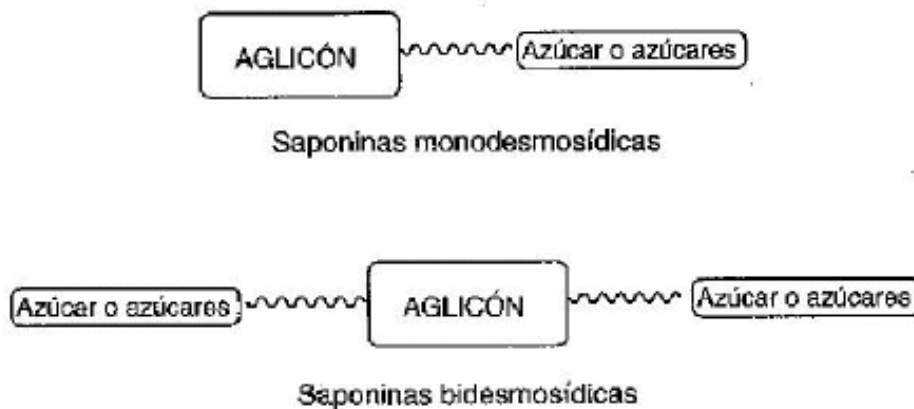


Figura 11: Estructura general de las saponinas.

Compuestos fenólicos

Se caracterizan por presentar un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático. Se pueden clasificar según su complejidad estructural y su origen biosintético.

- 1) Ácidos fenólicos y cetonas polifenólicas
- 2) Los fenilpropanoides constituido por diferentes compuestos como las cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos.
- 3) Xantonas
- 4) Estilbenos
- 5) Quinonas
- 6) Flavonoides que se clasifica en 5 grupos diferentes: antiocianinas (pigmentos), flavonoides menores (flavonas, dihidroflavonoles y dihidrochalconas), flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados.

CUMARINAS

Son los metabolitos $C_6 C_3$ más característicos, son lactonas aromáticas, ver figura 12, se clasifica en 3 grupos:

- a) Hidroxicumarinas: se encuentra en plantas superiores. La más utilizada es el esculetol con actividad venotónica y protector vascular.
- b) Piranocumarinas: aparecen en forma libre en frutos y raíces de dos familias *Umbeliferae* y *Rutaceae*.
- c) Furanocumarinas o cumarinas condensadas con anillo de furano son biológicamente más activas, presentan fototoxicidad y algunas son alergénicas.

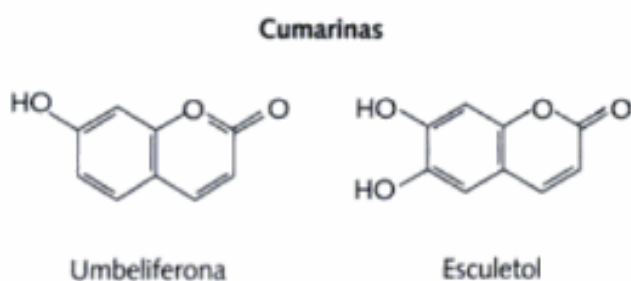


Figura 12: Estructura de las cumarina

QUINONAS

Se han descrito al menos 1200 quinonas diferentes, son compuestos coloreados desde el amarillo al casi negro, aunque la mayoría son amarillas, naranjas o rojas. Se clasifica:

- a) Benzoquinonas (estructura bencénica)
- b) Naftoquinona (estructura naftaleno)
- c) Antraquinona (estructura antracénica): Es el grupo mayoritario y con amplia distribución en plantas.

Algunas son lipofílicas, ya que tienen sustituyentes alquílicos o grupos isoprenoides, mientras que otras están hidroxiladas y presentan propiedades fenólicas. Pueden aparecer en forma libre o combinada con azúcares. Ver figura 13.

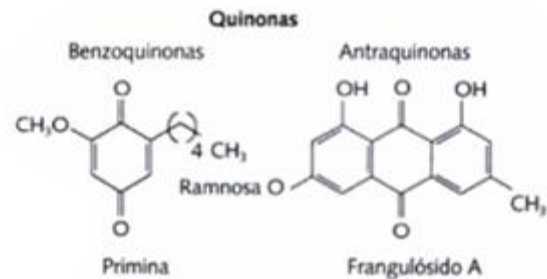


Figura 13: Estructura de las quinonas.

FLAVONOIDES

Son un grupo muy abundante de productos naturales presente en las plantas superiores, se basa en el sistema heterocíclico denominado flavano en diferentes grados de oxidación. Casi siempre hidrosolubles y responsables de la coloración de las flores, frutos y hojas. Ver figura 14.

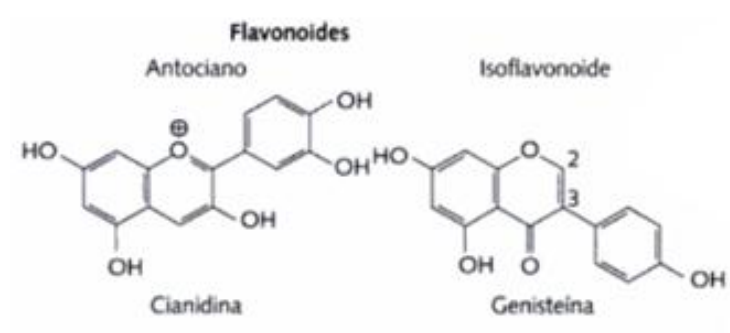


Figura 14: Estructura de los principales flavonoides.

TANINOS

Están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Sus principales características son su capacidad antioxidante, debido a su gran

número de grupos hidroxilos y la capacidad de unirse a proteínas. Ver figura 15. Se dividen en dos grupos:

- Taninos hidrolizables: son ésteres formados por una molécula de azúcar unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos.
- Taninos condensados: son dímeros o polímeros flavánicos con uniones carbono-carbono entre las diferentes unidades de flavan-3-ol. Son resistentes a la hidrolisis.

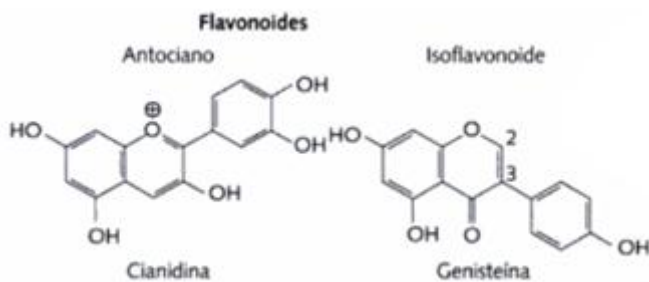


Figura 15: Principales estructuras de los taninos

Compuestos nitrogenados

Dentro de los metabolitos secundarios nitrogenados los más importantes son los alcaloides.

