



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA HIERBA DEL  
CÁNCER (*Cuphea aequipetala Cav.*), USADA EN  
LA MEDICINA TRADICIONAL**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**QUÍMICO**  
**P R E S E N T A:**  
**GUSTAVO REYES LUGO**

**Asesores:**

**Q. Mario Arturo Morales Delgado**

**Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho E.**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por permitirme llegar a tan importante momento de mi vida alcanzando así una meta más en mi formación profesional.*

*A mis padres y hermanos por su apoyo, amor y confianza que en mí depositaron logrando la culminación de mi carrera por lo cual viviré agradecido.*

*Mis asesores a quienes agradezco fraternalmente el apoyo para la elaboración de esta Tesis.*

*A la Dra. Ana M. Velázquez Sánchez, Dra. Genoveva Hernández Padrón del CFATA, M.C. M. Edith Lopez Villafranco, Q.F.B. Raúl Martínez Malagon, por el apoyo brindado en la elaboración de una parte tan importante de mi trabajo profesional.*

*A cada uno de los catedráticos que me compartieron sus conocimientos para lograr tan anhelado objetivo y a mis amigos con quienes comparto este gran éxito en mi vida.*

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE ESPECTROS</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>12</b>
<b>PARTE I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 2. Justificación</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 3. Objetivos</b>	<b>16</b>
3.1. Objetivo General	
3.2. Objetivos Particulares	
<b>PARTE II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1. La medicina tradicional mexicana (MTM)</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2. La familia <i>Lythraceae</i></b>	<b>20</b>
2.1. Géneros más importantes	<b>20</b>
<b>CAPÍTULO 3. El género <i>Cuphea</i></b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO 4. Hierba del cáncer (<i>Cuphea aequipetala Cav.</i>)</b>	<b>24</b>
4.1. Antecedentes históricos	<b>24</b>

4.2. Sinonimia	24
4.3. Clasificación científica	26
4.4. Nombres comunes en México	26
4.5. Descripción botánica	27
4.6. Distribución	29
4.7. Hábitat	29
4.8. Usos tradicionales	30
4.9. Usos tradicionales en diferentes estados de la República Mexicana	31
4.10. Actividad biológica	32
<b>CAPÍTULO 5.</b> Estudio de compuestos bioactivos utilizando <i>Artemia salina</i> Leach (Brine Shrimp)	<b>34</b>
5.1. <i>Artemia salina</i> Leach	35
5.2. Medio de cultivo	39
<b>PARTE III. METODOLOGÍA</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 1.</b> Recolección y secado	<b>43</b>
1.1. Recolección del material botánico	43
<b>CAPÍTULO 2.</b> Extracción y concentración	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO 3.</b> Análisis fitoquímico preliminar	<b>46</b>
3.1. Alcaloides	46
3.2. Taninos	48
3.3. Saponinas	49
3.4. Triterpenos	50
3.5. Flavonoides	51
3.6. Glicósidos cardiotónicos (prueba de Legal)	52
3.7. Glucósidos cianogenéticos	53

3.8. Azúcares	54
<b>CAPÍTULO 4.</b> Separación	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 5.</b> Obtención e identificación de los alcaloides de la hierba del cáncer	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 6.</b> Actividad biológica	<b>57</b>
6.1. Preparación de las muestras	<b>58</b>
<b>PARTE IV. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 1.</b> Estudio fitoquímico preliminar	<b>62</b>
1.1. Extractos de tallos y hojas	<b>63</b>
1.2. Extractos de flores	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 2.</b> Separación	<b>66</b>
2.1. CCF para los extractos de tallos y hojas	<b>66</b>
2.2. CCF para los extractos de flores	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 3.</b> Separación en columna cromatográfica	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 4.</b> Obtención de alcaloides	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO 5.</b> Caracterización	<b>79</b>
5.1. Sólidos	<b>80</b>
5.2. Líquidos	<b>80</b>
5.3. CCF de los compuestos C <sub>2</sub> y C <sub>6</sub>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO 6.</b> Actividad biológica	<b>82</b>
6.1. Determinación de la LC <sub>50</sub> del extracto etanólico para tallos y hojas	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 7.</b> Espectroscopía	<b>85</b>
7.1. Espectroscopía de los compuestos C <sub>5</sub> , A <sub>1</sub> y C <sub>3</sub>	<b>85</b>
7.1.1. Espectroscopía del compuesto C <sub>5</sub>	<b>85</b>
7.1.2. Espectroscopía del compuesto A <sub>1</sub>	<b>88</b>

7.1.3. Espectroscopía del compuesto C <sub>3</sub>	92
<b>PARTE V. CONCLUSIONES</b>	<b>94</b>
<b>PARTE VI. PROSPECTIVAS</b>	<b>96</b>
<b>PARTE VII. ANEXOS</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>99</b>
Equipos e instrumentos utilizados	
Espectros	
<b>ANEXO II</b>	<b>114</b>
Glosario	
<b>ANEXO III</b>	<b>115</b>
Preparación de Reactivos	
<b>PARTE VIII. REFERENCIAS</b>	<b>117</b>

# ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Página</b>
1. Identificación de alcaloides	47
2. Identificación de taninos	48
3. Identificación de saponinas	49
4. Identificación de triterpenos	50
5. Identificación de flavonoides	51
6. Identificación de glicósidos cardiotónicos	52
7. Identificación de glucósidos cianogénicos	53
8. Identificación de azúcares	54
9. Obtención e identificación de los alcaloides de la hierba del cáncer	56
10. Preparación de los estándares negativos	58
11. Preparación de los estándares positivos	59
12. Preparación del blanco	60
13. Obtención de los alcaloides de la hierba del cáncer a partir de una maceración ácida	74
14. Acondicionamiento de la resina de intercambio iónico fuertemente alcalina	77
15. Obtención del alcaloide(s) de la hierba del cáncer	77



# ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>I.</b> Subfamilias de la familia <i>Lythraceae</i>	<b>21</b>
<b>II.</b> Sinonimia de la hierba del cáncer	<b>25</b>
<b>III.</b> Usos tradicionales de la hierba del cáncer	<b>30</b>
<b>IV.</b> Actividad biológica	<b>32</b>
<b>V.</b> Valores citotóxicos ( $ED_{50}$ ) en $\mu\text{g/ml}$ sobre líneas celulares humanas	<b>33</b>
<b>VI.</b> Clasificación taxonómica de la <i>Artemia salina</i> Leach	<b>36</b>
<b>VII.</b> Preparación de un medio marino artificial	<b>40</b>
<b>VIII.</b> Extractos de tallos y hojas	<b>62</b>
<b>IX.</b> Extractos de flores	<b>62</b>
<b>X.</b> Pruebas fitoquímicas preliminares para los extractos de tallos y hojas	<b>63</b>
<b>XI.</b> Pruebas fitoquímicas preliminares para los extractos de flores	<b>64</b>
<b>XII.</b> CCF para los extractos de tallos y hojas	<b>66</b>
<b>XIII.</b> CCF para los extractos de flores	<b>67</b>
<b>XIV.</b> Rf de las fracciones obtenidas del extracto de hexano	<b>71</b>
<b>XV.</b> Pruebas de alcaloides para los sistemas I y II	<b>73</b>
<b>XVI.</b> CCF de la maceración con $\text{H}_2\text{SO}_4$ al 5.0 %	<b>74</b>
<b>XVII.</b> Análisis de solubilidad y fitoquímico para los precipitados I y II	<b>75</b>
<b>XVIII.</b> CCF de las soluciones acuosas a diferente pH	<b>76</b>
<b>XIX.</b> Pruebas de alcaloides al sólido obtenido en columna de intercambio iónico	<b>78</b>
<b>XX.</b> Rf de los compuestos obtenidos	<b>79</b>
<b>XXI.</b> Caracterización de los sólidos obtenidos	<b>80</b>

<b>XXII.</b>	Caracterización del líquido obtenido	<b>80</b>
<b>XXIII.</b>	CCF para los compuestos C <sub>2</sub> y C <sub>6</sub>	<b>81</b>
<b>XXIV.</b>	Mortalidad de la <i>Artemia salina</i> Leach sub-adulta después de 24 horas de exposición del extracto etanólico de la h. del cáncer	<b>82</b>
<b>XXV.</b>	Espectroscopía de IR del compuesto C <sub>5</sub>	<b>85</b>
<b>XXVI.</b>	Espectrometría de masas del compuesto C <sub>5</sub>	<b>86</b>
<b>XXVII.</b>	Compuesto C <sub>5</sub> y manitol	<b>87</b>
<b>XXVIII.</b>	Espectroscopía de IR del compuesto A <sub>1</sub>	<b>88</b>
<b>XXIX.</b>	Espectroscopía de IR del compuesto C <sub>3</sub>	<b>92</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1. <i>Lagerstroemia indica</i>	<b>20</b>
2. Hierba del cáncer ( <i>Cuphea aequipetala Cav.</i> )	<b>28</b>
3. Distribución de la hierba del cáncer en la República Mexicana	<b>29</b>
4. Accesorios de la <i>A. salina</i> : (A) anténula, (B) antena y (C) las mandíbulas	<b>37</b>
5. Ciclo de vida de la <i>Artemia salina</i>	<b>37</b>
6. <i>Artemia salina</i>	<b>38</b>
7. De derecha a izquierda: Naupli (0.4 cm), <i>Artemia</i> sub-adulta (0.6 cm), <i>Artemia</i> adulta (1.0 cm)	<b>40</b>
8. Equipo soxhlet	<b>45</b>
9. Sistemas de prueba (screening primario)	<b>60</b>
10. Columna cromatográfica del extracto de hexano para tallos y hojas	<b>69</b>
11. CCF del compuesto C <sub>3</sub>	<b>78</b>
12. Estimación de la LC <sub>50</sub> por intersección de las muertes acumuladas y vivos acumulados	<b>83</b>
13. Estimación de la LC <sub>50</sub> y el error estándar	<b>83</b>

# ÍNDICE DE ESPECTROS

	<b>Página</b>
<b>E1.</b> Espectro de IR del compuesto C <sub>5</sub>	<b>100</b>
<b>E2.</b> Espectro de IR del compuesto C <sub>5</sub> (-) y manitol (--)	<b>101</b>
<b>E3.</b> Espectro de Masas del compuesto C <sub>5</sub>	<b>102</b>
<b>E4.</b> Espectro de IR del compuesto A <sub>1</sub>	<b>103</b>
<b>E5.</b> Espectro de IR del compuesto A <sub>1</sub> (-) y de diferentes compuestos (--)	<b>104</b>
<b>E6.</b> Espectro de Masas del compuesto A <sub>1</sub>	<b>105</b>
<b>E7.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto A <sub>1</sub>	<b>106</b>
<b>E8.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto A <sub>1</sub>	<b>107</b>
<b>E9.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C del compuesto A <sub>1</sub>	<b>108</b>
<b>E10.</b> Espectro DEPT del compuesto A <sub>1</sub>	<b>109</b>
<b>E11.</b> Espectro de IR del alcaloide(s)	<b>110</b>
<b>E12.</b> Espectro de Masas del alcaloide(s)	<b>111</b>
<b>E13.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del alcaloide(s)	<b>112</b>
<b>E14.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C del alcaloide(s)	<b>113</b>

## RESUMEN

En este trabajo, se presentan los resultados del estudio fitoquímico de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) usada en la medicina tradicional mexicana (MTM). Así mismo, los compuestos obtenidos, el análisis correspondiente y la metodología seguida durante la investigación.

Al margen de estos resultados, se debe resaltar que además de la importancia que se le ha dado al uso de la MT, el estudio fitoquímico de las plantas medicinales de México contribuye en gran medida con el desarrollo de nuevos medicamentos y al conocimiento de los recursos naturales que en nuestro país han tenido un uso alternativo o complementario para el bienestar de la salud. Es por eso que se decide realizar el estudio fitoquímico de la hierba del cáncer, la cual, desde la época prehispánica, se le ha integrado como una de las plantas de uso tradicional en México. Por lo tanto, este trabajo representa una contribución al estudio fitoquímico de plantas de uso medicinal en nuestro país.

# PARTE I

# INTRODUCCIÓN



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Actualmente no se dispone de los datos necesarios para precisar el valor de la difusión del uso de las plantas o de los principios activos derivados de ellas, en los sistemas de salud de los distintos países del mundo. Algunas estimaciones calculan que en México el 30% de la población recurre a la medicina herbolaria (Scior, 2007). Sin embargo, se estima que quizá un 80% de la población mundial, principalmente de los países en vías de desarrollo, confía en las medicinas tradicionales para solucionar sus principales necesidades de salud, y se puede afirmar que gran parte de las terapias tienen como base el uso de las plantas o de sus principios activos. El descubrimiento de un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal, es el resultado del estudio científico de plantas bien reconocidas y empleadas en la medicina tradicional (Mata Essayag, 2000).

En México, la búsqueda de nuevos principios activos, se encuentra aún en pleno desarrollo, cientos de plantas de reconocido uso popular ameritan ser investigadas. Surge así el interés de estudiar a la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) siendo una de las plantas mexicanas poco estudiadas y que es utilizada en la MTM en diferentes estados de la República Mexicana, reconocida y usada desde la época prehispánica y que en nuestros días se observa y cataloga como una de las plantas con gran interés científico para su análisis.

## CAPÍTULO 2

### JUSTIFICACIÓN

Las necesidades actuales de salud en el mundo y la crisis económica de muchos países como el nuestro hacen indispensable un estudio más profundo de los recursos médicos disponibles. La organización mundial de la salud (OMS) ha promovido la utilización de todos los recursos existentes sin discriminaciones ideológicas, ni políticas, reconsiderando la potencialidad, eficacia y aceptación de las medicinas tradicionales en las culturas populares. Entre ellos se cuenta destacadamente a las plantas medicinales.

(<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/6296-La-medicina-tradicional>).

Tan solo en México se tiene estimado que existen 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales(<http://prodiversitas.bioetica.org/nota5htm>). Es por eso que existe la necesidad de llevar a cabo un estudio fitoquímico para todo aquel recurso de origen natural usado en MT, ya que esto brindará un mayor conocimiento para la investigación de nuevos fármacos o fitofármacos con actividad biológica haciendo factible el estudio de todas aquellas plantas reportadas con algún uso en la MT para aceptar, rechazar o encontrar nuevos usos. Para poder cumplir estos objetivos debemos llevar a cabo una investigación multidisciplinaria: un estudio fitoquímico y toxicológico preliminar de la planta hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) logrando así, una contribución al estudio de plantas medicinales empleadas en la medicina tradicional mexicana (MTM).



# CAPÍTULO 3

## OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

- Elaborar el estudio fitoquímico de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) para contribuir al estudio de plantas medicinales mexicanas de uso tradicional.

### 3.2. Objetivos Particulares

- Realizar la investigación bibliográfica existente sobre la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*) en las fuentes de información disponibles.
- Desarrollar y probar la metodología de los procesos de extracción y separación para la caracterización de tres de los metabolitos presentes en la planta.
- Determinar la concentración letal media crónica (LC<sub>50</sub>) utilizando el crustáceo *Artemia salina* Leach para establecer el criterio de toxicidad que presenten los tallos y hojas de la hierba del cáncer.

# PARTE II

## FUNDAMENTOS

### TEÓRICOS



# CAPÍTULO 1

## **La medicina tradicional mexicana (MTM)**

La MTM indígena, presente en todos los pueblos o grupos etnolingüísticos de México es un sistema de conceptos, creencias, prácticas y recursos materiales y simbólicos “destinado a la atención de diversos padecimientos y procesos desequilibrantes” cuyo origen se remonta a las culturas prehispánicas. Hasta ahora el campo de investigación sobre este tipo de medicina ha sido abordado principalmente por la Antropología, pero cada vez mayor número de disciplinas científicas se incorporan para enriquecer el rescate y la revalorización de este patrimonio cultural. Como recurso para la atención a la salud, la MT continúa beneficiando a los grupos étnicos de nuestro país y a las culturas populares rurales y urbanas.

(<http://www.arqueomex.com/S2N3nMEDindigena74.html>)

Actualmente podemos observar o ser testigos particulares del uso de algún tipo de medicina alternativa o complementaria a la medicina alópata por diferentes factores que involucran su uso directo como son: económicos, religiosos, de salud, etc. Dentro de este tipo de MT encontramos una gran diversidad de áreas enfocadas a mantener la salud humana, como son las “Naturales”: aromaterapia, herbolaria, dieta terapéutica y ortomolecular; de “Diagnóstico”: la iridología, radiónica y la quinesiología; de “Energía”: la cristaloterapia, reiki y la imposición de las manos; así como la de “Sistemas”: el

ayur-veda, medicina china, la homeopatía, entre otras, donde esta última, se imparte en instituciones de nivel superior como es el caso de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía que depende del Instituto Politécnico Nacional (Alcalde, 2002). En 2002 la OMS lanzó una estrategia sobre la MT para facilitar a los países la exploración de las posibilidades de esa medicina para mejorar la salud y el bienestar de la población, reduciendo a la vez al mínimo los riesgos de utilización de remedios de eficacia no demostrada, o de una utilización inadecuada. La finalidad principal de la estrategia es alentar la realización de investigaciones.

(<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/6296-La-medicina-tradicional>)

Cabe destacar que las plantas siempre han sido una fuente común de remedios, tanto tradicionales, como de principios activos puros y en la forma de preparaciones. Aunque es imposible ignorar los beneficios aportados por los medicamentos sintéticos, cada vez se subraya más el interés por los fármacos naturales. Así pues, las sustancias naturales han sido básicas para el desarrollo de la farmacia. Un considerable porcentaje de los medicamentos alópatas que se expenden en las farmacias, contienen en su fórmula algún principio activo de origen enteramente natural; el mayor porcentaje procede de plantas y el resto de animales y minerales. Es importante mencionar que aún cuando no se identifiquen los principios activos de algunas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, las pruebas históricas de su valor, permitirán la elaboración de preparados, dándoles certificación desde un punto de vista científico, referido a los diferentes estudios que se realicen a una determinada especie de planta (Mata Essayag, 2000).