ALCALOIDES

Los alcaloides se encuentran en un 20% en las especies de plantas vasculares [3] de intensa actividad celular, hojas, raíces, semillas, pero hay variaciones en cuanto a su concentración y naturaleza, de acuerdo a factores como madurez, suelo, método de cultivo, variaciones estacionales, etc., estos alcaloides se encuentran distribuidos fundamentalmente en las angiospermas, sobre todo las dicotiledóneas, su estructura química tiene un átomo de nitrógeno formando parte de un anillo heterocíclico. Muchos de los alcaloides son alcalinos, los valores de pH normales de citosol son 7,2 y de la vacuola es de un pH de 5-6, el átomo de nitrógeno es protonado; por lo tanto los alcaloides están cargados positivamente (Taiz, Zeiger *et al*, 2006).

Los alcaloides en su forma base, son compuestos poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, mientras que en forma de sal son hidrosolubles, solubles en alcoholes e insoluble en disolventes muy polares. En la naturaleza se encuentran

combinados con ácidos minerales o preferentemente ácidos orgánicos, dando lugar a los correspondientes citratos, maleatos, benzoatos o tartratos y a compuestos más específicos, como meconatos o aconitatos en ocasiones se combinan también con taninos (Castillo y Martínez, 2007).

Los aminoácidos más representativos para la formación de alcaloides son: Ornitina, lisina (alcaloides alifáticos), triptófano, fenilalanina y tirosina (alcaloides aromáticos). Otros fragmentos que interviene en la biosíntesis de los alcaloides (Marcano y Hasegawa, 2002) agrupados de acuerdo a su precursor primario son:

- a) Ácido acético → policétidos
- b) Ácido mevalónico → unidades de prenilo
- c) Bases purínicas y pirimidínicas
- d) Azúcares

Los alcaloides se dividen en 3 grupos característicos: alcaloides verdaderos, con nitrógeno heterocíclico y siempre procedente de aminoácidos; protoalcaloides que son aminas simples con carácter básico, nitrógenos no heterocíclicos y formados también a partir de aminoácidos, y pseudoalcaloides con propiedades idénticas a los alcaloides verdaderos pero que no proceden de aminoácidos (Castillo *et al*, 2007).

Otra clasificación de los alcaloides son los siguientes:

- a) Alcaloides derivados de la ornitina y la lisina
- b) Alcaloides derivados de la tirosina y la fenilalanina
- c) Alcaloides derivados del triptófano
- d) Alcaloides derivados del ácido nicotínico
- e) Alcaloides derivados de la histidina

En la figura 16 pág. 60, se puede observar las diferentes estructuras químicas de los alcaloides derivados del triptófano y del ácido nicotínico y las estructuras de los alcaloides de interés (vincristina y vinblastina).

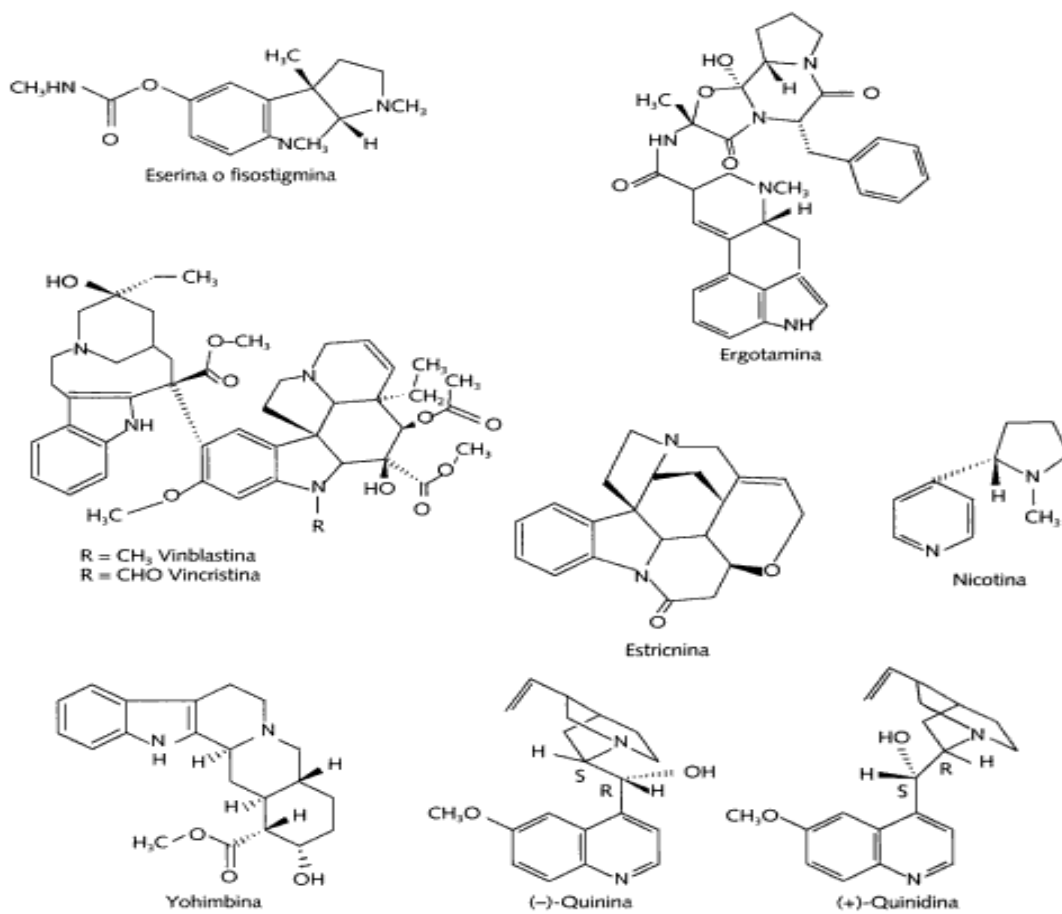


Figura 16: Estructura química de alcaloides derivados del triptófano.

El grupo de alcaloides derivados del triptófano y de su producto de descarboxilación, la triptamina, se caracteriza por presentar un núcleo de tipo indol. Es el grupo más amplio y tiene gran interés farmacológico, terapéutico y químico. En este grupo se distingue los siguientes subgrupos: alcaloides indólicos simples y β -carbolina, alcaloides de eseré, derivados de la egolina, alcaloides indolmonoterpénicos y alcaloides quinoleínicos.

Anexo 2: Biosíntesis de los metabolitos secundarios.