## CAPÍTULO 2

### La familia *Lythraceae*

Es una familia del orden de las *Myrtales*. Su distribución es mundial, las especies de zonas templadas son principalmente herbáceas, a menudo en hábitats encharcados; las especies tropicales son por lo general arbustos o



Fig. 1. *Lagerstroemia indica*

árboles. La familia lleva el nombre del género tipo, *Lythrum* cuyo nombre común es *Salicaria*. Ahora también incluye los granados, anteriormente clasificados en una familia separada, *Punicaceae*.

([http://sura.ots.ac.cr/local/florula3/list\\_family.php?key\\_family=Lythraceae](http://sura.ots.ac.cr/local/florula3/list_family.php?key_family=Lythraceae))

#### 2.1. Géneros más importantes

La familia comprende alrededor de 34 géneros y 600 especies de hierbas principalmente, algunos arbustos y árboles. Dentro de la familia de las *Lythraceas* los géneros más abundantes son los siguientes: *Adenaria*, *Ammania*, *Capuronia*, *Crenea*, *Cuphea*, *Decodon*, *Didiplis*, *Diplusodon*, *Duabanga*,

*Galpinia, Ginoria, Haitia, Heimia, Hionanthera, Koehneria, Lafoensia, Lagerstroemia, Lawsonia, Lourtella, Lythrum, Nesaea, Pehria, Pemphis, Peplis, Physocalymma, Pleurophora, Punica, Rotala, Sonneratia, Tetrataxis, Trapa, Woodfordia.*

(<http://www.elhogarnatural.com/familias/FamiliasL.htm>)

La familia *Lythraceae* incluye 5 subfamilias:

**Tabla I. Subfamilias de la familia *Lythraceae***

Subfamilia	Géneros
Lythroideae Juss. ex Arn. 1832 = 'Lythraceae sensu stricto'	<i>Adenaria, Ammania, Capuronia, Crenea, Cuphea, Decodon, Peplis, Didiplis, Diplusodon, Galpinia, Ginoria, Haitia, Heimia, Pehria, Hionanthera, Koehneria, Lafoensia, Lagerstroemia, Lawsonia, Lourtella, Lythrum, Nesaea, Pemphis, Physocalymma, Pleurophora, Rotala, Tetrataxis, Woodfordia.</i>
Punicoideae (Horan. 1834) S. A. Graham, Thorne & Reveal 1998 = 'Punicaceae'	<i>Punica</i>
Sonneratioideae (Engl. & Gilg 1924) S. A. Graham, Thorne & Reveal 1998	<i>Sonneratia</i>
Duabangoideae (Takht. 1986) S. A. Graham, Thorne & Reveal 1998 = 'Duabangaceae'	<i>Duabanga</i>
Trapoideae Voigt 1845 = 'Trapaceae'	<i>Trapa</i>

## CAPÍTULO 3

### El género *Cuphea*

*Cuphea*: Del griego *kyphos*, quiere decir curvo, aludiendo a la forma curva de la cápsula de la fruta.

Es un género de aproximadamente 570 especies pero limitado a América con 260 especies pertenecientes a la familia de las *Lythraceaes*. Las flores pueden ser simples, dispuestas en racimos axilares o terminales, consistiendo cada una en un tubo floral (cáliz tubular). Esta estructura suele ser estrecha en la base y puede llevar tanto 6 como 2 pétalos aparentes que emergen del tubo floral. Las hojas son lanceoladas u oviformes acuminadas (<http://www.plantamed.com.br/plantaservas/generos/Cuphea.htm>).

Las características de cultivo que comparte la mayoría de *Cupheas* son la propagación fácil y desarrollo rápido ya sea a partir de gajos o de semillas, requerimiento de riego regular, supervivencia a pleno sol o a sombra luminosa, adaptabilidad a una serie de suelos, bajo requerimiento de fertilizantes, resistencia a heladas variable, crecimiento arbustivo libre, floración abundante durante períodos largos y vulnerabilidad a muy pocas plagas y enfermedades, cuando se las cultiva en el exterior.

([http://www.agro.uba.ar/catedras/cul\\_indus/galeria/cuphea.htm](http://www.agro.uba.ar/catedras/cul_indus/galeria/cuphea.htm))

México ha sido una fuente especialmente rica de las especies cultivadas de *Cuphea*, existiendo cerca de 90. Las más conocidas son la *Cuphea ignea* A. DC., de México y Jamaica, llamada comúnmente “cigarrito” o “fosforito”, *Cuphea hyssopifolia*, de México y Guatemala, el “falso brezo”, *Cuphea aequipetala* Cav., “hierba del cáncer”, entre otras más.

([http://www.sfbotanicalgarden.org/cf/pdf/cuphea\\_span.pdf](http://www.sfbotanicalgarden.org/cf/pdf/cuphea_span.pdf) ).

El género es motivo de estudios agronómicos debido a su elaboración de ácidos grasos de 8, 10 y 12 átomos de carbono principalmente que almacenan en sus semillas y que tienen importancia económica para la industria aceitera, por ejemplo, en el caso de la *Cuphea viscosissima* Jacq. la que ha sido genéticamente alterada con el fin de producir ciertos ácidos grasos de cadena media y corta, cuyos estudios han sugerido el aprovechamiento de estos ácidos como un sustituto de diesel (Roath, 1994).

La *Cuphea aequipetala* Cav. ha sido motivo de estudios genéticos y químicos para la producción de ácidos grasos en las semillas de la misma planta. En un estudio realizado se encontraron 7 ácidos grasos, 2 son insaturados (ácido oleico y ácido linoleico) el resto corresponde al tipo saturado como el ácido octanoico (ácido caprílico), ácido decanoico (ácido cáprico), ácido dodecanoico (ác. laúrico), ácido tetradecanoico (ácido mirístico) y ácido hexadecanoico (ácido palmítico) siendo más abundante el ácido mirístico del total de todos los ácidos (A.Graham, 1981).



## CAPÍTULO 4

### Hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*)

#### 4.1. Antecedentes históricos

En el siglo XVI, Francisco Hernández la menciona por primera vez e indica que es de naturaleza fría, seca y astringente, por lo cual cura las quemaduras o las úlceras de la boca. También, se usa para refrescar a los que abrasa una fuerte fiebre con alguna soltura de estomago o de vientre. Posteriormente, en el siglo XX, Alfonso Herrera indica que la hierba no estudiada, no debe usarse. Maximino Martínez la refiere como tónica y vulneraria. Se ha señalado que esta planta es “algo venenosa”, aunque no se dan detalles sobre esta observación. También popularmente se indica que esta planta es “algo tóxica” (Argueta Villamar).

#### 4.2. Sinonimia

En México se conocen con el nombre de hierba del cáncer a 19 diferentes especies de plantas que corresponden a 6 familias y 8 géneros distintos como se puede observar en la tabla II (Martínez, 1979).

**Tabla II. Sinonimia de la hierba del cáncer**

<b>Nombre Científico</b>	<b>Género</b>	<b>Familia</b>
<i>Acalypha adenophora</i> Mull.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha adenostachya</i> Muell Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha alopecuroides</i> Jacq.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha indica</i> (Muell. Arg.) Pax & Hoffm.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha monostachya</i> Cav.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha lindheimerii</i> Muell. & Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha cincta</i> Muell. Arg.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Acalypha phleoides</i> L.	<i>Acalypha</i>	<i>Euforbiáceas</i>
<i>Ayenia pusilla</i> L.	<i>Ayenia</i>	<i>Esterculiáceas</i>
<i>Castilleja communis</i> Benth.	<i>Castilleja</i>	<i>Escrofulariáceas</i>
<i>Castilleja arvensis</i> Cham. & Schlechtendal	<i>Castilleja</i>	<i>Escrofulariáceas</i>
<i>Castilleja tenuifolia</i> Benth.	<i>Castilleja</i>	<i>Escrofulariáceas</i>
<b><i>Cuphea aequipetala</i> Cav.</b>	<b><i>Cuphea</i></b>	<b><i>Lythraceae</i></b>
<i>Cuphea wrightii</i> A. Gray	<i>Cuphea</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Gomphrema globosa</i> L.	<i>Gomphrema</i>	<i>Amarantáceas</i>
<i>Lepechinia Schiedeana</i> (Schl.) Vat.	<i>Lepechinia</i>	<i>Labiadas</i>
<i>Lythrum acinifolium</i> Koehne	<i>Lythrum</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Lythrum alatum</i> Pursh	<i>Lythrum</i>	<i>Lythraceae</i>
<i>Salvia misella</i> Kunth	<i>Salvia</i>	<i>Labiadas</i>

De estas 19 diferentes especies, el estudio fitoquímico realizado se enfoca en la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala* Cav.).

### 4.3. Clasificación científica

<b>Nombre botánico:</b>	<i>Cuphea aequipetala</i> Cav.
<b>Sinonimia científica:</b>	<i>Parsonsia aequipetala</i> (Cav.) Standley, <i>Cuphea scabrida</i> HBK, <i>Cuphea virgata</i> Cav.
<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Orden:</b>	<i>Myrtales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Lythraceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Cuphea</i>
<b>Especie:</b>	<i>Cuphea aequipetala</i> Cav.

### 4.4. Nombres comunes en México

Alfilerillo, atlanchana, cachanchillo, cordón de San Francisco guinda, hierba del ángel, hierba del descáncer, hierba de la calavera, hierba del cáncer, trompetilla, ajam bomol, petalillo, florecita roja, tatalito, siltic, zapotillo, miel de abeja, mirto, mirto morado, moyote, pelatito, rama roja, topo de indias, tripa de tuza, calavera, pantillo, percha del abejorro, petalito, uarhiku (purépecha), nochleb vonon, tzoyleb vonon, tzoyob vonon (maya), violeta (Argueta Villamar).

- **Chiapas:** Tzoy vomon (tzeltal/tzotzil), Liclen jonon, Muk'ta tzoyleb, Sahahuch, Tzayal nich vomol, Tzayal wamal, Yahalnichwamal, Yaxal nich vomol.

- **Estado de México:** Guet-ushí, Postpidiú, We-te-shí (mazahua).
- **Hidalgo:** Apancholoa (náhuatl).
- **Morelos:** Tozancuitlacxolli (náhuatl).
- **San Luis Potosí:** Pegamosca.
- **Veracruz:** Apanchola y Apancholoa.
- **Michoacán:** Alcáncer.
- **Distrito Federal:** Atlanchane.

#### 4.5. Descripción botánica

- **Hábito y forma de vida:** Hierba grande, a veces algo leñosa hacia la base, con pelos rígidos y erectos combinados con otros largos y muy entrecruzados.
- **Tamaño:** Entre 0.40 m a 1.0 m de altura.
- **Tallo:** Casi siempre ramificado, tendido en el suelo pero con las puntas ascendentes o bien erectas, color rojo oscuro o morado, generalmente provisto de diferentes tipos de pelos color violeta o rojizo y con 2 hileras de diminutos pelos blanquecinos a lo largo.
- **Hojas:** Opuestas, sésiles o sobre pecíolos muy cortos, ovadas o angostas, de hasta 3 cm de largo, a veces con pelos erectos.
- **Flores:** Tienen una estructura que se llama hipantio (estructura formada por la fusión del cáliz y las partes inferiores de la flor, como un tubo por debajo de los pétalos) de 13 a 17 mm de largo, a veces más angosto en su parte media, de base redondeada, externamente es verde teñido de

púrpura, con pelos color púrpura algo erectos, 6 pétalos color violeta intenso o rosa púrpura, 2 de ellos de color más oscuro y ligeramente más largos que los demás de 3 a 8 mm de largo.

- **Frutos y semillas:** El fruto es una cápsula. Semillas aproximadamente de 8 a 14, frecuentemente 5, casi globosas, de aproximadamente 2 mm de largo.
- **Raíz:** Generalmente gruesa y leñosa.

(<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lythraceae/cuphea-aequipetala.htm>)



*Fig. 2. Hierba del cáncer (Cuphea aequipetala Cav.)*

## 4.6. Distribución

Se encuentra en los estados de San Luís Potosí, Michoacán, Chiapas, Morelos, Distrito Federal, Veracruz, Estado de México, Hidalgo, Coahuila, Puebla, Durango, Guerrero, Jalisco, Guanajuato, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Tamaulipas y Tlaxcala, inclusive se encuentra en Guatemala y Honduras ([http://www.sfbotanicalgarden.org/cf/pdf/cuphea\\_span.pdf](http://www.sfbotanicalgarden.org/cf/pdf/cuphea_span.pdf) ).



*Fig. 3. Distribución de la hierba del cáncer en la República Mexicana*

## 4.7. Hábitat

Es una planta nativa de México, está asociada a terrenos de cultivo de temporal, bosques tropicales, caducifolios y subcaducifolios, matorrales serófilos, pastizales y bosques espinosos, mesófilos de montaña, de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero. Se encuentra entre los 1900 y 2200 msnm. Se recoge generalmente de julio a noviembre.

([http://www.hipernatural.com/es/plthierba\\_cancer.html](http://www.hipernatural.com/es/plthierba_cancer.html))

## 4.8. Usos tradicionales

Por lo general, se utiliza el cocimiento de toda la planta para aplicar lavados o fomentos en la zona afectada, a veces también se ingiere tres veces al día, para quitar el dolor, ya sea sola o acompañada de otras plantas como la hierba mora y el romero (Argueta Villamar).

**Tabla III. Usos tradicionales de la hierba del cáncer**

<b>PARTE UTILIZADA</b>	<b>USOS TRADICIONALES</b>
Hojas	<ul style="list-style-type: none"><li>-Para los golpes, las hojas se cosen y se aplican fomentos en la parte golpeada.</li><li>-Las hojas y la sábila de monte se usan para lograr el embarazo.</li><li>-En ocasiones las hojas machacadas se aplican como emplasto sobre el área inflamada.</li></ul>
Flores, tallos y hojas	<ul style="list-style-type: none"><li>-La infusión se emplea en afecciones hepáticas y contra tumores cancerosos.</li></ul>
Planta completa	<ul style="list-style-type: none"><li>-Ceremonial y religioso (rituales).</li><li>-La planta hervida con sal o en cataplasma se emplea para curar heridas y tumores.</li><li>-Su cocimiento se usa para lavar heridas, granos e inflamaciones (Tapia, 1988).</li><li>- En afecciones urinarias, estomacales, ardores, afecciones en los ojos, para purificar la sangre y como somnífero.</li><li>-En casos de paperas, dolor de cintura, caída del pelo y como tónico y vulnerario.</li></ul>

#### 4.9. Usos tradicionales en diferentes estados de la República Mexicana

- **Chiapas:** en lavados contra flujos vaginales, inflamaciones de los intestinos y para la disentería (Emes Boronda, 1994).
- **Hidalgo:** a las parturientas después del baño de temascal se les frota la espalda y cadera con las hojas machacadas.
- **Morelos:** para mejorar el apetito, las parteras dan a la embarazada un té digestivo elaborado con la raíz de esta planta junto con estafiate, hierba del ángel y raíces de yolochichitl.
- **Distrito Federal:** la infusión de la parte aérea, por vía oral, se emplea en algunos padecimientos de tipo digestivo como son: diarreas, disentería, dolor, ardor o infecciones del estómago y problemas del hígado, para esto, se toma en ayunas, combinada con ajeno (*Artemisia absinthium L.*), tatalencho (*Gymnosperma glutinosum*) y romero (*Rosmarinus officinalis L.*). También se le atribuye virtud curativa contra el cáncer.
- **Veracruz:** su cocimiento se ocupa para “baños de señoras” y para el cáncer. La hierba del golpe junto con la hierba del cáncer y la hierba mora son utilizadas para el tratamiento de la enfermedad denominada *pocholocas*, caracterizada por el brote de granos por todo el cuerpo de los niños y en ocasiones de los adultos. Con las plantas mencionadas se lava la piel para obtener alivio.
- **Michoacán y Morelos:** como su nombre popular lo indica se le emplea en el tratamiento del cáncer. La infusión de las flores y hojas, supuestamente



reduce el dolor de los tumores cancerosos, se bebe el cocimiento de las ramas o se aplica sobre los tumores externos.

- **Edo. de México:** en Texcoco se utiliza el cocimiento de toda la planta en forma oral para heridas, llagas, salpullido, golpes y el cáncer (Mendoza Castelan, 1999).
- En varios estados del país se le emplea también para tratar otros males que involucran algún proceso inflamatorio e infeccioso, para el lavado o aplicación de cataplasmas en las heridas (ya sean contusas, infectadas o con llagas), golpes, inflamaciones en general (incluyendo las de la piel o del estómago), tumores o padecimientos que se manifiestan en la piel como infecciones, granos, llagas, o en caso de rozadura en los niños. (<http://www.mexicodesconocido.com.mx/notas/3771-Hierba-del-cancer>)

#### 4.10. Actividad biológica.

La actividad biológica que presenta esta planta aún es poco conocida, en estudios realizados con diferentes organismos de prueba el resultado es inactivo (Márquez Alonso, 1999).

Tabla IV. Actividad biológica

Actividad Biológica				
Parte estudiada	Disolvente	Actividad	Organismo de prueba	Resultado
hojas	etanol, éter de petróleo, cloroformo	citotóxica	células KB, KB-VI, línea 338	inactiva

Extractos de hexano, metanol y el obtenido a partir de acetato de etilo se probaron sobre cultivos de tres líneas celulares provenientes de cánceres humanos: KB (carcinoma nasofaríngeo), UISO-SQC1 (células escamosas de

carcinoma de cérvix [cuello uterino]) y HCT-15 COLADCAR (carcinoma de colon), con variante de concentración de los extractos vegetales (1.0, 10.0 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De acuerdo con los resultados obtenidos sólo se apreció ligera actividad citotóxica en el extracto metanólico ( $\text{ED}_{50}=17.4\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sobre la línea celular UISO-SQC1. Los demás extractos no mostraron actividad citotóxica (<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/621/62101504.pdf>). En otro estudio de actividad citotóxica, diferentes fracciones de acetona-agua fueron sujetas a pruebas utilizando líneas celulares como: HEp-2 (carcinoma de laringe humano), HCT-15 (cáncer de colon humano) y DU-145 (carcinoma de próstata humano), utilizando colchicina como control positivo. La actividad citotóxica es selectiva para las tres diferentes líneas celulares empleadas. La más alta actividad fue observada para la línea celular DU-145 (Vega Avila, 2004).

**Tabla V. Valores citotóxicos ( $\text{ED}_{50}$ ) en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre líneas celulares humanas**

Muestra	Hep-2	HCT-15	DU-145
extracto acetona-agua	>50	18.70	8.1
colchicina	<0.006	0.006	0.099

Por otra parte, se ha estudiado el efecto inhibitorio usando extracto de *Cuphea aequipetala Cav.* sobre la producción de verotoxina de *Escherichia coli* Enterohemorrágica O157: H7 (ECEH). Debido a innumerables casos relacionados con ECEH, se realizaron extracciones de 22 diferentes especies de plantas, incluida la *Cuphea aequipetala Cav.*, utilizando la parte aérea de ésta con 70 % de metanol acuoso. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), para el efecto inhibitorio sobre la producción de verotoxina, la cual fue de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esto indica que los extractos de las plantas utilizadas muestran actividad antibacteriana aún usando concentraciones más bajas que la MIC (menos de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sakagami, 2001).

## CAPÍTULO 5

### **Estudio de compuestos bioactivos utilizando *Artemia salina* Leach (Brine Shrimp)**

Hay un gran número de pruebas que son muy útiles para la investigación de la actividad biológica, éstas deben de ser rápidas, convenientes, confiables, baratas, sensibles, requieren una pequeña cantidad de material y son capaces de identificar una gama muy amplia de actividades. Estamos refiriéndonos a los ensayos de actividad biológica primarios (screening) como son: Prueba de toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* sus siglas en inglés BSLT (Brine Shrimp Lethality Test), bioensayo de actividad antitumoral (Crown gall tumor), ensayo con estrella de mar, bioensayo de actividad antibiótica, etc. Es importante destacar que los ensayos de actividad biológica primarios de carácter general solo se podrán utilizar como prueba de selección y para realizar estudios biodirigidos con la finalidad de aislar compuestos activos, pero posteriormente será necesario realizar evaluaciones biológicas más complejas y de carácter específico. La prueba es rápida (24h), simple (no se requieren condiciones estériles), fácil de efectuar, barata y usa pequeñas cantidades de muestra (2-20mg o menos). Se ha encontrado que la prueba BSLT es predictiva de una actividad citotóxica o de actividad insecticida. El efecto fisiológico o biológico observado en una de las más simples respuestas biológicas a monitorear como la letalidad, teniendo como criterio la vida o la muerte. Con base en una respuesta

cuantitativa y el tratamiento estadístico que es relativamente simple (M.Colegate, 1993).

En general los compuestos bioactivos son tóxicos a dosis bajas, por lo tanto la toxicidad de extractos vegetales para el organismo antes mencionado, puede ser empleado como una guía para aislar sustancias bioactivas. El método consiste en evaluar extractos, fracciones o compuestos puros en concentraciones de 10, 100 y 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El material objeto de la evaluación se coloca en viales, tubos de ensaye o algún otro tipo de material conteniendo la concentración adecuada de prueba, se le adiciona un volumen determinado de medio salino y 10 larvas del crustáceo. Al cabo de 24 horas se cuentan los organismos sobrevivientes y se determina el porcentaje de mortalidad para cada dosis. Por último se determina la concentración letal media crónica ( $\text{LC}_{50}$ ). **Cuando se obtienen dosis letales medias crónicas menores de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para extractos y fracciones, se consideran activos.** Para compuestos puros dosis letales medias menores de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  indican actividad. La toxicidad para *Artemia salina* se ha correlacionado en múltiples ocasiones con actividades biológicas más complejas, como por ejemplo, citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas, actividad antihelmíntica y actividad antipalúdica, entre otras (Mata Essayag, 2000).

### **5.1. *Artemia salina* Leach.**

Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de vegetales como fuente de principios bioactivos, el estudio de la letalidad que

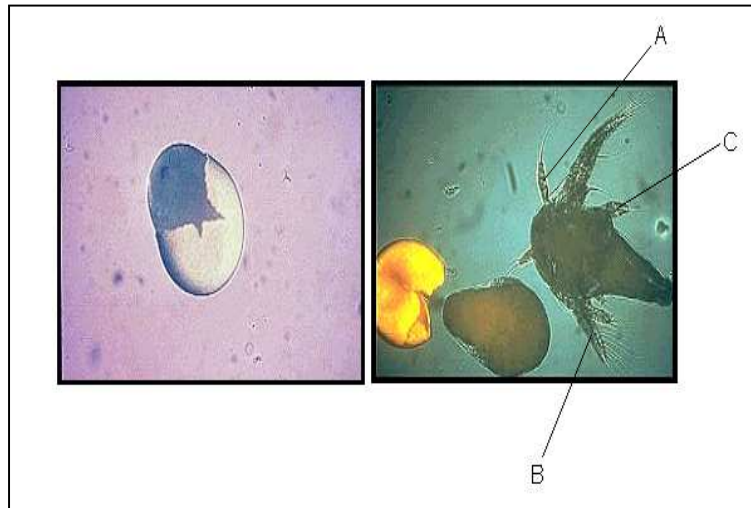
producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil para estos propósitos, especialmente porque se ha encontrado que puede existir una relación entre esta acción sobre la *A. salina* y otras bioactividades como es la citotoxicidad. El primer reporte del uso de la *Artemia salina* (Brine Shrimp) como un organismo de prueba se llevó a cabo en 1956. Desde entonces existen muchos reportes sobre el uso de este animal en estudios ambientales, monitoreando toxinas naturales, y como monitoreo general para sustancias bioactivas en extractos de plantas (M.Colegate, 1993).

**Tabla VI. Clasificación taxonómica de la *Artemia salina* Leach**

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Arthropoda
<b>Subfilo</b>	Crustacea
<b>Clase</b>	Brachiopoda
<b>Orden</b>	Anostraca
<b>Familia</b>	Artemiidae
<b>Género</b>	<i>Artemia</i>
<b>Especie</b>	<i>A. salina</i>

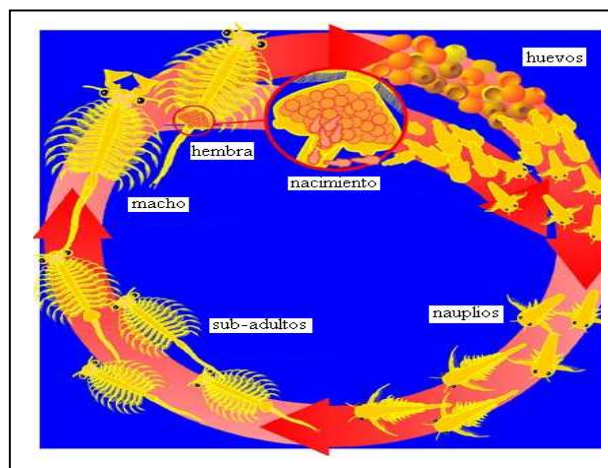
La *Artemia salina* Leach es un crustáceo que se encuentra en cuerpos de agua en todo el mundo desde la salobre a ultra salina. Esta alta tolerancia a los rangos de salinidad (desde 10-20 a 180-220 g/L) hace que sea un animal fácil para su cultivo y estudio. Los huevos de la *A. salina* durante largos períodos se mantienen deshidratados teniendo una alta resistencia a condiciones extremas y pueden ser almacenados por mucho tiempo. Cuando se regresan a las condiciones salinas (por ejemplo, agua de mar), los huevos absorben agua; empieza la embriogénesis, la cual se completa entre 16 a 36 horas después de la inmersión. El embrión emerge desde la cáscara del huevo aún cubierto por una membrana. Sin embargo, en poco tiempo desarrolla las antenas y mandíbulas

(Fig. 4), se libera de la membrana y llega a ser un nauplio activo y que nada libremente. La larva es rojiza y el color se debe a la presencia de la yema de su huevo (http://www.captain.at/artemia-anatomy-taxonomy.php).



*Fig. 4. Accesorios de la A. salina: (A) anténula, (B) antena y (C) las mandíbulas*

En cultivo pueden ser alimentadas con levaduras o algas. Cerca de los 20 a 35 días, el animal alcanza una longitud de 8.5 a 9.5 mm y es sexualmente maduro (Fig. 6). Existen, sin embargo, algunas variaciones en la longitud del cuerpo, resultado de los diferentes niveles de salinidad.



*Fig. 5. Ciclo de vida de la Artemia salina*

Los adultos se alimentan constantemente por medio de sus 11 pares de patas torácicas, arrastrando las partículas de comida hacia la cabeza. De esta manera, en todas las fases de crecimiento de la *A. salina*, la vida activa se indica por el movimiento de algunas de sus patas. Todas las fases en el ciclo de vida de la *A. salina* han sido incluidas en estudios toxicológicos. La fase más usada para el estudio es de 24 a 48 h después de salir del huevo aunque también puede ser con los naupli o los adultos. Como medida de la toxicidad del extracto o compuesto se puede determinar la dosis letal media aguda ( $LD_{50}$ ) después de 6 horas de exposición, así como, la dosis letal media crónica ( $LC_{50}$ ) después de 24 horas de exposición. La  $LD_{50}$  aguda o la  $LC_{50}$  crónica, dependen de la solubilidad del extracto o sustancia. Así, los extractos polares o las sustancias solubles en agua tienen la ventaja de una corta exposición, mientras que para los extractos no polares o insolubles se requiere de más tiempo.



*Fig. 6. Artemia salina*

Las  $LC_{50}$  para compuestos orgánicos utilizados como disolventes se han estimado. Así, para el benceno ( $LC_{50}$  66 ppm) y ácido acético ( $LC_{50}$  42 ppm) son más tóxicos que el etanol o metanol ( $LC_{50}$  10,000 ppm), mientras que el butanol y acetona son relativamente tóxicos (3000 ppm y 2100 ppm respectivamente). Los surfactantes también se pueden utilizar como agentes que ayudan a la solubilidad de los extractos de plantas. Sin embargo, se debe tener cuidado con el uso de este tipo de compuestos ya que pueden llegar a ser tóxicos para la *Artemia salina*. Por ejemplo, el laurilsulfato de sodio ( $LC_{50}$  6.9 ppm),

tween 20 ( $LC_{50}$  1447.9 ppm), finasol ( $LC_{50}$  25.0 ppm). Por tal motivo, se han establecido los siguientes criterios (Sanabria Galindo, 1997):

<b>Tipo</b>	<b>Dosis [ppm]</b>
Letalidad Elevada	0.1 – 100
Letalidad Moderada	100 – 300
Letalidad Baja	300 – 640
Letalidad Mínima	>640

En general, el método consiste en pesar una cantidad del extracto de la planta, mezclas o compuestos puros y se disuelven en una pequeña cantidad (0.2 a 1.0 mL) de metanol o etanol, se diluye con agua de mar obteniéndose la solución stock. De la solución stock se toma la cantidad conveniente y se diluye con el agua salina y da las series de concentraciones requeridas para las pruebas, así, el control negativo es simplemente la misma solución salina usada para preparar la solución stock. El estándar positivo se prepara con sales de metales pesados como tóxico. El más conveniente es el dicromato de potasio. La  $LD_{50}$  para el dicromato está en el rango de 500 a 800 ppm mientras que la  $LC_{50}$  está en el rango 20-40 ppm (M.Colegate, 1993).

## **5.2. Medio de cultivo**

Se sabe que el medio usado influye en la eclosión, pero no afecta el experimento. El medio llega a ser importante si se usan animales poco más de



ser nauplis o adultos, ya que su desarrollo depende de la salinidad. En este caso se utilizaron *Artemias* sub-adultas como se observa a continuación:



**Fig. 7.** De derecha a izquierda: Naupli (0.4 cm), Artemia sub-adulta (0.6 cm), Artemia adulta (1.0 cm)

Dentro de los medios de cultivo están: agua de mar, medio marino artificial o el uso de sal marina. El agua de mar es el medio alternativo, este debe ser esterilizado a ebullición durante 30 minutos y filtrado. El agua perdida se recupera con la adición de agua destilada además debe oxigenarse el medio. Si no se cuenta con el agua de mar, otra opción es utilizar un medio marino artificial que puede ser preparado de acuerdo a la tabla VII. El pH será ajustado de 7 a 8 con una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  al 5%. La ruta de eclosión y la viabilidad de los nauplis en agua de mar son similares cuando se usa agua artificial.

**Tabla VII. Preparación de un medio marino artificial**

Sal	g/L
NaCl	24.0
( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1.5
KBr	0.1
KCl	0.7
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	4.0
$\text{NaHCO}_3$	0.2
( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	11.0

Otra alternativa, la cual se llevó a cabo en esta tesis, es el uso de sal marina. Este medio marino artificial se prepara de acuerdo a lo indicado por el empaque del producto, manteniendo las condiciones adecuadas para el desarrollo y vida de la *A. salina*. Por último, cabe mencionar que los métodos biodirigidos utilizando *A. salina* resultan muy convenientes para el investigador ya que le ahorra el trabajo de aislar un mayor número de constituyentes de la planta que probablemente no tengan actividad biológica. En el caso de los estudios fitoquímicos convencionales o clásicos, se aíslan y caracterizan el mayor número posible de compuestos de las plantas y posteriormente son ensayados biológicamente. Este procedimiento tiene la desventaja de que generalmente se aíslan los componentes que se encuentran en cantidades relativamente altas y que no necesariamente son los responsables de la actividad biológica previamente detectada en las pruebas de selección. Sin embargo, este procedimiento permite conocer los elementos constitutivos de la planta (Mata Essayag, 2000).

# PARTE III

# METODOLOGÍA



# CAPÍTULO 1

## Recolección y secado

Las plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos cuyas características dependen de una serie de factores para su recolección como la época del año, edad de la planta, hora del día, personal utilizado, tipo de recolección (mecánica o manual), entre otros.

Sólo se deben recolectar plantas sanas, limpias y sin insectos. Se recomienda hacerlo los días soleados, ya que en lo posible las hierbas no deben estar húmedas.

Conocer qué plantas medicinales se deben recolectar es tan importante como el cuándo y cómo se debe hacerlo. Es necesario, también, considerar la disponibilidad del recurso puesto que es importante no impactar el ecosistema natural.

### 1.1. Recolección del material botánico

La planta se recolectó en un cerro de pinos, encinos, árboles y arbustos a una altitud aproximada de 2,400 m.s.n.m, coordenadas 19° 56' 26.74'' N y 99°

41' 51.28'' O localizado en Villa de Canalejas perteneciente al Municipio de Jilotepec, Edo. de México en Junio del 2006.

Se herborizó un ejemplar que ha sido integrado en la colección etnobotánica del herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM con el número de registro 1793 IZTA y que identifica a la planta como: nombre científico: *Cuphea aequipetala Cav.* Nombre común: **hierba del cáncer.** Familia: *Lythraceae.*

La planta recolectada se dejó secar al aire libre y en sombra durante dos semanas utilizando únicamente para su estudio fitoquímico la parte aérea: hojas, tallos y flores.

## CAPÍTULO 2

### Extracción y concentración

Se llevó a cabo una extracción continua con disolventes (soxhlet) utilizando un gradiente de polaridad. Los disolventes utilizados fueron hexano, hexano-acetona 1:1, acetona y etanol.



*Fig. 8. Equipo soxhlet*

Una vez obtenidos los extractos, se concentraron mediante destilación a presión reducida en rotavapor para posteriormente dejar evaporar a sequedad a temperatura ambiente. Para el caso de las flores, sólo se obtuvieron los extractos para su análisis fitoquímico preliminar, así como la separación de los diversos compuestos presentes en cada extracto por medio de cromatografía en capa fina (CCF).

# CAPÍTULO 3

## Análisis fitoquímico preliminar

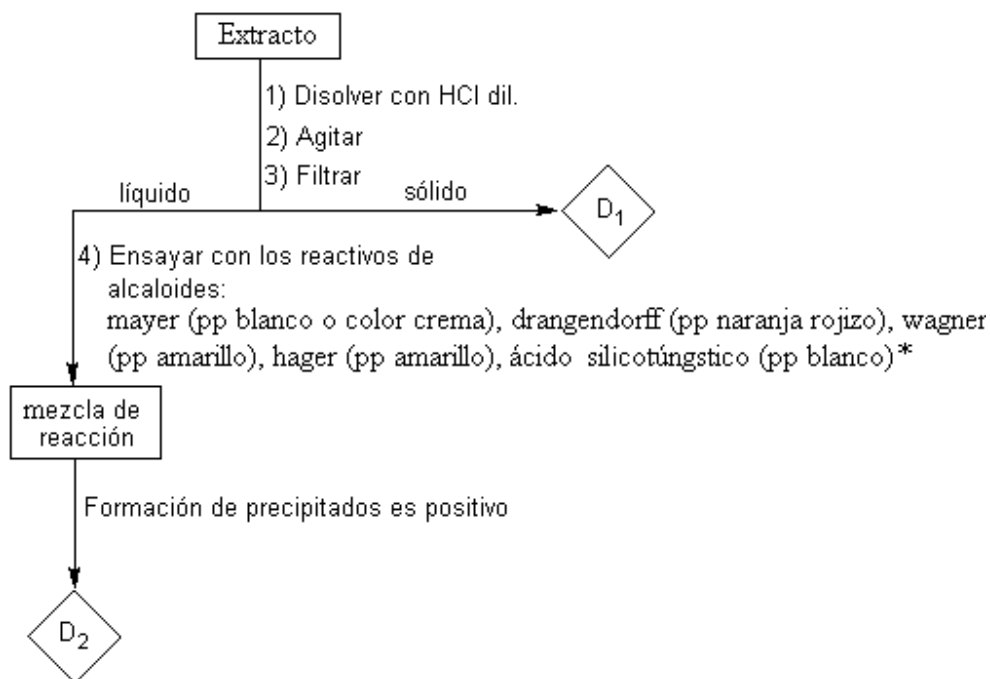
Después de realizar la concentración de los extractos para tallos, hojas y flores, se realiza el análisis fitoquímico preliminar con el fin de identificar los diversos metabolitos presentes en cada extracto.