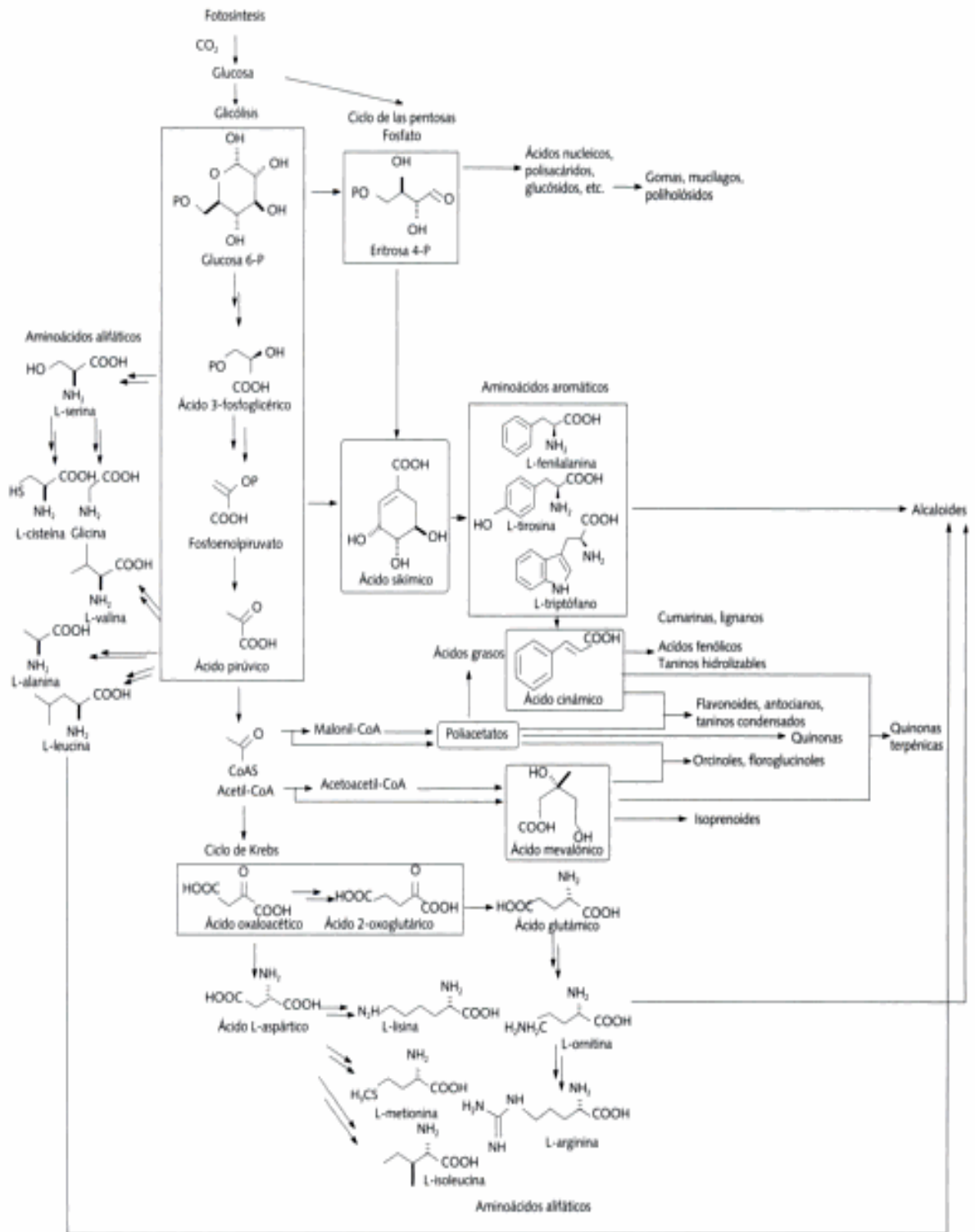


Figura 17: Biosíntesis de los metabolitos secundarios.

Anexo 3: Pruebas fitoquímicas

Evidencia fotográfica

Prueba de alcaloides

a) EXTRACTO ACUOSO



Imagen 1: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 2: Muestra con reactivo de Dragendorff. Presencia de precipitado rojo.



Imagen 3: Muestra con reactivo de Wagner. Presencia de precipitado marrón.



Imagen 4: Muestra con reactivo de Meyer. Presencia de precipitados blanco.

b) EXTRACTO ETANÓLICO

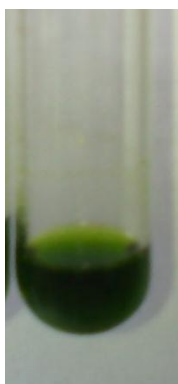


Imagen 5: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*.



Imagen 6: Muestra con reactivo de Dragendorff. Presencia de precipitado rojo.

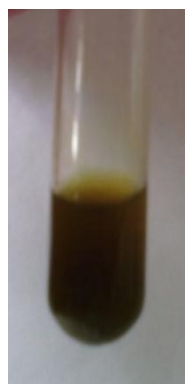


Imagen 7: Muestra con reactivo de Wagner. Presencia de precipitado marrón.



Imagen 8: Muestra con reactivo de Meyer. Presencia de precipitado blanco.

c) EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 9: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*

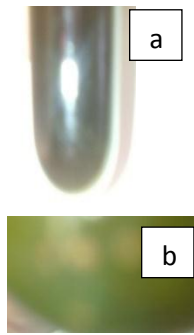


Imagen 10: a) Muestra con el reactivo Dragendorff. b) acercamiento de la imagen (a), se observa puntos de color rojo. Indica poca presencia de alcaloides.

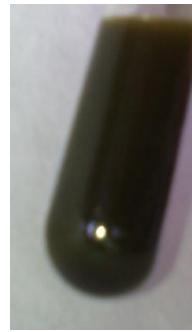


Imagen 11: Muestra con el reactivo de Wagner. En la imagen no se observa claramente por el color oscuro de la muestra, tiene una ligera precipitación de color marrón.



Imagen 12: muestra con reactivo de Meyer. Se observa una ligera presencia de precipitado blanco

Prueba de vincristina

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 13: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 14: Extracto acuoso. Se observa un ligero cambio de coloración rosa. Hay escasa presencia de Vincristina en la planta.

EXTRACTO ETANÓLICO

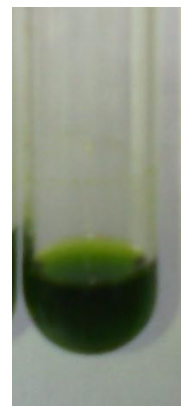


Imagen 15: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*.



Imagen 16: Extracto etanólico. No se observó ningún cambio de coloración. Prueba negativa.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 17: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 18: Extracto metanólico. No hay ningún cambio de color. Prueba negativa para vincristina.

Prueba de Vinblastina

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 19: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*.