### 3.1. Alcaloides

Son compuestos orgánicos de origen natural, nitrogenados, derivados generalmente de aminoácidos, más o menos básicos, de distribución restringida con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones de precipitación, desempeñan algunas funciones dentro de la planta como reguladores del crecimiento, fuente de almacenamiento de nitrógeno y como mecanismo de defensa. Realmente no existe una definición sencilla de alcaloides, ya que en ella es difícil tener en cuenta las distintas diferencias en cuanto a estructura y propiedades, para esto, se clasifican de acuerdo a sus propiedades farmacológicas, distribución botánica y aquellos de origen biosintético. Algunos autores los dividen en alcaloides verdaderos, protoalcaloides, pseudoalcaloides y alcaloides imperfectos (<http://www.scribd.com/Alcaloides/d/8972707>).

Existen alcaloides de origen animal, como la adrenalina extraída de las cápsulas suprarrenales, aunque son muy pocos y vegetales como la nicotina o la cafeína (Morales Delgado, 1989).

Para su identificación se lleva a cabo el siguiente procedimiento experimental:



*Esquema 1. Identificación de alcaloides*

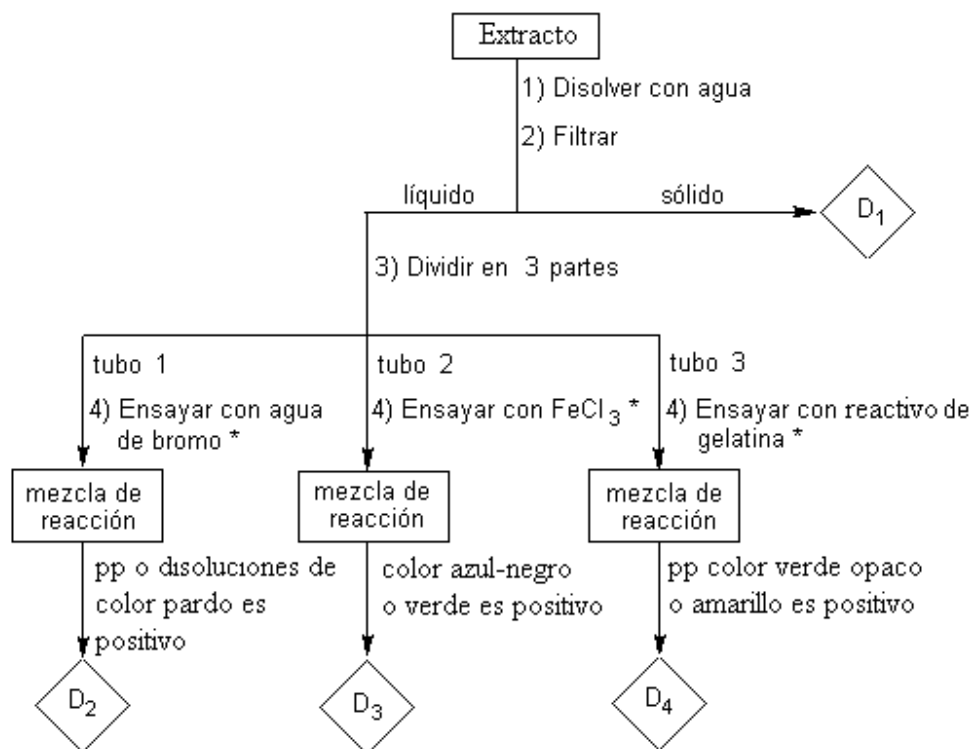
\* ver anexo III

**NOTA:** la cantidad de extracto utilizado para cada prueba puede ser de solo unos cuantos mg (Barba Chávez, 1997).



### 3.2. Taninos

Son compuestos fenólicos hidrosolubles que tienen un peso molecular comprendido entre 500 y 3000, que presentan, junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas, se clasifican en taninos condensados e hidrolizables, que difieren por su estructura y por su origen biosintético. Históricamente, la importancia de los taninos está ligada a sus propiedades curtientes, es decir, a la propiedad que tienen de transformar la piel fresca en un material imputrescible: el cuero (Bruneton, 1991). A continuación se muestra el tratamiento del extracto para la identificación de estos compuestos:



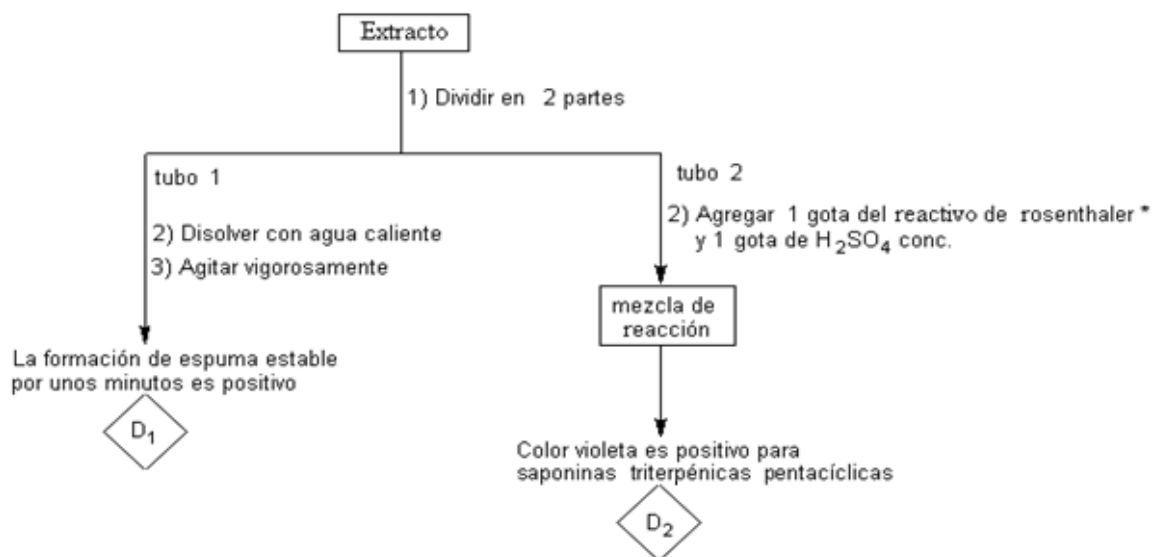
Esquema 2. Identificación de taninos

\* ver anexo III

### 3.3. Saponinas

Las saponinas son heterósidos (azúcar + aglicón) que se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene. Según el número de uniones de las unidades glucídicas al aglicón se denominan saponinas monodesmosídicas (el azúcar o azúcares se unen por una única posición al aglicón), saponinas bidesmosídicas (el azúcar o azúcares se unen por dos puntos al aglicón) (Kuklinski, 2000).

Su identificación se lleva a cabo como se muestra a continuación:



*Esquema 3. Identificación de saponinas*

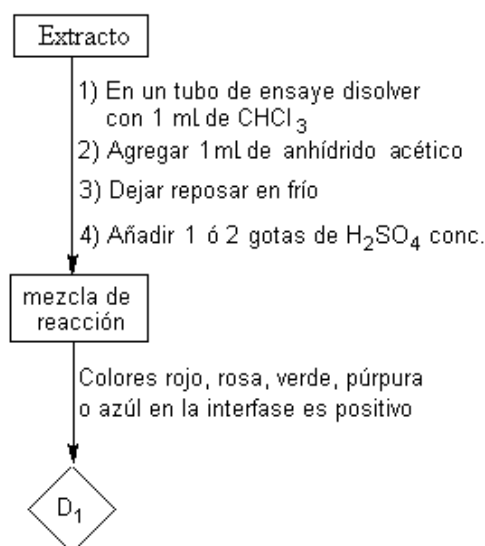
\* ver anexo III

### 3.4. Triterpenos

Compuestos de  $C_{30}$  procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica, normalmente tetra o pentacíclica. Casi siempre hidroxilados al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte. No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y los esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo, tres metilos (Bruneton, 1991).

Los aceites esenciales están constituidos por hidrocarburos saturados de fórmula  $C_{10}H_{16}$  llamados terpenos y sus derivados (alcoholes, ésteres, aldehídos, acetonas, fenoles, éteres fenólicos, óxidos, lactonas y ácidos). Los terpenos son sustancias cuyo esqueleto carbonado se biosintetiza a partir del ácido mevalónico (proviene de la acetil CoA), separándose en unidades llamadas isopreno (Morales Delgado, 1989).

Para su identificación se lleva a cabo lo siguiente:

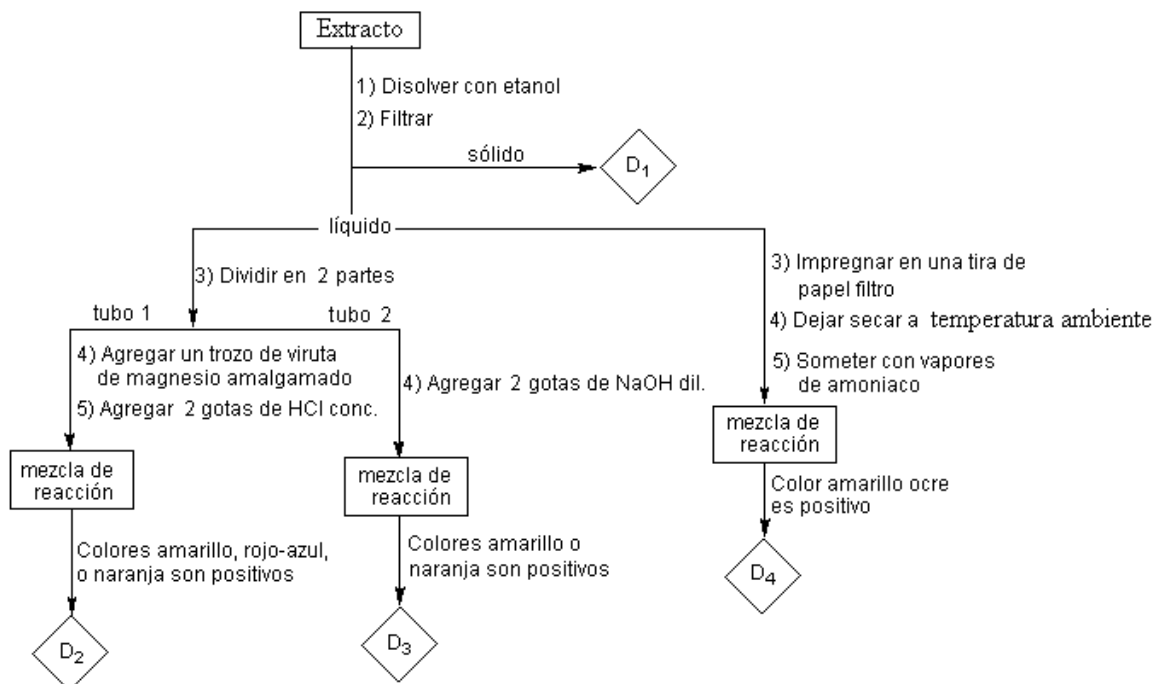


*Esquema 4. Identificación de triterpenos*

### 3.5. Flavonoides

Son compuestos fenólicos los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, generalmente en la forma soluble de heterósidos, en su mayoría son pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos. El elemento común está relacionado con un núcleo básico: el 2-fenil cromano. El término flavonoide se aplica a estructuras muy diversas: 2-fenil cromonas, 2-fenil cromanos, flavilios, chalconas, auronas (Bruneton, 1991).

La identificación de estos compuestos se lleva a cabo como se muestra a continuación:

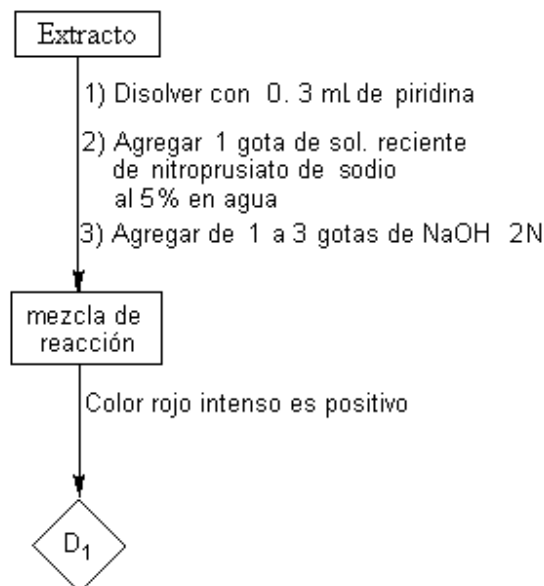


Esquema 5. Identificación de flavonoides

### 3.6. Glicósidos cardiotónicos (prueba de Legal)

Los glicósidos cardiotónicos, cardenolides o venenos del corazón, poseen una estructura que se parece mucho a la estructura de las saponinas esteroidales y presentan las mismas características de solubilidad y formación de espuma, se distinguen por un anillo de lactona insaturada, un grupo hidroxilo 14 y por los azúcares muy especiales que los forman. Se encuentran en varias familias de plantas bastante relacionadas, como las *Apocináceas*, *Liliáceas*, *Moráceas* y *Rununculáceas*. Las plantas que los contienen se han usado desde la prehistoria como venenos de las flechas y para ceremonias religiosas. Su sitio de acción molecular es una membrana relacionada con la enzima ATPasa, que regula el transporte de cationes (Valencia Ortiz, 1995).

Su identificación se lleva de la siguiente manera:

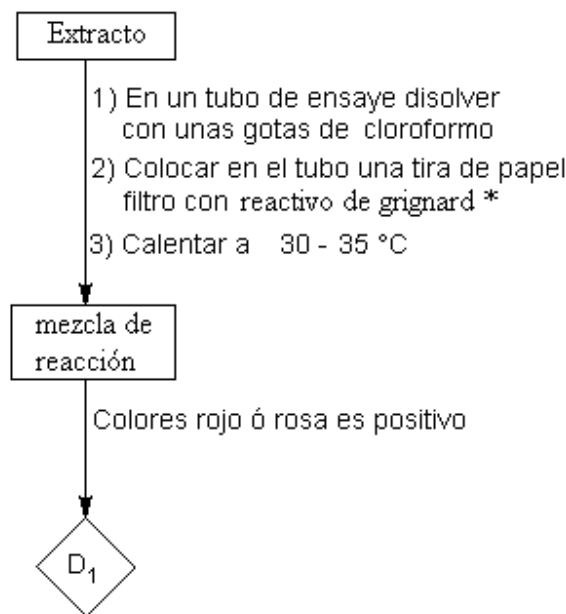


Esquema 6. Identificación de glicósidos cardiotónicos

### 3.7. Glucósidos cianogénicos

Estos glucósidos al hidrolizarse producen ácido cianhídrico, por lo que reciben el nombre común de glicósidos cianogénicos o cianofóricos. Debido a que son tóxicos para el hombre y los animales, son conocidos desde hace mucho tiempo. Se conocen 3 tipos de glucósidos cianogénicos: los parecidos a la amigdalina, glucósidos tipo lanamarina y la gynocardina (Valencia Ortiz, 1995).

Para su identificación se lleva a cabo el siguiente procedimiento:



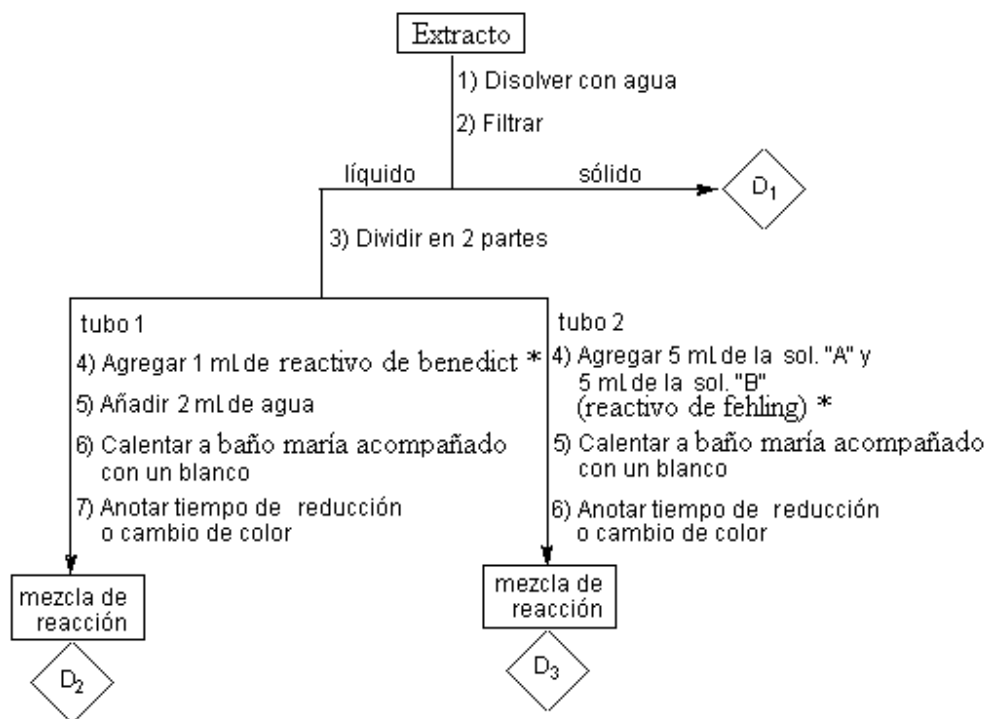
*Esquema 7. Identificación de glucósidos cianogénicos*

\* ver anexo III

### 3.8. Azúcares

Los carbohidratos también llamados azúcares, constituyen la clase de compuestos que se encuentran en las plantas en mayor cantidad. Son aldehídos o acetonas polihidroxilados, generalmente tienen las propiedades de ser alifáticos, ópticamente activos, de sabor dulce, muy solubles en agua, difíciles de cristalizar aún cuando estén puros, son lábiles y se isomerizan fácilmente (Valencia Ortiz, 1995).

Su identificación se lleva de la siguiente manera:



Esquema 8. Identificación de azúcares

\* ver anexo III

# CAPÍTULO 4

## Separación

La separación de los extractos obtenidos se realizó en cromatografía en capa fina (CCF) ó (TLC por su siglas en inglés) para lo que se utilizaron cromatofolios de silica gel F<sub>254</sub> y el uso de una lámpara UVSL 25.