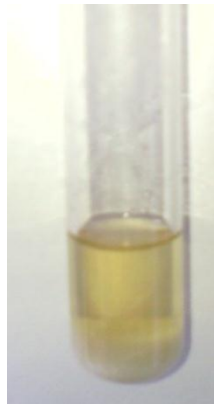


Imagen 20: Extracto acuoso. Presencia de precipitado blanco. Indica presencia de Vinblastina.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 21: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 22: Extracto etanólico. Presencia de precipitados blanco. Prueba positiva a vinblastina

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 23: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 24: Extracto metanólico. Se observa poco precipitado blanco, a comparación del extracto acuoso y etanólico. Prueba positiva a vinblastina

Prueba de tanino

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 25: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 26: Extracto acuoso. Se observa un cambio de coloración de un amarillo tenue a un verde oscuro. Indica presencia de taninos

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 27: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 28: Extracto etanólico. Se observa una coloración más oscura que la imagen, que indica que hay taninos en la muestra.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 29: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*. Se realizó una dilución 1:2 (1mL de extracto y 2 mL agua destilada), por la intensa coloración oscura que presentaba la muestra y no se vería el cambio de color.



Imagen 30: Extracto metanólico. Se observa una coloración más oscura que la imagen 29. Indica que si hay presencia de taninos.

Prueba de flavonoides

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 31: extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 32: Extracto acuoso. Se observa un cambio de coloración de un amarillo tenue a un amarillo fuerte. Indica presencia de flavonoides.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 33: extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 34: Extracto etanólico. En la imagen se observa en la parte inferior del tubo una coloración amarilla. Lo que indica poca presencia de flavonoides.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 35: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*. Se realizó una dilución 1:2 de la muestra. Para observar el cambio de color.



Imagen 36: Extracto metanólico. Se observa una coloración amarillo ámbar. Lo que indica la presencia de flavonoides en la muestra

Prueba de lactonas

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 37: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 38: extracto acuoso. Prueba negativa de lactona.

EXTRACTO ETANÓLICO

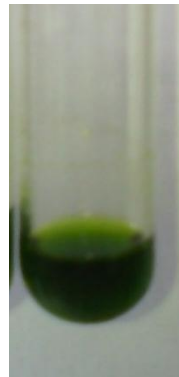


Imagen 39: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 40: Extracto etanólico. Prueba negativa de lactona.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 41: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*.



Imagen 42: Extracto etanólicos. Resultados negativos en la prueba de lactona.

Prueba de glucósidos cardiotónicos

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 43: extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 44: Extracto acuoso. Se observa una ligera coloración azul. Indica presencia de glucósidos cardiotónicos en poca cantidad.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 45: extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 46: Extracto etanólico, se observa una coloración azul intensa, indica prueba positiva a glucósidos cardiotónicos.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 47: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 48: Extracto metanólico. Se observa una coloración azul oscura, que no se puede apreciar en a imagen.

Prueba de cumarinas

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 49: extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 50: Extracto acuoso. Prueba negativa para cumarinas.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 51: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 52: Extracto etanólico. Prueba e cumarinas negativa.

Prueba de esteroides

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 53: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 54: Extracto acuoso. prueba negativa de esteroides

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 55: extracto etanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 56: Extracto etanólico. Prueba negativa de esteroides.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 57: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 58: Extracto metanólico. Prueba negativa de esteroides

Prueba saponinas

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 59: extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 60: Extracto acuoso. Prueba negativa de saponinas.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 61: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*

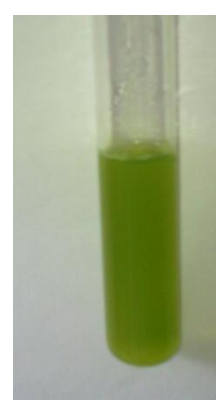


Imagen 62: Extracto etanólico. Prueba negativa de saponina

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 63: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 64: Extracto metanólico. Se observa formación de espuma. Prueba positiva a saponinas.

Prueba de terpenos

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 65: extracto acuoso de *Catharanthus roseus*



Imagen 66: Extracto acuoso. Prueba negativa de terpenos.



Imagen 67: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*

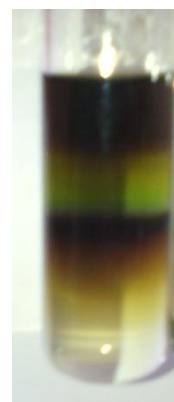


Imagen 68: Extracto etanólico. Prueba negativa para terpenos

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 69: extracto metanólico de *Catharanthus roseus*



Imagen 70: Extracto metanólico. Prueba negativa para terpenos.

Prueba quinonas

EXTRACTO ACUOSO



Imagen 71: Extracto acuoso de *Catharanthus roseus*

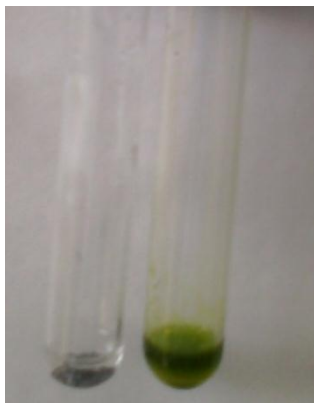


Imagen 72: Extracto acuoso. Prueba negativa de quinonas. De izquierda a derecha. Tubo 1 extracto tratado con zinc, tubo 2 extracto tratado con NaOH al 40 %.

EXTRACTO ETANÓLICO



Imagen 73: Extracto etanólico de *Catharanthus roseus*

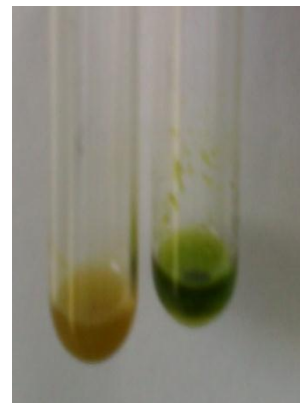


Imagen 74: Extracto etanólico. Prueba negativa de quinonas. De izquierda a derecha. Tubo 1 extracto tratado con zinc, tubo 2 extracto tratado con NaOH al 40 %.

EXTRACTO METANÓLICO



Imagen 75: Extracto metanólico de *Catharanthus roseus*

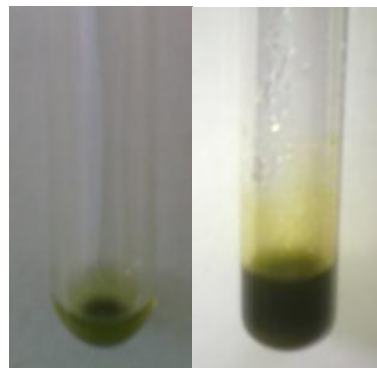


Imagen 76: Extracto metanólico. Prueba negativa para quinonas. De izquierda a derecha. Tubo 1 extracto tratado con zinc, tubo 2 extracto tratado con NaOH al 40 %.

Anexo 4: El ciclo celular

La capacidad de los organismos para perpetuar su propia especie es la característica que mejor distingue a los seres vivos de la materia no viva. Rudolf Virchow lo expresó de la siguiente manera “Donde existe una célula, debe haber existido una célula preexistente” (Watson, 2005)

El ciclo celular mitótico de los eucariontes inicia con un periodo de crecimiento llamado interfase el cual es el tiempo entre las divisiones celulares. Una célula está en la interfase el 90% del tiempo. La mitosis viene después. Esto es cuando la célula se divide. Después, las nuevas células regresan a la interfase.

Las células no pueden solo dividirse por la mitad. Ellas crean copias completas de sí mismas. Las copias incluyen su DNA. Hay que recordar que el DNA da un cianotipo para la construcción de nuevas células. La célula debe ser copiada exactamente. Es la única forma en que cada célula puede sobrevivir y funcionar correctamente. Todo esto es parte de la interfase.

La interfase ocurre en tres fases. La primera fase es la G_1 . En la cual la célula recién formada procesa todos los materiales que necesita para crecer más fuerte (Cregan, 2007), es decir la célula sintetiza proteínas, crece y realiza sus tareas predefinidas para el cuerpo, también acumula los materiales necesarios para replicar su DNA. Luego viene la fase S, esta es la fase de síntesis, en que una célula hace duplicados de sus centriolos y todo su DNA nuclear. La interfase termina con la fase G_2 , la cual es la segunda fase de crecimiento, es un intervalo más o menos corto entre la replicación del DNA y la división celular. En G_2 , la célula termina la replicación de sus centriolos y sintetiza enzimas que regulan la división celular. También revisa la fidelidad de la replicación del DNA y por lo general repara cualquier error que haya detectado. Ahora la célula está lista para dividirse (Saladin, 2013).

La división celular, o también denominada como mitosis es la última fase del ciclo celular a la que también se le conoce como fase M o fase mitótica¹, aquí una célula replica su núcleo y luego se divide en dos para formar dos nuevas células hijas. Esta a su vez ocurre en cinco fases, las cuales son las siguientes: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis, esta última varía según el autor (Saladin, 2013).

En resumen en el ciclo celular eucarionte hay cuatro fases. La duplicación cromosómica se produce durante la fase S y la segregación de los cromosomas, en la fase M. las fases G_1 y G_2 permiten que la célula se prepare para los acontecimientos que siguen en el ciclo celular como se puede ver en la figura 18.

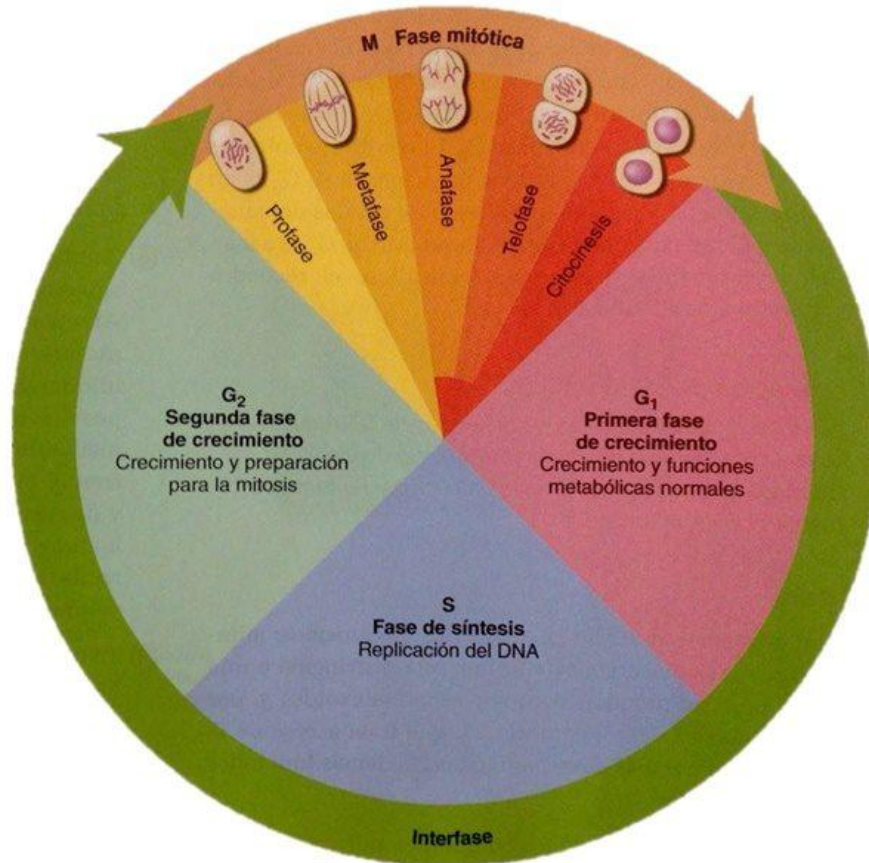


Figura 18: Ciclo celular.

Anexo 5: Mitosis

Como se mencionó anteriormente la mitosis consta a su vez de otras fases.

La profase es la primera fase de la mitosis. Los cromosomas se acortan, engrosan y, en algún momento, se enrollan para formar bastones compactos, cuya distribución a las células hijas resulta más fácil que la larga y delicada cromatina de la interfase. La membrana nuclear de la célula desaparece primero. Hay 46 cromosomas, dos cromátides por cromosoma y una molécula de DNA por cromátide. (Saladin, 2013).

La membrana nuclear se desintegra durante la profase y libera los cromosomas en el citosol. Los centriolos empiezan a producir microtúbulos elongados, a los que se denomina husos, que al crecer separan a los centriolos; al final, un par de centriolos se ubica en partes opuestas de la célula, uno en cada polo. Algunas fibras del huso crecen hacia el cromosoma y se unen al cinetocoro que se halla en cada lado del centrómero. Entonces las fibras del huso mueven los cromosomas de un lado a otro hasta que se alinean alrededor de la parte media de la célula (Saladin, 2013), como se observa en la figura 19 pág. 76.

En la metafase los cromosomas están alineados en el ecuador de la célula, donde oscilan un poco y esperan una señal que estimule a cada uno de ellos a partirse en dos por el centrómero. Los husos ahora forman grupo en forma de limón: el huso mitótico. Los microtúbulos largo van de cada centriolo a los cromosomas, y los cortos forman una estructura en forma de estrella, llamada áster, que ancla el ensamblado en el interior de la membrana plasmática de cada extremo de la célula.

La anafase inicia con la activación de las enzimas que separan a las dos cromátides hermanas en el centrómero. Ahora se considera que cada cromátide es un *cromosoma hijo* separado, de un solo filamento. Un cromosoma hijo migra a cada polo de la célula, con el centrómero por delante y los brazos tras éste. La migración se logra mediante proteínas motoras en el cinetocoro que recorren el huso a medida que la propia fibra es “engullida” y desensamblada en el extremo cromosómico. Las cromátides hijas suelen ser idénticas, y cada célula hija recibe una cromátide de cada cromosoma; por tanto, las células hijas producto de la mitosis suelen ser idénticas.