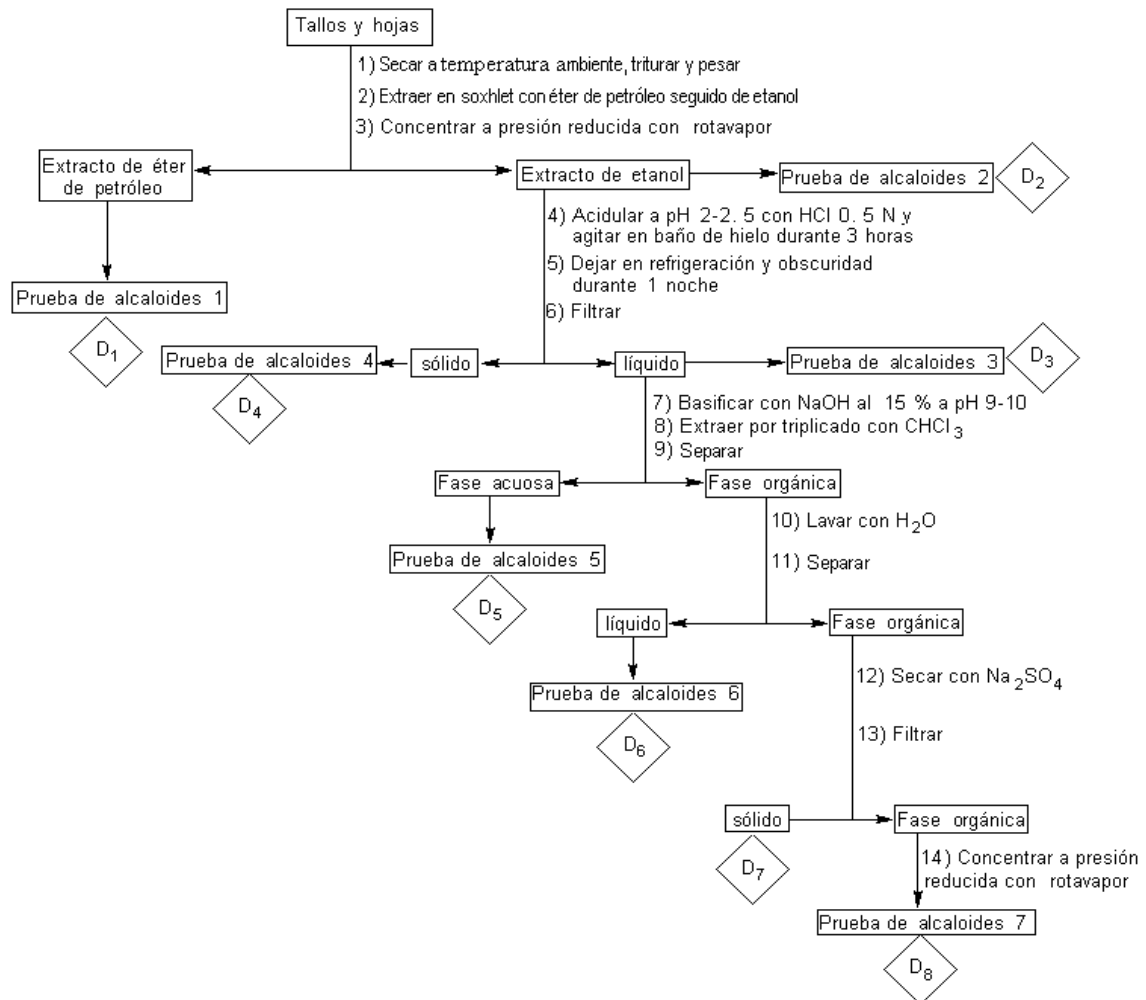
Se utilizó una columna cromatográfica de 25 cm de largo y 2.3 cm de diámetro para la separación del extracto de hexano, como fase estacionaria silica gel con un tamaño de partícula de 0.05-0.2 mm y cloroformo como fase móvil.



# CAPÍTULO 5

## Obtención e identificación de los alcaloides de la hierba del cáncer

Para la obtención e identificación de los alcaloides de la hierba del cáncer se lleva a cabo el siguiente procedimiento experimental:



Esquema 9. Obtención e identificación de los alcaloides de la hierba del cáncer

# CAPÍTULO 6

## Actividad biológica

Para determinar la  $LC_{50}$  crónica del extracto etanólico de la H. del cáncer se hizo uso de un medio marino artificial el cual fue preparado de acuerdo a lo indicado por el empaque del producto con las siguientes características:

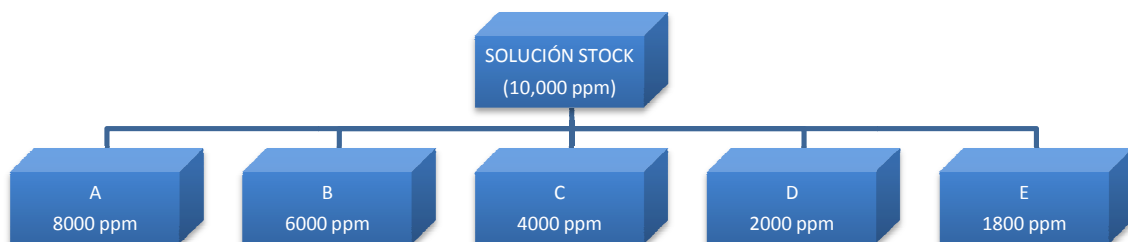
Sal Marina “Oceanic” profesional, libre de fosfatos y nitratos, alto contenido de pureza. Aproximadamente 34 g/L a 25 °C produce:

- Densidad: 1.023 – 1.025
- pH: 8.3 – 8.4
- Ca: 400-420 ppm
- Mg: 1070-1100 ppm

Para su preparación se utilizaron condiciones asépticas. El agua destilada se mantuvo en ebullición durante 30 minutos, todo el material de vidrio requerido para cada uno de los sistemas preparados se colocó durante dos horas en una estufa a una temperatura de 120 °C. La solución salina (34g/L) se oxigenó con una bomba de aire para acuario durante 18 horas manteniendo un pH= 8 y una densidad de 1.025, ésta última determinación se efectuó con un densímetro.

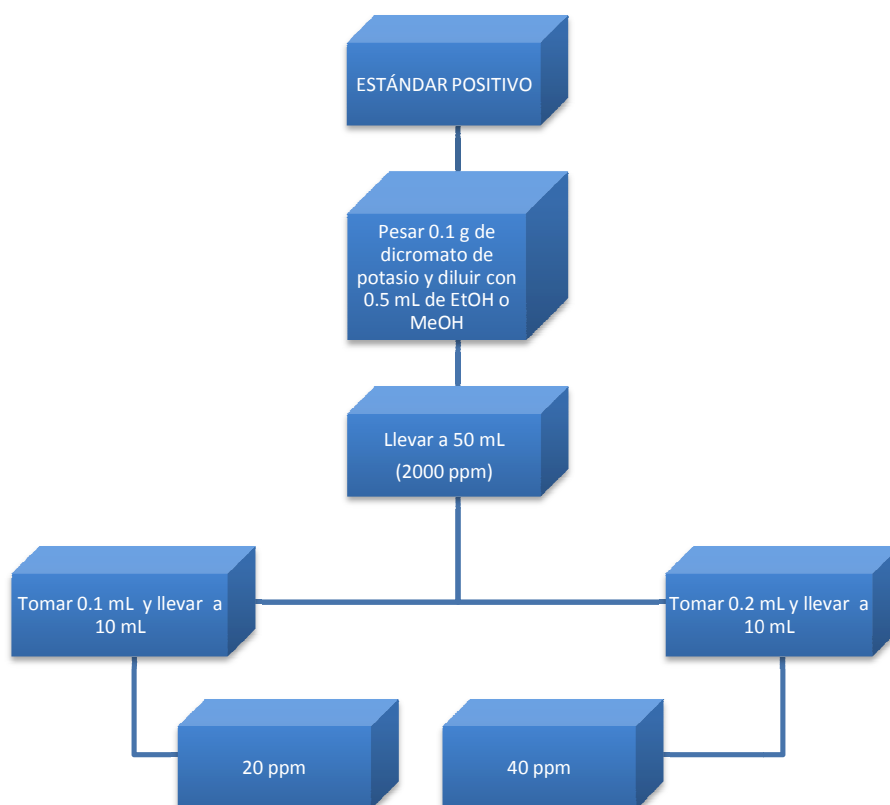
## 6.1. Preparación de las muestras

Previamente se pesaron 129.8 g de planta colocando 1.0 L de etanol en un equipo soxhlet, el extracto se dejó secar dentro de un desecador de vacío con gel de sílice como desecante durante 1 semana obteniendo 12.0974 g. Se decide utilizar etanol para su extracción debido a la mayor obtención de metabolitos en el extracto etanólico (tabla X). Para la preparación de las soluciones (o estándares negativos), se pesaron 500 mg del extracto que fueron diluidos con 0.5 mL de etanol llevando a 0.05 litros con solución salina obteniendo una concentración total de 10,000 ppm (sol. stock). De esta concentración se prepararon sistemas de 8000 ppm, 6000 ppm, 4000 ppm, 2000 ppm y 1800 ppm.



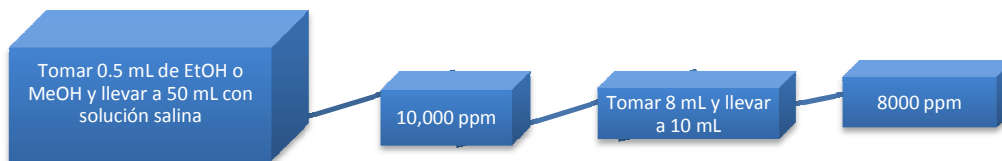
*Esquema 10. Preparación de los estándares negativos*

Cada sistema de soluciones se preparó 5 veces por separado acompañados de un blanco y de dos estándares positivos, uno de 20 ppm y el otro de 40 ppm, como se observa en el siguiente esquema:



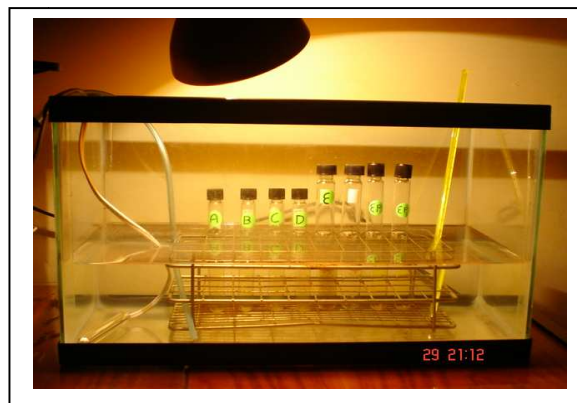
*Esquema 11. Preparación de los estándares positivos*

La preparación del control positivo, se realizó con dicromato de potasio como estándar tóxico, el cual presenta una  $LC_{50}$  crónica en el rango de 20 a 40 ppm y una  $LD_{50}$  aguda de 500 a 800 ppm. En nuestro caso se decidió trabajar con la  $LC_{50}$  crónica. El blanco se diluyó con la misma solución salina hasta 8000 ppm, ya que, como se mencionó anteriormente, tanto el MeOH y EtOH presentan una  $LC_{50}$  de 10,000 ppm. Por tal motivo, se preparó el blanco a una concentración de 8000 ppm, ya que es la concentración más alta utilizada para cada prueba:



*Esquema 12. Preparación del blanco*

A todos los sistemas se les colocaron 10 *Artemias* sub-adultas para determinar la  $LC_{50}$  durante 24.0 h, manteniendo una temperatura de 25-27 °C y como fuente de calor una lámpara de 60 watts. Para llevar a cabo la prueba de letalidad, las *Artemias* sub-adultas utilizadas fueron obtenidas en un acuario las cuales fueron alimentadas con alga espirulina.



*Fig. 9. Sistemas de prueba (screening primario)*

# PARTE IV

# RESULTADOS



# CAPÍTULO 1

## Estudio fitoquímico preliminar

En las tablas VIII y IX se muestran los resultados de los extractos de tallos, hojas y flores realizados en diferentes disolventes y mezclas de ellos:

Tabla VIII. Extractos de tallos y hojas

DISOLVENTE UTILIZADO	CANTIDAD DE DISOLVENTE [mL]	CANTIDAD DE PLANTA [g]	CANTIDAD DE EXTRACTO [g]	APARIENCIA DEL EXTRACTO
HEXANO	280	18.5	0.8	Verde oscuro aceitoso
HEXANO-ACETONA 1:1	130 hexano/ 130 acetona	18.5	1.3	Verde oscuro aceitoso
ACETONA	260	18.5	0.5	Verde oscuro
ETANOL	280	18.5	0.4	Verde oscuro

Tabla IX. Extractos de flores

DISOLVENTE UTILIZADO	CANTIDAD DE DISOLVENTE [mL]	CANTIDAD DE PLANTA [g]	CANTIDAD DE EXTRACTO [g]	APARIENCIA DEL EXTRACTO
HEXANO	200	4.6	1.2	Verde-amarillo cristalino
HEXANO-ACETONA 1:1	100 hexano/ 100 acetona	4.6	0.7	Verde- amarillo opaco
ACETONA	200	4.6	0.2	Amarillo opaco
ETANOL	200	4.6	0.4	Amarillo cristalino

En la tabla X se muestran los resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares para los extractos de tallos y hojas y en la tabla XI se observan los resultados para los extractos de flores.

### 1.1.Extractos de tallos y hojas

**Tabla X. Pruebas fitoquímicas preliminares para los extractos de tallos y hojas**

EXTRACTO	* ALCALOIDES					SAPONINAS	SAPONINAS TRITERPÉNICAS PENTACÍCLICAS	TRITERPENOS	TANINOS	FLAVONOIDES	GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS	AZÚCARES	GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS
	M	D	W	H	AS								
HEXANO	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-
HEXANO-ACETONA	-	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+	-	+/-	-	+ 1 min.	-
ACETONA	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
ETANOL	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+	-	+ 3-5 seg.	-

- Prueba negativa

+ Prueba positiva

+/- Indefinida

\*Pruebas para alcaloides: M = mayer, D= drangendorff, W = wagner, H = hager, AS = ácido silicotúngstico



## 1.2.Extractos de flores

**Tabla XI. Pruebas fitoquímicas preliminares para los extractos de flores**

EXTRACTO	* ALCALOIDES					SAPONINAS	SAPONINAS TRITERPÉNICAS PENTACÍCLICAS	TRITERPENOS	TANINOS	FLAVONOIDES	GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS	AZÚCARES	GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS
	M	D	W	H	AS								
HEXANO	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	+/-	-	+ 5 min.	-
HEXANO- ACETONA	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+/-	+ 30-40 seg.	-
ACETONA	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	+	+/-	+/-	+
ETANOL	-	-	-	-	-	-	+	+	+/-	+	-	+ 12 min.	+

- Prueba negativa

+ Prueba positiva

+/- Indefinida

\* Pruebas para alcaloides: M= mayer, D= drangendorff, W= wagner, H= hager, AS= ácido silicotúngstico

Con base en el análisis fitoquímico anterior (tabla X) para los extractos de tallos y hojas obtenemos alcaloides, saponinas, triterpenos, flavonoides y azúcares.

En los extractos de flores (tabla XI) se obtienen saponinas, saponinas triterpénicas pentacíclicas, triterpenos, flavonoides, azúcares y glicósidos cardiotónicos.

# CAPÍTULO 2

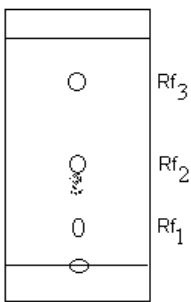
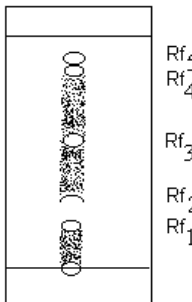
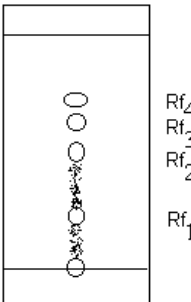
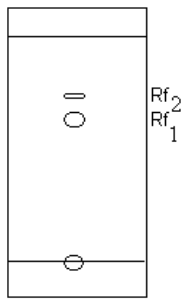
## Separación

### 2.1. CCF para los extractos de tallos y hojas

Se realizó la separación de los compuestos para los extractos de hexano, mezcla hexano-acetona 1:1, acetona y etanol obtenidos anteriormente. Para esto, se probaron diferentes fases móviles dejando únicamente la que presentó mayor distribución de compuestos de cada extracto, así también, se dan a conocer los valores de Rf utilizando la siguiente expresión matemática:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto (cm)}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente (cm)}} = \frac{X}{Y}$$


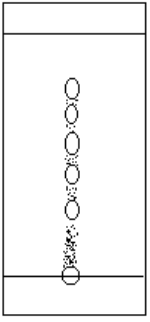

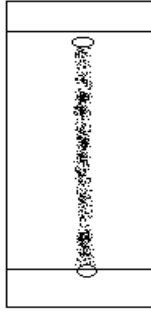
Tabla XII. CCF para los extractos de tallos y hojas

EXTRACTO			
Hexano	Hexano-acetona 1:1	Acetona	Etanol
			
Fase móvil: cloroformo	Fase móvil: cloroformo	Fase móvil: AcOEt	Fase móvil: hexano-acetona 2:1
$Rf_1 = 1.1/2.3 = 0.48$	$Rf_1 = 0.1/2.0 = 0.05$	$Rf_1 = 0.5/2.3 = 0.22$	$Rf_1 = 1.2/1.6 = 0.75$
$Rf_2 = 1.5/2.3 = 0.65$	$Rf_2 = 0.2/2.0 = 0.1$	$Rf_2 = 1.5/2.3 = 0.65$	$Rf_2 = 1.3/1.6 = 0.81$
$Rf_3 = 2.2/2.3 = 0.96$	$Rf_3 = 0.7/2.0 = 0.35$	$Rf_3 = 1.7/2.3 = 0.74$	
	$Rf_4 = 1.4/2.0 = 0.7$	$Rf_4 = 2.2/2.3 = 0.96$	
	$Rf_5 = 1.8/2.0 = 0.9$		

## 2.2. CCF para los extractos de flores

Para el análisis en placas cromatográficas se utilizaron los extractos de hexano, mezcla hexano-acetona 1:1, acetona y etanol. De forma similar para tallos y hojas, en las flores se probaron distintas fases móviles dejando únicamente la que presentó mayor separación de compuestos como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla XIII. CCF para los extractos de flores

EXTRACTO			
Hexano	Hexano-acetona 1:1	Acetona	Etanol
 <p>Rf<sub>4</sub> Rf<sub>3</sub> Rf<sub>2</sub></p> <p>Rf<sub>1</sub></p>	 <p>Rf<sub>5</sub> Rf<sub>4</sub> Rf<sub>3</sub> Rf<sub>2</sub> Rf<sub>1</sub></p>	 <p>Rf<sub>2</sub></p> <p>Rf<sub>1</sub></p>	 <p>Rf<sub>1</sub></p>
Fase móvil: cloroformo	Fase móvil: acetona-cloroformo 2:1	Fase móvil: etanol	Fase móvil: metanol
$Rf_1 = 0.4/1.6 = 0.25$	$Rf_1 = 0.5/2.0 = 0.25$	$Rf_1 = 1.0/1.8 = 0.56$	$Rf_1 = 1.6/1.8 = 0.89$
$Rf_2 = 1.0/1.6 = 0.63$	$Rf_2 = 1.0/2.0 = 0.5$	$Rf_2 = 1.5/1.8 = 0.83$	
$Rf_3 = 1.3/1.6 = 0.81$	$Rf_3 = 1.3/2.0 = 0.65$		
$Rf_4 = 1.4/1.6 = 0.88$	$Rf_4 = 1.5/2.0 = 0.75$		
	$Rf_5 = 1.9/2.0 = 0.95$		

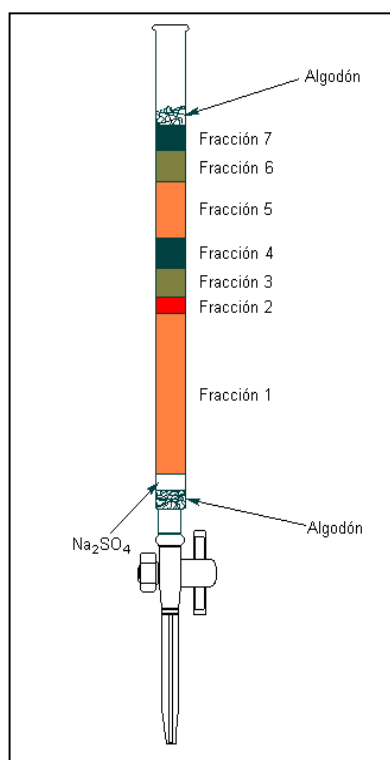
## CAPÍTULO 3

### Separación en columna cromatográfica

Previamente se realizó una extracción en soxhlet utilizando disolventes con un gradiente de polaridad con hexano, hexano-acetona 1:1, acetona y etanol empleando 78.6 g de planta (tallos y hojas).

Para la separación en columna cromatográfica se siguió el estudio para el extracto de hexano con el objetivo de analizar el tipo de compuestos que pueda elaborar la hierba del cáncer con el uso de disolventes no polares. Una vez concentrado, se dejó evaporar a sequedad en la obscuridad dentro de un desecador de vacío utilizando gel de sílice como desecante durante 1 semana obteniendo 5.1 g. Después de este tiempo, se observó la presencia de cristales en forma de cubos en el mismo extracto, se separaron y lavaron con una pequeña cantidad de acetona rotulándolos como  $C_1$ . Del mismo modo, una vez concentrado el extracto etanólico, se obtuvo un sólido blanco el cual se lavó con una pequeña cantidad de etanol y se rotuló como  $C_5$ .

El extracto de hexano se separó por columna llegándose a observar 7 diferentes fracciones las cuales fueron separadas de acuerdo a la coloración que presentaba cada una de ellas.



*Fig. 10. Columna cromatográfica del extracto de hexano para tallos y hojas*

Las 7 fracciones separadas fueron analizadas en CCF llegándose a apreciar otros compuestos por lo que estas fracciones fueron eluidas nuevamente en otras columnas cromatográficas de 25 cm de largo y 1.1 cm de diámetro utilizando silica gel con tamaño de poro de 0.05-0.2 mm como fase estacionaria. Las fases móviles utilizadas son aquellas que presentaron mayor separación de compuestos:

Fracción 1 (hexano), fracción 2 (hexano-AcOEt 4:1), fracción 3 (CHCl<sub>3</sub>-hexano 2:1), fracción 5 (CHCl<sub>3</sub>), fracción 6 (CHCl<sub>3</sub>), fracción 7 (CHCl<sub>3</sub>-hexano 2:1).

En la fracción 1 existen valores muy similares de R<sub>f</sub> como se observa en la tabla XIV los cuales puedan corresponder al mismo compuesto como 0.93, 0.5 – 0.57 y 0.71 – 0.73.

Para la fracción 2 se observan valores de Rf muy cercanos como es el caso de la  $F_{2,1}$  y  $F_{2,2}$ . La primera de estas, se decide separar nuevamente con el uso de una pipeta pasteur, colocando en la parte inferior de la misma, un poco de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 0.1 g de silica gel con un tamaño de poro de 0.05-0.2 mm sin el uso de fase móvil, haciendo eluir a presión con una propipeta, obteniendo así 0.2 mL de un líquido incoloro el cual presentó un Rf de 0.8 utilizando como fase móvil  $\text{CHCl}_3$  y al cual se rotuló como  $\mathbf{A}_1$ .

La fracción 3, presenta dos diferentes compuestos con valores de Rf muy parecidos para el caso de la  $F_{3,2}$ . Para la  $F_{3,1}$  se tiene un Rf de 0.8, el mismo valor obtenido en la  $F_{2,1}$  (1) y con la misma coloración rosa al ser revelado en  $I_2$ .

En la fracción 4, se obtuvo un sólido de color blanco-café con un punto de fusión de 64-68 °C rotulándolo como  $\mathbf{C}_2$ , se le realizó una placa cromatográfica y se observó un compuesto cuyo valor de Rf es 0.86 así como otro(s) compuesto(s) presente(s) en el punto de aplicación. La fase móvil utilizada para su análisis fue de cloroformo.

Para el caso de la fracción 5 sólo se observa un valor de Rf en los cuales podemos encontrar nuevamente el de 0.8 ( $F_{5,1}$ ) como el calculado en la  $F_{2,1}$  con la misma coloración rosa al ser revelado en  $I_2$ .

En la fracción 6, tres de las seis fracciones mantienen un solo Rf a diferencia de la  $F_{6,2}$  y  $F_{6,4}$  donde existen dos compuestos para cada una de ellas. Cabe señalar que se obtuvo en la  $F_{6,1}$  el mismo compuesto encontrado anteriormente con un Rf de 0.8 con  $\text{CHCl}_3$  como fase móvil y la misma coloración rosa al ser revelado en  $I_2$ . Esta Fracción,  $F_{6,1}$ , se separó en forma

similar para la  $F_{2,1}$ , obteniendo 0.1 mL del líquido incoloro el cual ya había sido rotulado como  $A_1$ .

En la fracción 7, para las fracciones  $F_{7,4}$ ,  $F_{7,5}$  y  $F_{7,6}$  no fue posible la determinación de valores de Rf debido a la poca cantidad que se logró obtener, a diferencia del resto de las fracciones en las que se se mantiene un solo valor de Rf.

**Tabla XIV. Rf de las fracciones obtenidas del extracto de hexano**

Fracción	Rf							
	$F_{1,1}$	$F_{1,2}$	$F_{1,3}$	$F_{1,4}$	$F_{1,5}$	$F_{1,6}$	$F_{1,7}$	$F_{1,8}$
$F_1$	(1) 0.5	(1) 0.53	(1) 0.2	(1) 0.53	(1) 0.21	(1) 0.57	(1) 0.73	(1) 0.36
	(2) 0.81	(2) 0.93	(2) 0.53	(2) 0.93	(2) 0.5	(2) 0.93	(2) 0.93	(2) 0.71
			(3) 0.93		(3) 0.93			(3) 0.93
$F_2$	$F_{2,1}$	$F_{2,2}$	$F_{2,3}$	$F_{2,4}$	$F_{2,5}$			
	(1) 0.8 (2) 0.87	(1) 0.63 (2) 0.64	0.5	0.36	0.38			
$F_3$	$F_{3,1}$	$F_{3,2}$						
	(1) 0.64 (2) 0.8	(1) 0.6 (2) 0.62						
$F_5$	$F_{5,1}$	$F_{5,2}$	$F_{5,3}$	$F_{5,4}$	$F_{5,5}$	$F_{5,6}$	$F_{5,7}$	
	0.8	0.4	0.27	-	0.13	-	0.31	
$F_6$	$F_{6,1}$	$F_{6,2}$	$F_{6,3}$	$F_{6,4}$	$F_{6,5}$	$F_{6,6}$		
	0.8	(1) 0.5 (2) 0.87	0.5	(1) 0.30 (2) 0.5	0.31	0.28		
$F_7$	$F_{7,1}$	$F_{7,2}$	$F_{7,3}$	$F_{7,4}$	$F_{7,5}$	$F_{7,6}$	$F_{7,7}$	
	0.93	0.6	0.53	-	-	-	0.71	



# CAPÍTULO 4

## Obtención de alcaloides

En el estudio fitoquímico preliminar para flores, tallos y hojas (tabla X y XI) se pudo determinar la presencia de alcaloides únicamente en estos últimos para los extractos de etanol, acetona y muy poco definido para el extracto de hexano-acetona. Con base en estos resultados se decidió utilizar el extracto etanólico para su análisis, ya que las pruebas de alcaloides realizadas a este mismo fueron más definidas que para el resto de los extractos.

Para obtener los alcaloides se montó un equipo soxhlet, se emplearon 12.9 g de planta y 200 mL de éter de petróleo seguida de una posterior extracción con 200 mL de etanol (Maldoni, 1991). Durante la concentración del extracto de éter de petróleo precipitó un sólido de color blanco al cual se le caracterizó rotulándolo como C<sub>6</sub> cuyas propiedades se dan a conocer más adelante.

Como se observa en el esquema 9, los alcaloides se encuentran únicamente para las pruebas 2, 3 y 5 utilizando como reactivos de precipitación el reactivo de drangendorff y reineckato. En base a la observación anterior se decide obtener los alcaloides a partir de una maceración ácida con 10 g de tallos y hojas en 200 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5.0% (sistema I) y en medio básico con 300 mL de NH<sub>4</sub>OH al 1% (sistema II) en la oscuridad durante una semana.

Los sistemas I y II se filtraron. A la solución acuosa de ambos sistemas se les realizaron pruebas directas de alcaloides dando los siguientes resultados:

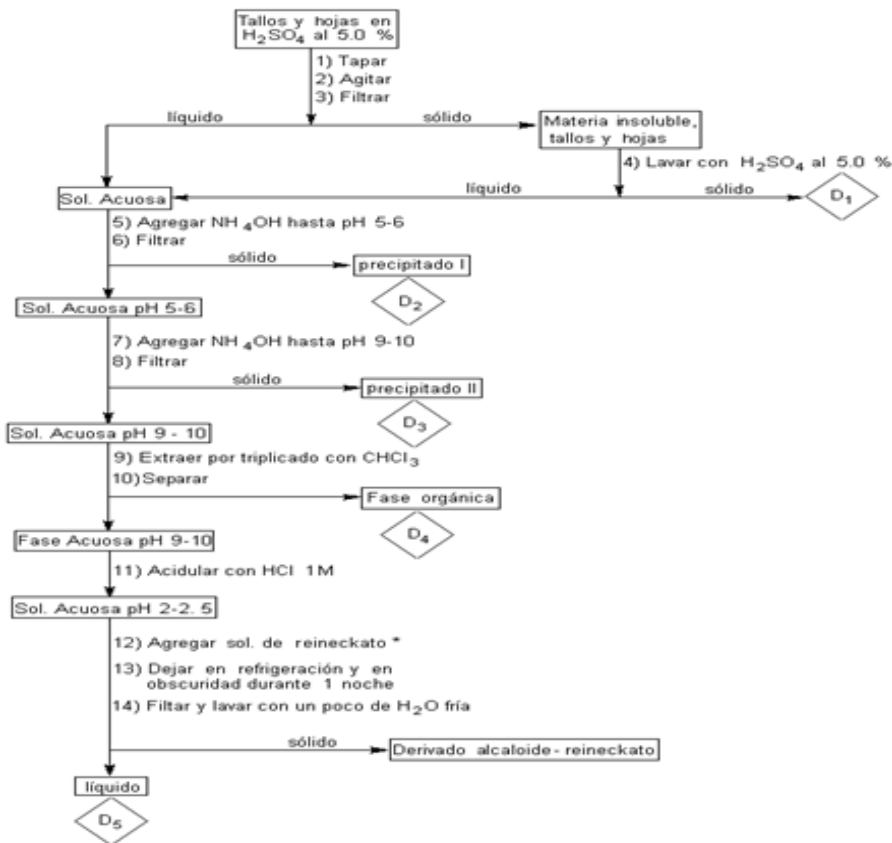
**Tabla XV. Pruebas de alcaloides para los sistemas I y II**

SISTEMAS	REACTIVOS*				
	Hager	Wagner	Drangendorff	Ác. silicotúngstico	Reineckato
I. NH <sub>4</sub> OH 1%	+++	++++	++++	++++	++
II. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	+++++	+++++	+++	++++	+++++

\*Ver anexo III para su preparación

De acuerdo a lo anterior se decidió analizar únicamente el sistema II debido a la mayor cantidad de precipitado observado con el reactivo de reineckato, así mismo, este reactivo puede usarse en columnas de intercambio iónico para la obtención de alcaloides.

El siguiente diagrama muestra el procedimiento empleado para la obtención de los alcaloides de la hierba del cáncer a partir de una maceración ácida y a los cuales se les realizó un seguimiento a través de CCF (Berkov, 2001).



Esquema 13. Obtención de los alcaloides de la hierba del cáncer a partir de una maceración ácida

\*ver anexo III

Se llevó a cabo el análisis de los alcaloides en CCF tomando muestras directas con los siguientes resultados:

Tabla XVI. CCF de la maceración con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5.0 %

Fase móvil: MeOH-acetona 1:1	Fase móvil: MeOH-acetona-hexano 1:1:1	Fase móvil: MeOH-acetona-hexano 1:1:2
$Rf_1 = 0.6/0.8 = 0.33$	$Rf_1 = 0.3/1.6 = 0.18$	$Rf_1 = 1.3/2.2 = 0.59$
$Rf_2 = 1.6/1.8 = 0.88$	$Rf_2 = 1.5/1.6 = 0.93$	

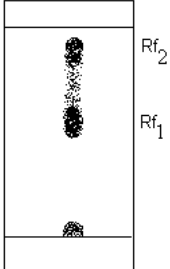
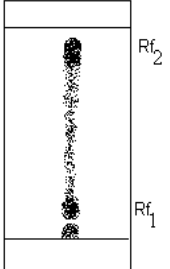
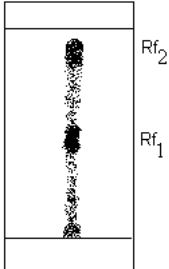
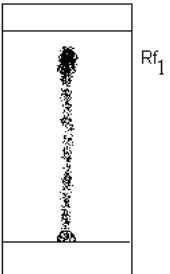
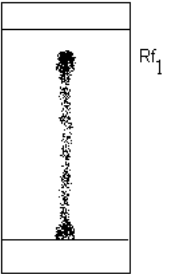
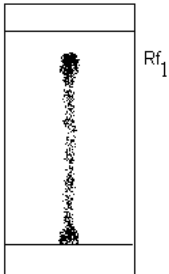
En la tabla anterior se distinguen 2 puntos con diferente Rf para las dos primeras placas a diferencia de la tercera en la que solo se aprecia uno, no sin antes descartar la existencia de otros compuestos cercanos al punto de aplicación. El uso de hexano en dos de los tres sistemas permite visualizar si existe otro(s) compuesto(s) lo cual no se observa en este caso. Durante el procedimiento, se obtuvieron dos precipitados, uno al momento de llegar a un pH de 5-6 el cual fue de color morado (precipitado I) y el segundo (precipitado II) a un pH de 9-10 con un color verde opaco. A estos precipitados se le realizaron pruebas de solubilidad así como un análisis fitoquímico.