En la telofase el grupo de cromátides se agrupa en cada lado de la célula. El retículo endoplasmático rugoso produce una nueva membrana nuclear al redor de cada grupo y

las cromátides empiezan a desenrollarse para recuperar su forma de cromatina delgada y dispersa. El huso mitótico se rompe y desaparece, cada nuevo núcleo forma un nucléolo, lo que indica que ha empezado a elaborar RNA y a preparar la síntesis de proteínas.

La citocinesis es considerada por algunos autores como la última fase de la mitosis. La telofase es el final de la división nuclear, pero se superpone con la citocinesis, división del citoplasma en dos células. Los primeros rasgos de la citocinesis son visibles aun en la anafase. Es realizada mediante la atracción de microfilamentos de actina a la red terminal del citoesqueleto por parte de la proteína motora miosina. Esto crea una cresta llamada *surco de división* alrededor del ecuador de la célula, que con el tiempo se divide en dos. La interfase ha empezado ahora para estas nuevas células.

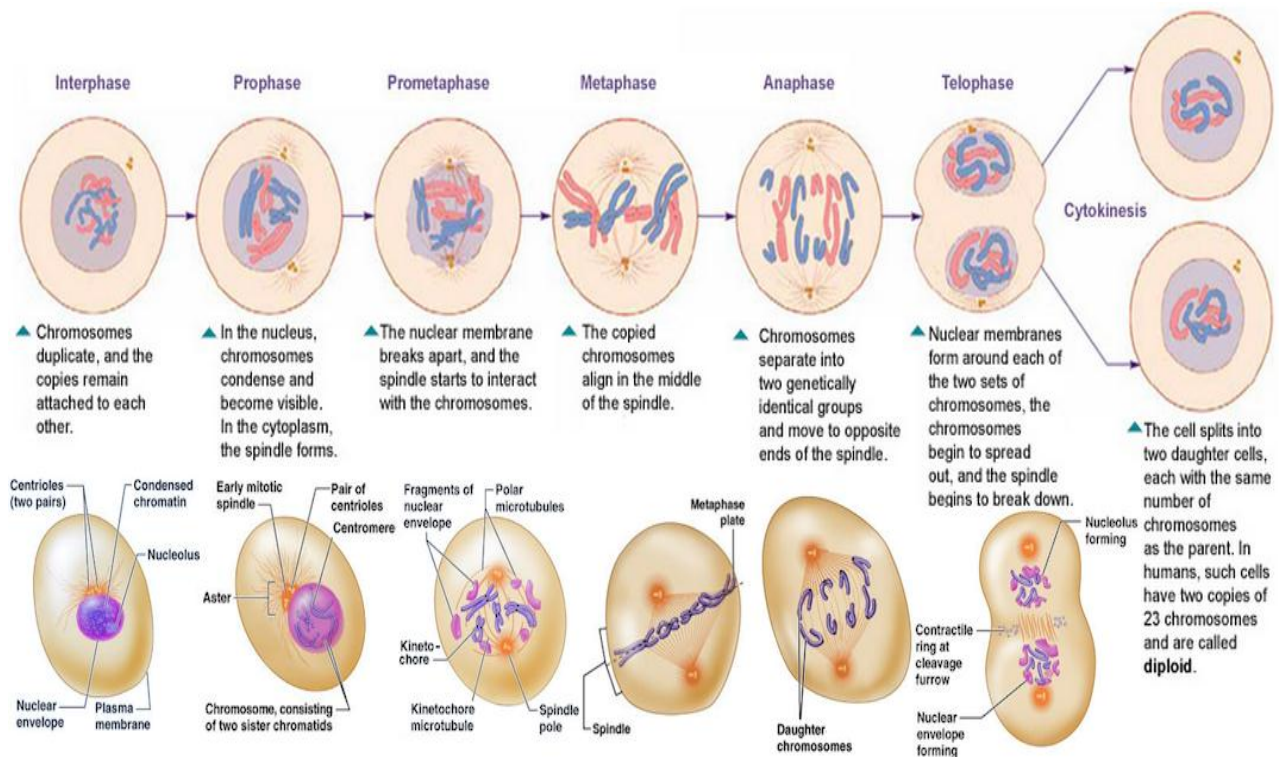


Figura 19: Esquema general de la Mitosis.

Anexo 6: Celulas gliales

Las células más abundantes en el SNC son las neuroglías también conocidas como glías o células gliales, las cuales su número excede unas 10-50 veces el de las neuronas. En general, las células gliales carecen de la propiedad de generar activamente señales eléctricas (Cardinali, 2007).

Las células gliales tienen:

- ❖ Una función de soporte para las neuronas
- ❖ La función de eliminación de productos de desecho del metabolismo neuronal, o de restos celulares luego de la lesión o muerte celular.
- ❖ Las provisión de vaina de mielina
- ❖ Una función de buffer espacial de K^+ .
- ❖ Una función de guía para la migración neuronal durante el desarrollo.
- ❖ Una función de nutrición neuronal
- ❖ Función de captación de neurotransmisores.
- ❖ Una función activa de generación de señales de tipo paracrino.
- ❖ La capacidad de regeneración neuronal.

Estas células se dividen en los siguientes grupos:

- a) **Macroglia:** comprende a los astrocitos, los oligodendrocitos, las células de Schwann y de los endoteliales. Es de origen ectodérmico (Cardinali, 2007).
- b) **Microglia:** que comprende fagocitos, que son parte del sistema inmune. Es de origen mesodérmico (Cardinali, 2007).

Anexo 7: Glioma

“Glioma” es un término general utilizado para describir cualquier tumor cerebral que se origine a partir de las células gliales (American Brain Tumor Association, 2014).

Clasificación de los gliomas

Las neoplasias que afectan el sistema nervioso central se dividen en primarias, cuando su origen celular proviene del tejido cerebral, o secundarias cuando provienen de otros órganos (metástasis). Estas últimas en términos de frecuencia ocupan el primer lugar entre las causas de tumores cerebrales (Reyes, 2009)

Las neoplasias primarias se dividen en varios grupos dependiendo del fenotipo celular y su precursor celular probable. Los tumores de origen glial (gliomas) son los tumores cerebrales primitivos más frecuentes. Su clasificación está basada en criterios morfológicos que determinan el linaje celular, el grado de agresividad y el pronóstico a largo plazo (Reyes, 2009).

El aspecto fenotípico de las células tumorales según su posible origen astrocitario (astroglioma), oligodendrogial (oligodendroglioma), mixto (oligoastrocitoma). El grado de malignidad va desde I a IV y depende de características funcionales como la proliferación celular, la presencia de mitosis o signos de apoptosis, la presencia de neoproliferación vascular y áreas de necrosis (American Brain Tumor Association, 2012).