**Tabla XVII. Análisis de solubilidad y fitoquímico para los precipitados I y II**

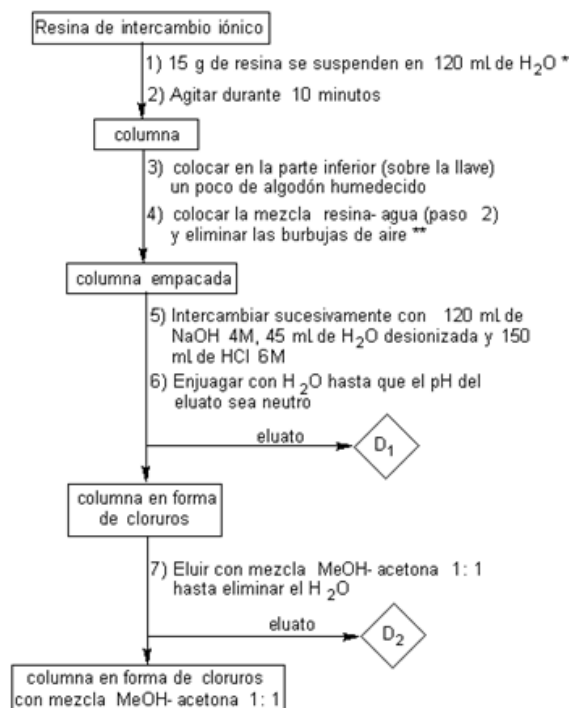
PRECIPITADO	SOLUBILIDAD					
	H <sub>2</sub> O	CHCl <sub>3</sub>	acetona	EtOH	hexano	
<b>I</b>	-	-	-	+	-	+ para azúcares y saponinas
<b>II</b>	+++	-	-	++	-	+ para saponinas

Para el precipitado 2 se observa mayor solubilidad en agua y ligeramente en etanol, en ambos precipitados se encuentran saponinas y azúcares únicamente para el primero. Las siguientes soluciones acuosas a pH 5-6, pH 9-10 y pH 2-3 se les realizaron pruebas de alcaloides utilizando reactivo de reineckato para su identificación las cuales fueron positivas, así mismo, fueron analizadas en CCF utilizando como fase móvil aquellas que presentaron mayor separación como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla XVIII. CCF de las soluciones acuosas a diferente pH

pH 5-6	pH 9-10	pH 2.5 - 3
 <p>Fase móvil: MeOH-acetona 1:1  <math>Rf_1 = 1.2/2.0 = 0.6</math>  <math>Rf_2 = 1.8/2.0 = 0.9</math></p>	 <p>Fase móvil: MeOH-acetona 1:1  <math>Rf_1 = 0.4/1.6 = 0.25</math>  <math>Rf_2 = 1.4/1.6 = 0.87</math></p>	 <p>Fase móvil: MeOH-acetona 1:1  <math>Rf_1 = 1.0/1.9 = 0.5</math>  <math>Rf_2 = 1.7/1.9 = 0.87</math></p>
 <p>Fase móvil: MeOH-acetona-hexano 1:1:2  <math>Rf_1 = 1.6/2.0 = 0.8</math></p>	 <p>Fase móvil: MeOH-acetona-hexano 1:1:2  <math>Rf_1 = 1.3/1.6 = 0.8</math></p>	 <p>Fase móvil: MeOH-acetona-hexano 1:1:2  <math>Rf_1 = 1.4/1.6 = 0.87</math></p>

A la última solución con pH 2-2.5 se le agrega reactivo de reineckato obteniendo así el derivado del alcaloide-reineckato. Para obtener el alcaloide(s) previamente se acondicionó una columna de 25 cm de largo y 1.1 cm de diámetro empacada con resina de intercambio aniónico fuertemente alcalina Ionenaustauscher III (Art. 4767, 3mVal/g, 0.35-0.6 mm Merck) como fase estacionaria y como fase móvil la mezcla MeOH-acetona 1:1 como sigue:

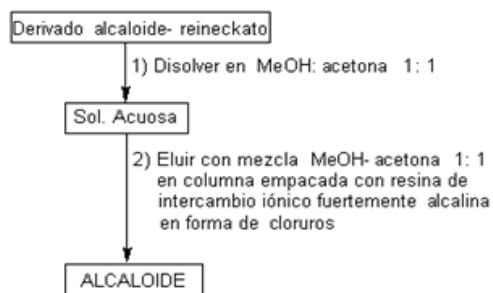


**Esquema 14. Acondicionamiento de la resina de intercambio iónico fuertemente alcalina**

\* Por cada 5 gramos de resina se suspenden en aproximadamente 40 mL de H<sub>2</sub>O.

\*\* No permita nunca que el nivel del H<sub>2</sub>O sea más bajo que el de la resina (Práctica 4. Cromatografía de intercambio iónico).

Una vez acondicionada la columna se obtiene el alcaloide eluyendo el derivado alcaloide-reineckato (disuelto en MeOH:acetona 1:1) como se muestra a continuación:



**Esquema 15. Obtención del alcaloide(s) de la hierba del cáncer**

Después de concentrar las 20 fracciones obtenidas en la columna empacada con resina de intercambio iónico, se obtuvo un sólido de color blanco-

café muy tenue, se le realizaron pruebas de alcaloides (tabla XIX) observándose la misma coloración rosa del derivado alcaloide-reineckato obtenido anteriormente. La maceración ácida y las resinas de intercambio iónico, hacen posible la obtención del alcaloide(s) presentes en la hierba del cáncer.

**Tabla XIX. Pruebas de alcaloides al sólido obtenido en columna de intercambio iónico**

SISTEMAS	REACTIVOS				
	Hager	Ác. silicotúngstico	Mayer	Reineckato	Dragendorff
HCl dil. + Muestra + Reactivo	+++++	++	++	+++++	+++++
Muestra + H <sub>2</sub> O + Reactivo	++	++	++	++++	+++
“BLANCO” (HCl dil. + Reactivo)	-	-	-	-	-

Al sólido obtenido (0.0036 g de 10 g de hierba del cáncer) se rotuló como C<sub>3</sub> y al que se le realizaron placas cromatográficas calculando su R<sub>f</sub>. Estas placas fueron eluidas en un sistema MeOH-acetona 1:1 y se bañaron con el reactivo de drangendorff y reactivo de reineckato respectivamente, con el fin de observar alguna coloración o formación de precipitado lo que fue positivo como se observa en la siguiente figura:



*Fig. 11. CCF del compuesto C<sub>3</sub>*

Con el reactivo de drangendorff se observa una coloración café en el punto de aplicación y en el frente del disolvente (R<sub>f</sub> = 0.9). Con el reactivo de reineckato sucede lo mismo, en este caso, la coloración es rosa en el punto de aplicación y la formación de precipitado rosa en el frente del disolvente.

# CAPÍTULO 5

## Caracterización

Se llevó a cabo la caracterización de cada compuesto obtenido mediante pruebas de solubilidad, punto de fusión, Rf y apariencia física.

El índice de refracción del compuesto **A<sub>1</sub>** se obtuvo con un refractómetro de Abbe. Los puntos de fusión de los compuestos **C<sub>1</sub>**, **C<sub>2</sub>**, **C<sub>5</sub>** y **C<sub>6</sub>** no están corregidos y se determinaron en un aparato Fisher Johns. Para el revelado de la CCF se utilizó una lámpara ultravioleta UVSL 25.

Tabla XX. Rf de los compuestos obtenidos

COMPUESTO	SISTEMA DE SOLUBILIDAD	FASE MÓVIL	Rf
<b>C<sub>1</sub></b>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	Rf = 0.6/1.5 = 0.4
<b>C<sub>2</sub></b>	CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>	Rf = 1.2/1.4 = 0.86
<b>C<sub>3</sub></b>	MeOH-acetona 1:1	MeOH-acetona 1:1	Rf = 1.2/1.3 = 0.92
<b>C<sub>5</sub></b>	H <sub>2</sub> O	EtOH	Rf = 1.0/1.4 = 0.71
<b>C<sub>6</sub></b>	CHCl <sub>3</sub> -acetona 1:1	EtOH	Rf = 1.3/1.5 = 0.87
<b>A<sub>1</sub></b> (F <sub>2,1</sub> y F <sub>6,1</sub> )	-	CHCl <sub>3</sub>	Rf = 1.2/1.5 = 0.8



## 5.1. Sólidos

Tabla XXI. Caracterización de los sólidos obtenidos

COMPUESTO	PESO [g] y %	SOLUBILIDAD					P. F [ °C ]	APARIENCIA FÍSICA	Rf
		H <sub>2</sub> O	acetona	hexano	CHCl <sub>3</sub>	EtOH			
C <sub>1</sub>	0.0004 * (0.0005%)	-	-	+++++	+++++	-	178	Sólido en forma de cubos de color verde	0.4
C <sub>2</sub>	0.0025 * (0.003%)	-	+++	-	+++	++	64-68	Sólido amorfo color crema	0.86
C <sub>3</sub>	0.0036 ** (0.036%)	+++++	++++	-	-	+++		Sólido amorfo de color crema	0.92
C <sub>5</sub>	0.1949* (0.25%)	+++++	-	-	-	+++	164- 166	Sólido amorfo de color blanco	0.71
C <sub>6</sub>	0.0004*** (0.003%)	-	+++	-	+++	++	76-80	Sólido amorfo de color blanco	0.87

\*78.6g de tallos y hojas

\*\*10g de tallos y hojas

\*\*\*12.9g de tallos y hojas

## 5.2. Líquidos

Tabla XXII. Caracterización del líquido obtenido

A <sub>1</sub>	VOLÚMEN	SOLUBILIDAD					APARIENCIA FÍSICA	$\rho^{12}$	$\eta^{15}$	Rf
		H <sub>2</sub> O	acetona	hexano	CHCl <sub>3</sub>	EtOH				
F <sub>2,1</sub>	0.2 mL* (3.92 %)	-	++++	+++++	+++++	-	Líqu. incoloro	0.8608	1.4876	0.8
F <sub>6,1</sub>	0.1 mL* (1.96 %)	-	++++	+++++	+++++	-	Líqu. incoloro	0.8608	1.4876	0.8

\*78.6g de tallos y hojas

$\rho^{12}$  es la densidad a 12 °C y  $\eta^{15}$  es el índice de refracción a 15 °C

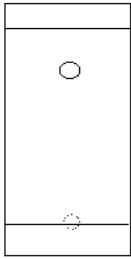

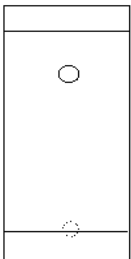
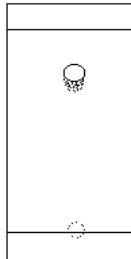
**NOTA:** Los puntos de fusión fueron determinados una sola vez a los sólidos, así mismo la densidad e índice de refracción para los líquidos debido a la poca cantidad obtenida y a la elaboración de pruebas de solubilidad, Rf, espectroscopía, etc.

A este líquido  $A_1$  obtenido en las fracciones  $F_{2,1}$  y  $F_{6,1}$  se le realizaron pruebas fitoquímicas presuntivas, siendo positiva para triterpenos en ambos casos, apareciendo una coloración rojo-naranja alrededor de los 8 segundos después de realizar dicha prueba. El análisis del  $C_5$  se siguió simultáneamente con manitol presentando las mismas propiedades físicas como solubilidad, punto de fusión,  $R_f$ , color y positivo para azúcares.

### 5.3. CCF de los compuestos $C_2$ y $C_6$

Para el caso de los compuestos  $C_2$ , y  $C_6$  se aprecia gran similitud en algunas de sus propiedades, como es la solubilidad y  $R_f$  pero diferente punto de fusión. A estos compuestos, se les realizaron placas cromatográficas. Previamente fueron disueltos en  $CHCl_3$ -acetona 1:1 y corridos en un sistema de fase móvil de cloroformo y etanol.

**Tabla XXIII. CCF para los compuestos  $C_2$  y  $C_6$**

$C_2$		$C_6$	
			
Fase móvil: cloroformo $R_f = 1.2/1.4 = 0.86$	Fase móvil: etanol $R_f = 1.2/1.4 = 0.86$	Fase móvil: cloroformo $R_f = 1.2/1.5 = 0.8$	Fase móvil: etanol $R_f = 1.3/1.5 = 0.87$

En base a estos resultados, podemos decir que probablemente se trate del mismo compuesto, en ambos casos se logran apreciar otros compuestos o la presencia de alguna(s) impureza(s), razón por la cual se obtienen diferentes valores en el punto de fusión.

# CAPÍTULO 6

## Actividad biológica

### 6.1. Determinación de la LC<sub>50</sub> del extracto etanólico para tallos y hojas.

Para determinar la LC<sub>50</sub> del extracto etanólico de la hierba del cáncer, se utilizó el método estadístico de Reed-Muench (M.Colegate, 1993) de acuerdo a la mortalidad obtenida en los sistemas preparados. Cabe mencionar que no se presentó ninguna muerte en el blanco a diferencia del control positivo en el que la mayoría de los organismos de prueba empezaron a morir en un rango de 2-8 horas del inicio del experimento para ambas concentraciones utilizadas (20 y 40 ppm).

Tabla XXIV. Mortalidad de la *Artemia salina* Leach sub-adulta después de 24 horas de exposición del extracto etanólico de la h. del cáncer

Dosis (ppm)	Dosificación (log dosis)	Muertos	Vivos	Muertes acumuladas	Vivos acumulados	Proporción de mortalidad	Mortalidad (%)
8000	3.90	44	6	103	6	103/109	94.5
6000	3.80	35	15	59	21	59/80	73.8
4000	3.60	15	35	24	56	24/80	30.0
2000	3.30	5	45	9	101	9/110	8.2
1800	3.26	4	46	4	147	4/151	2.6

Tamaño de la muestra = 50 *Artemias* sub-adultas por sistema

La dosis que matará el 50 % de los animales se obtiene por medio de dos gráficos. El primero se determina de acuerdo al número de muertes acumuladas

y número de vivos acumulados contra el log dosis. El punto de intersección de las dos curvas a la dosificación nos da la  $LC_{50}$  estimada.

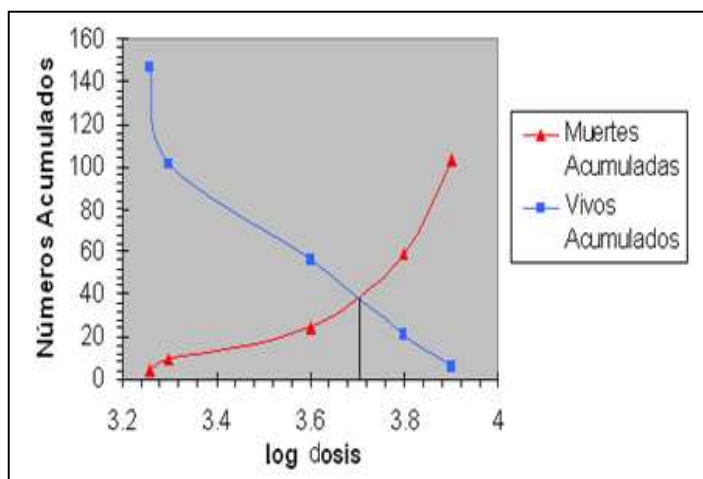


Fig. 12. Estimación de la  $LC_{50}$  por intersección de las muertes acumuladas y vivos acumulados.

De acuerdo al gráfico anterior el log de la dosis para el extracto etanólico de la hierba del cáncer es 3.70, o bien, la  $LC_{50}$  para 24 horas es de **5011.87 ppm**. El segundo gráfico se construye con el % de la mortalidad contra la dosificación (log dosis), donde el 50 % de la mortalidad se obtiene por intersección:

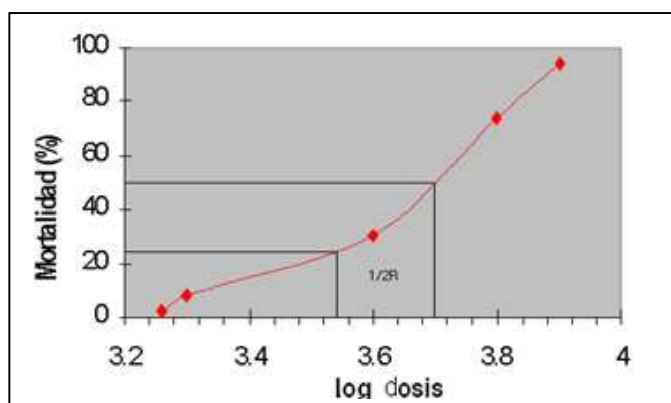


Fig. 13. Estimación de la  $LC_{50}$  y el error estándar.

Como se puede observar, para ambos gráficos existe una mortalidad del 50 % de animales, o bien el log de la dosis es de 3.70 con una  $LC_{50}$  estimada de 5011.87 ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

El error estandar se calcula utilizando aplicando la siguiente fórmula:

$$SE LC_{50} = \sqrt{(0.79 h R/n)}$$

Donde h = promedio del intervalo entre las dosis (3.54+3.70/2), R= rango, Log LC<sub>50</sub> – Log LC<sub>25</sub>, obtenido a partir de los porcentajes de mortalidad contra la dosis (*Fig. 13*), n = número de animales. Por lo tanto tenemos un **SE LC<sub>50</sub> = 0.0957**

Este valor calculado para la LC<sub>50</sub> nos indica el grado de dispersión promedio entre los datos observados (muertes y vivos) con respecto a los datos estimados (muertes y vivos acumulados), mostrando un valor muy pequeño y aceptable de error estándar de 0.096.

El 95 % del límite de confianza de la LC<sub>50</sub> puede ser obtenido con la relación:

$$\text{Log LC}_{50} \pm 2SE LC_{50}$$

O bien:

$$3.70 \pm 2(0.0957)$$

De acuerdo a lo anterior, la hierba del cáncer presenta una letalidad mínima, mostrando una LC<sub>50</sub> de 5011.87 ppm similar para compuestos orgánicos como butanol o acetona con valores de LC<sub>50</sub> de 3000 ppm y 2100 ppm respectivamente los cuales son relativamente tóxicos.

# CAPÍTULO 7

## Espectroscopía

### 7.1. Espectroscopía de los compuestos C<sub>5</sub>, A<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>

El análisis espectroscópico se realizó únicamente para los compuestos C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y A<sub>1</sub> utilizando, para estos dos últimos, una base de datos para la posible identificación de los compuestos. Este análisis se muestra en los espectros E2, E3, E5 y E6 (anexo I).

#### 7.1.1. Espectroscopía del compuesto C<sub>5</sub>

El compuesto C<sub>5</sub> fue analizado como se observa en la siguiente tabla:

Infrarrojo (espectro E1)

**Tabla XXV. Espectroscopía de IR del compuesto C<sub>5</sub>**

<b>Bandas [cm<sup>-1</sup>]</b>	<b>Observaciones</b>
3300 y 3280	Banda fuerte de estiramiento para alcoholes
2985.35 y 2903	Banda múltiple de estiramiento para C-H
1417.6 y 1300.39	Bandas para alcoholes primarios y secundarios
1077.72 y 1045.81	Banda fuerte de estiramiento para C-O

El espectro E1 fue comparado utilizando una base de datos y se obtuvo el espectro E2 donde observamos una total coincidencia del compuesto C<sub>5</sub> el que corresponde a **manitol**.