Estos criterios de malignidad se asocian directamente con el pronóstico y la supervivencia a largo plazo. Las lesiones de grado IV tienen una media de supervivencia a 1 año, las de grado III a 3 años y de grado II entre 5 y 10 años. Los gliomas de grado I son considerados benignos siempre y cuando la escisión quirúrgica completa se considera curativa (Reyes, 2009).

El glioblastoma es el grado más alto de tumor del tipo glioma (grado IV), es la forma más maligna de astrocitoma, y es sinónimo de glioma de grado IV. En general se considera que los tumores de origen oligodendrogial y mixtos tienen mejor pronóstico que aquellos de origen astrocitario (American Brain Tumor Association, 2012).

Los tumores también se pueden agrupar en por su ritmo de crecimiento: grado bajo (crecimiento lento), grado medio (moderado) y grado alto (rápido).

Anexo 8: Cultivo celular

Los cultivos celulares han permitido un gran avance en el estudio de la célula y sus características, además de ser una herramienta fundamental en el estudio de virus, la producción de vacunas, la exploración de la relación patógeno-hospedero nivel celular, es estudio de respuestas inmunitarias, la búsqueda de posibles principios terapéuticos, al igual que el estudio de la bioquímica y la biología molecular (Morgan y Darling, 1995).

El cultivo de tejidos se refiere al mantenimiento o crecimiento, *in vitro*, de células, de tejidos u órganos de origen animal o vegetal. El procedimiento consiste básicamente en liberar las células del tejido original y llevarlas a un ambiente artificial que permita su crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo, de una manera controlada (Morgan y Darling, 1995).

El cultivo de células tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio. Tras la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios más sofisticados, se hizo posible el cultivo de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos tanto del hombre como animales (Castaño y Zapata, 2000).

El cultivo de células es la mejor manera de establecer nuevas líneas celulares en cultivo para estudiar la morfología celular y para comparar el efecto de diferentes agentes, o diferentes concentraciones de un agente sobre el crecimiento y metabolismo (Castaño y Zapata, 2000).

Anexo 9: Ensayo MTT

En los ensayos de viabilidad hay dos parámetros fundamentales: por un lado, la especificidad y la detectabilidad de los reactivos y por otro lado, la capacidad de estos para penetrar en las células.

Fundamento:

El MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) se reduce a formazán a nivel mitocondrial solo cuando las reductasas mitocondriales están activas; dependerá, por lo tanto, directamente del número de células vivas y viables. Posteriormente, el formazán se solubiliza, habitualmente con DMSO (dimethyl sulfoxide) y se obtiene una solución de color azul-violeta que puede leerse por colorimetría con un espectrofotómetro. Los cultivos no tratados servirán de controles frente a los cultivos tratados en los que se podrán determinar la reducción de la viabilidad celular respecto al control, los resultados se expresan habitualmente como porcentaje (Montaner, 2007).

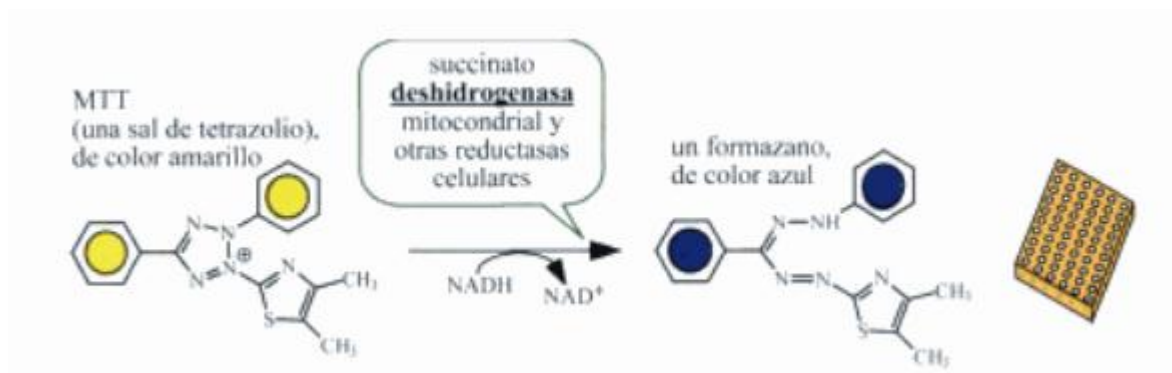


Figura 20: Reacción enzimática del succinato deshidrogenasa mitocondrial en el ensayo MTT.

MEDIO RPMI 1640

Fue desarrollado por Moore y colaboradores en el Roswell Park Memorial Institute en 1996 para el crecimiento de células de leucemia humana en cultivo en monocapa o en suspensión. Es una mezcla de sales enriquecidas con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Acción: actúa como una solución nutritiva en cultivos celular, este medio esta es distribuido deshidratado, en polvo o como líquido. En su composición no tiene timidina, lo que permite obtener la sincronización de la división celular.

Anexo 10: Espectrometría de masas

Es un técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración) de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés, forman parte generalmente de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente de una separación previa, y se someten en primer lugar a una fuente de ionización donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva. Los iones atraviesan el analizador de masas hasta que alcanzan diferentes partes del detector de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Una vez en contacto con el detector, se generan señales que son registradas en el sistema informático y representado en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z .

A continuación se muestran dos espectros de masas realizados por M. en C. Vladimir Carranza en el laboratorio de espectrometría de masas del centro de química ICUAP, no se incluyeron los resultados de los espectros de masas porque no son evidencia de la presencia de los compuestos de interés, las señales que reflejan corresponden al compuesto que se utiliza como matriz y que es nitrobencilalcohol (NBA).

En la figura 21 de la pág. 82 se muestra el espectro de masas del extracto acuoso

En la figura 22 de la pág. 83 se muestra el espectro de masas del extracto etanólico

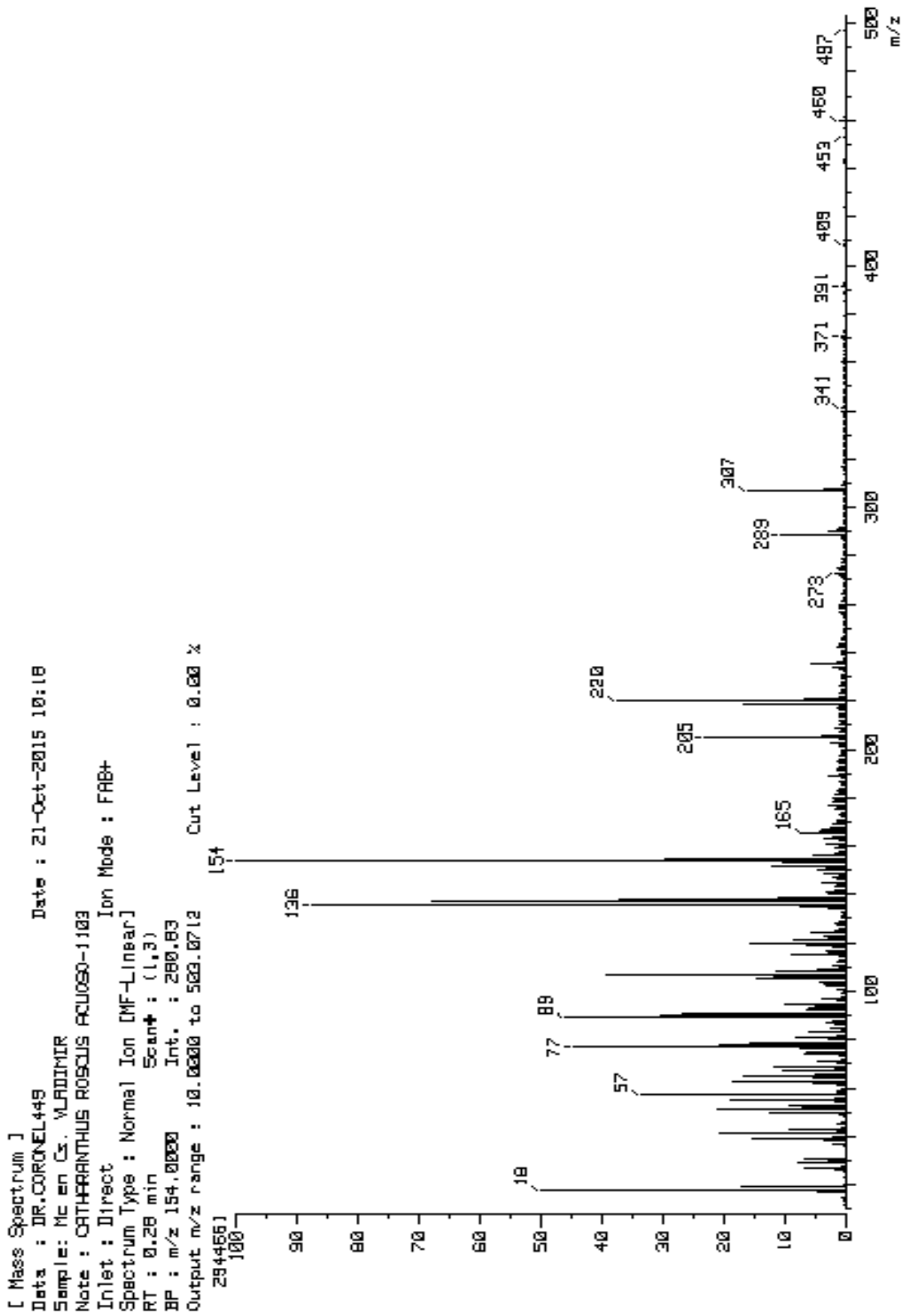


Figura 21: Espectro de masas del extracto acuoso por el método FAB+

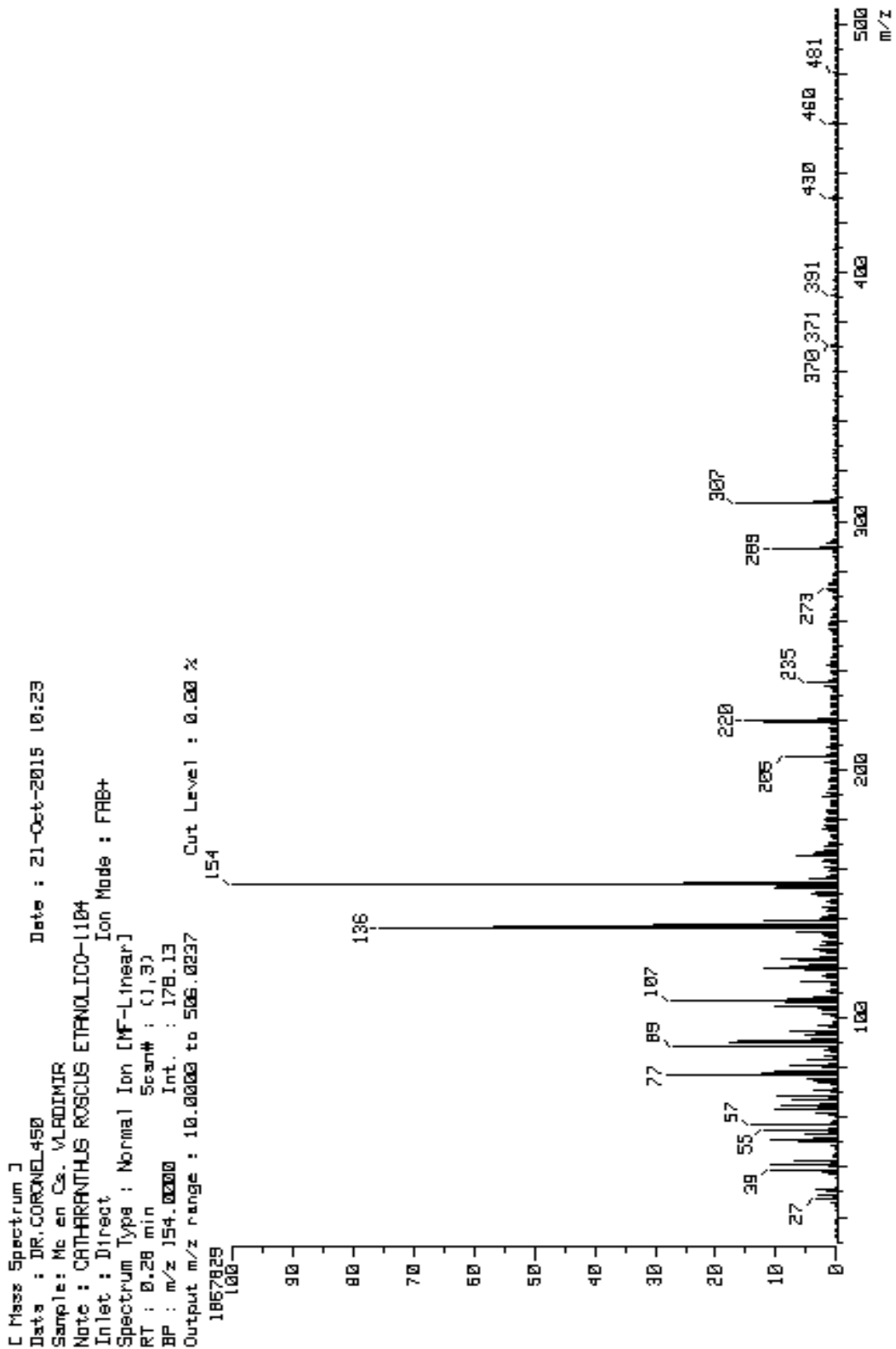


Figura 22: Espectro de masas del extracto etanólico por método de FAB+