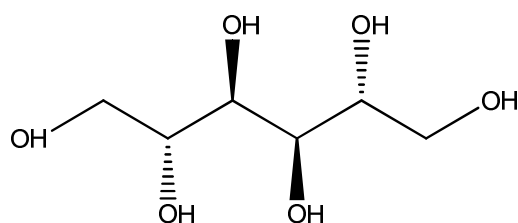
### Espectrometría de masas (espectro E3)

**Tabla XXVI. Espectrometría de masas del compuesto C<sub>5</sub>**

Picos	Observaciones
CHO <sup>+</sup> m/z= 29, C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> m/z= 43, C <sub>2</sub> HO <sub>2</sub> <sup>+</sup> m/z= 57, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> m/z= 61, C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> m/z= 73 (Pico base), C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> m/z= 89, C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> m/z= 103, C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> <sup>+</sup> m/z= 133.	Patrón de fragmentación correspondiente a alcoholes

En el espectro se observa un pico muy pequeño que posiblemente corresponda al ión molecular m/z=182. Se observan también otros picos de muy baja abundancia relativa y con valores m/z superiores al anterior que posiblemente se deban a impurezas. El E3 en la parte inferior muestra datos que arroja la base de datos que posee el equipo y en el podemos encontrar una total coincidencia con los picos y abundancias relativas correspondiente al compuesto de nombre **manitol**.

Los datos arrojados por la espectroscopia de infrarrojo y la espectrometría de masas nos llevan a la siguiente estructura:



(2R,3R,4R,5R)-hexan-1,2,3,4,5,6-hexaol

Para complementar los datos espectroscópicos se realizaron las siguientes determinaciones: apariencia física, punto de fusión y cromatografía en placa fina contra un estándar de manitol encontrando los siguientes valores: sólido amorfo de color blanco, punto de fusión 164-166° C y un Rf de 0.71. Por lo que no queda ninguna duda que la muestra C<sub>5</sub> corresponde a **manitol** como se observa en la siguiente tabla comparativa:

Tabla XXVII. Compuesto C<sub>5</sub> y manitol

COMPUESTO	SOLUBILIDAD					P. F [ °C ]	APARIENCIA FÍSICA	Rf
	H <sub>2</sub> O	acetona	hexano	CHCl <sub>3</sub>	EtOH			
C <sub>5</sub>	+++++	-	-	-	+++	164-166	Sólido amorfo de color blanco	0.71
<b>manitol</b> (estándar)	+++++	-	-	-	+++	164	Sólido cristalino de color blanco	0.70

Por su parte las pruebas de identificación químicas nos indican que es positivo para azúcares así como en los extractos obtenidos de hexano-acetona y etanol.

Este azúcar también se ha aislado de las especies de plantas del género *Cuphea* como *C. wrightii*, *C. epilobifolia* y *C. infundibulum* (Vega Avila, 2005). Del mismo modo, en esta tesis comprobamos que la planta *Cuphea aequipetala* Cav. produce este tipo de metabolitos.



## 7.1.2. Espectroscopía del compuesto A<sub>1</sub>

Infrarrojo (espectro E4)

**Tabla XXVIII. Espectroscopía de IR del compuesto A<sub>1</sub>**

Bandas [cm <sup>-1</sup> ]	Observaciones
2954.89 y 2854.95	Bandas de estiramiento fuerte para C-H *
1377.55	Banda de flexión simétrica para ( $\delta_s$ CH <sub>3</sub> )
1463.35	Banda de vibración de flexión asimétrica para ( $\delta_{as}$ CH <sub>3</sub> )
1463.35	Vibraciones de flexión en el plano o scissoring ( $\delta_s$ CH <sub>2</sub> ) **
1121.12	Banda de baja intensidad para CH (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
721.67	Banda de flexión en el plano o rocking ( $\rho$ CH <sub>2</sub> )
830.35	Banda de vibración de estiramiento muy débil para C-C

\*Los hidrocarburos que contienen grupos metilo muestran, en todos los casos, dos bandas distintas en 2962 y 2872 cm<sup>-1</sup>. El primero de estos resulta del modo de estiramiento asimétrico en el cual dos enlaces C-H se extienden mientras el tercero se contrae ( $\nu_{as}$  CH<sub>3</sub>). El segundo es el del estiramiento simétrico ( $\nu_s$  CH<sub>3</sub>) en el cual los tres enlaces C-H se extienden y se contraen en fase”. “Los estiramientos asimétricos ( $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>) ocurren respectivamente, cerca de 2926 y 2853 cm<sup>-1</sup>” (R.M., 1991). Por lo que en la estructura tenemos metilos y metilenos.

\*\*El Silverstein señala ~ 1465 cm<sup>-1</sup>.

Haciendo uso de la base de datos, el espectro E5 de IR, nos muestra la similitud con compuestos de cadenas del tipo saturado como son aceites de motor o lubricantes.

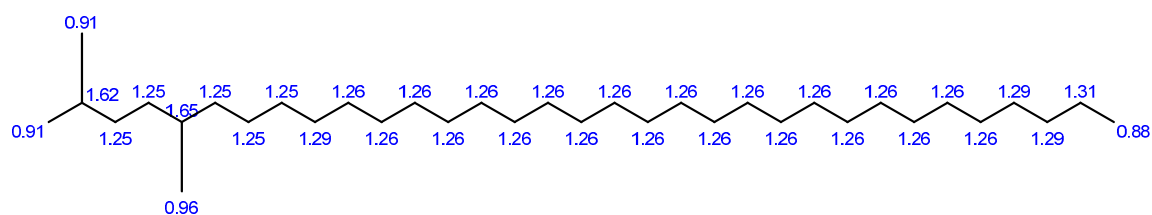
## Resonancia magnética nuclear

Se toma en consideración los espectros E7 y E8 (Protónica), E9 (Carbono) y E10 (DEPT). En los tres espectros se ven únicamente desplazamientos químicos que corresponden a la región de alcanos, no hay total resolución de las señales correspondientes ya que algunas son equivalentes como los CH<sub>2</sub> y algunas se encuentran sobrepuestas como los CH<sub>3</sub> hecho que se ve mas claro en el espectro de Hidrógeno ya que solo se alcanzan a ver tres conjuntos de señales; las correspondientes a CH's entre 1.451-1.709 ppm, CH<sub>2</sub> en 1.255 ppm y CH<sub>3</sub> entre 0.827-0.911 ppm y no es posible ver las multiplicidades correspondientes.

En el caso de Carbono sí hay un mayor número de señales las cuales se asignan ayudandonos del espectro DEPT (Distortionless enhancement by polarization transfer) en la que podemos observar en el primer espectro (de abajo hacia arriba) todos los carbonos que tienen Hidrógenos, después en el segundo espectro los CH's en el que se observan dos señales, en el tercer espectro los CH<sub>2</sub> y en el cuarto los CH<sub>3</sub> en el que se observan tres señales.

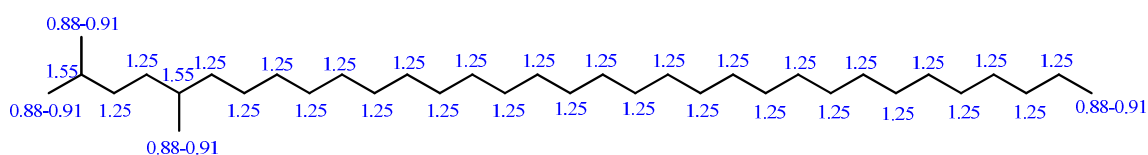
Se utilizó el programa ChemBioDraw Ultra 12.0 para obtener una aproximación de los valores correspondientes a la estructura propuesta por nosotros y encontramos los siguientes datos:

Desplazamientos químicos calculados de RMN  $^1\text{H}$  por el programa ChemBioDraw Ultra 12.0



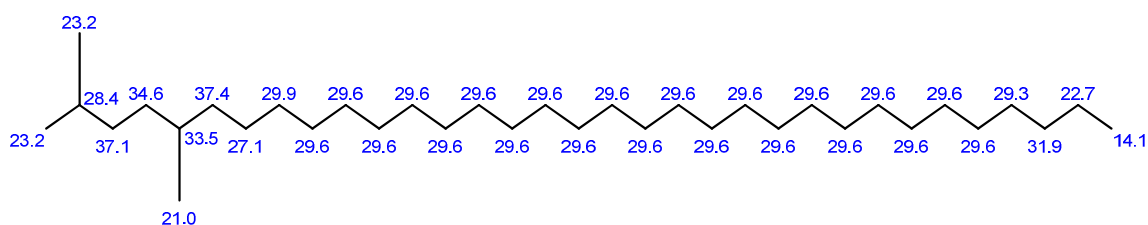
2,5-dimetiltritriacontano

Desplazamientos químicos (ppm) correspondientes a las señales del espectro RMN  $^1\text{H}$  mostrado en el espectro E8 del anexo I.



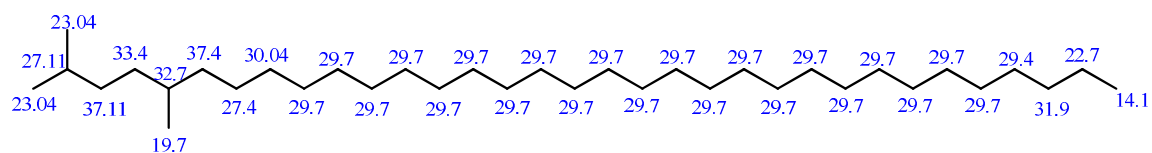
2,5-dimetiltritriacontano

Desplazamientos químicos calculados de RMN  $^{13}\text{C}$ .



2,5-dimetiltritriacontano

Desplazamientos químicos (ppm) correspondientes a las señales del espectro RMN  $^{13}\text{C}$  mostrado en el espectro E9 del anexo I.



2,5-dimetiltritriacontano

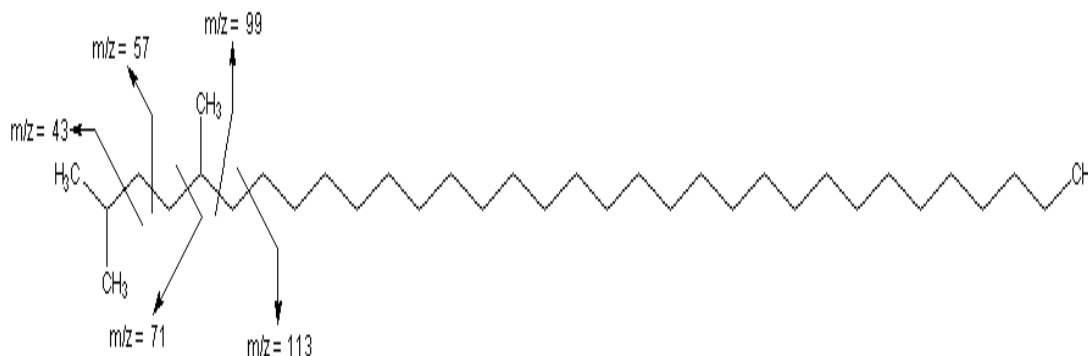
Se hace la aclaración que se ensayó para varias estructuras y la que más se acerca es para el 2,5-dimetiltritriacontano como estructura propuesta para el compuesto A<sub>1</sub>. Tal como se puede ver no hay una gran diferencia entre los espectros calculados y los espectros reales de la muestra.

### Espectrometría de masas

A pesar de mostrar un ión molecular de m/z 498 (E6), se considera una masa molecular de 492.946 g/mol (C<sub>35</sub>H<sub>72</sub>). Como es sabido, el peso molecular para los alcanos puede no aparecer debido a que la intensidad del ión molecular disminuye al aumentar la longitud de la cadena por lo que el M<sup>+</sup> no se observa en moléculas muy grandes.

Con respecto a la fragmentación, en la mayor parte de los casos, se producen rupturas de enlaces sencillos en los átomos de C ramificados ya que son los sitios que darán como resultado los fragmentos cargados más estables y la carga positiva permanece en el átomo de C ramificado o puede ser producto de transposiciones. Las series iónicas muestran picos consecutivos de la serie C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub> (m/z 29, 43, 57, 71, ...), acompañados por picos menos intensos de las series C<sub>n</sub>H<sub>2n-1</sub> (m/z 27, 41, 55, 69, ...) y C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub> (m/z 28, 42, 56, 70, ...) correspondiente al patrón de fragmentación de los alcanos (Pretsch, 2002).

Al realizar el análisis del patrón de fragmentación de la molécula propuesta se observan algunos de los fragmentos de las series mencionadas anteriormente como se observa a continuación:



### 2,5-dimetiltritriacontano

$C_3H_7^+$  m/z 43,  $C_4H_9^+$  m/z 57 correspondiente al ión molecular,  $C_5H_{11}^+$  m/z 71,  $C_7H_{15}^+$  m/z 99,  $C_8H_{17}^+$  m/z 113.

### 7.1.3. Espectroscopía del compuesto $C_3$

Como se mencionó en la parte IV capítulo 4, existe la posibilidad de la existencia de 2 alcaloides en la hierba del cáncer. Al sólido obtenido, se le realizó un análisis espectroscópico.

Infrarrojo (espectro E11)

Tabla XXIX. Espectroscopía de IR para el compuesto  $C_3$

Bandas [ $cm^{-1}$ ]	Observaciones
3600-3400	Bandas para alcoholes
3006.87-2800	Bandas para C-H
2119.08	Bandas para compuestos aromáticos

El espectro E12 de masas nos muestra un ión molecular con una  $m/z=161$  y un pico base de 58. Se puede atribuir la presencia de compuestos aromáticos debido a fragmentos con valores de  $m/z$  de 71-81 tomando en consideración la masa del benceno.

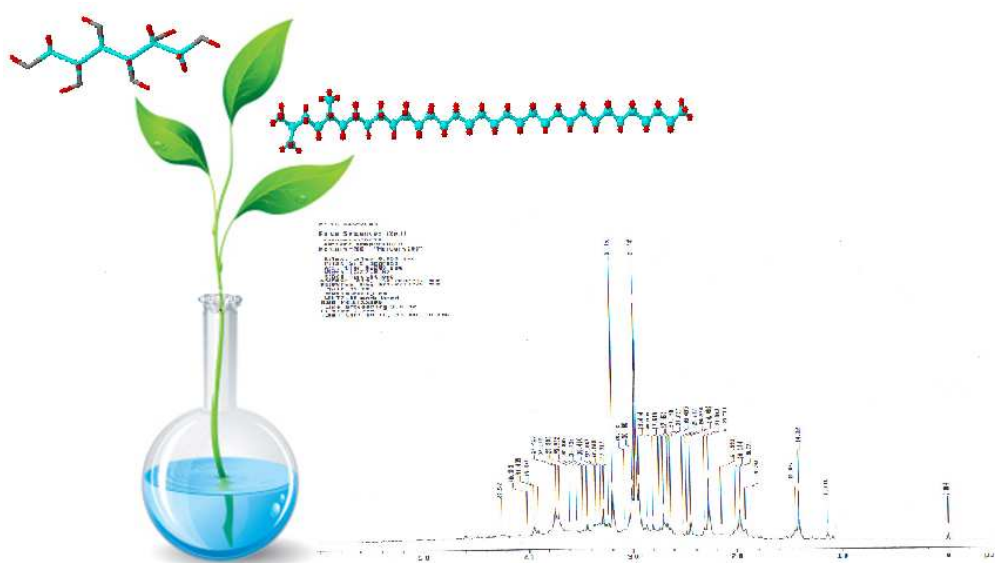
La RMN de  $^1\text{H}$  del espectro E13, se observan señales con valores de 7-8 en la región de compuestos aromáticos, así también una señal en 3.14 para metoxilos.

En el espectro E14 de  $^{13}\text{C}$ , se observan señales en el rango de 120-140 para compuestos aromáticos, así como una señal de 53.118 para un posible metoxilo.

Estos resultados son de suma importancia para una futura investigación que nos lleve a la elucidación de las estructuras químicas de los alcaloides.

# PARTE V

# CONCLUSIONES



Se llevó a cabo el estudio fitoquímico de la hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*), contribuyendo así al estudio de plantas medicinales de uso tradicional en México.

La investigación bibliográfica recopilada sobre la hierba del cáncer muestra que en la mayoría de los casos se utiliza en problemas de disentería, infecciones, heridas, granos, etc., aunque la mayor atención que se le ha dado a esta planta es porque en la medicina tradicional mexicana se considera que es útil en padecimientos de “cáncer” en el Distrito Federal, Estado de México, Veracruz, Michoacán y Morelos principalmente.

Se logró probar la metodología desarrollada de los procesos de extracción y separación para la caracterización de tres de los metabolitos presentes en la planta. Aunque encontramos una gran cantidad de compuestos en este análisis preliminar consideramos adecuado enfocarnos a la elucidación del manitol y la estructura propuesta para el 2,5-dimetiltritriacontano porque nos parecieron más interesantes y teníamos las herramientas adecuadas para su estudio como la espectroscopía, base de datos y el uso del programa ChemBioDraw Ultra 12.0 de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para la elucidación de este último compuesto. Así mismo, se logró estructurar la metodología para la obtención de la posible mezcla de alcaloides.

Se determinó la concentración letal media crónica ( $\text{LC}_{50}$ ) utilizando el crustáceo *Artemia salina* Leach para el extracto etanólico. De acuerdo a lo anterior, la hierba del cáncer presenta una **letalidad mínima** lo que hace pensar que los compuestos aislados en esa fracción no representan toxicidad.



# PARTE VI

# PROSPECTIVAS



Consideramos que la hierba del cáncer es una planta medicinal muy interesante y de amplio uso en la República Mexicana y que el presente trabajo tan solo es una aproximación al conocimiento de ella.

De esta tesis se pueden derivar múltiples trabajos, que nos permitan conocer perfectamente la composición fitoquímica de la hierba del cáncer como:

- Continuar con el estudio de los extractos de las flores.
- Identificar plenamente los alcaloides presentes en esta planta.
- Estudiar cada una de las diferentes fracciones que se obtuvieron.
- Continuar con el estudio de los extractos de tallos y hojas (hexano-acetona, acetona, etanol).
- Iniciar el estudio de las hojas y el tallo por separado.
- Estudiar los extractos obtenidos de la raíz.
- Realizar el estudio de actividad biológica para extractos de flores y raíz.
- Continuar con el estudio de actividad biológica para los extractos de hexano, hexano-acetona, acetona.

# PARTE VII

# ANEXOS



# ANEXO I

## Equipos e instrumentos utilizados

Para el análisis de los alcaloides, manitol y el 2,5-dimetiltritriacontano se utilizaron los siguientes equipos de espectroscopía:

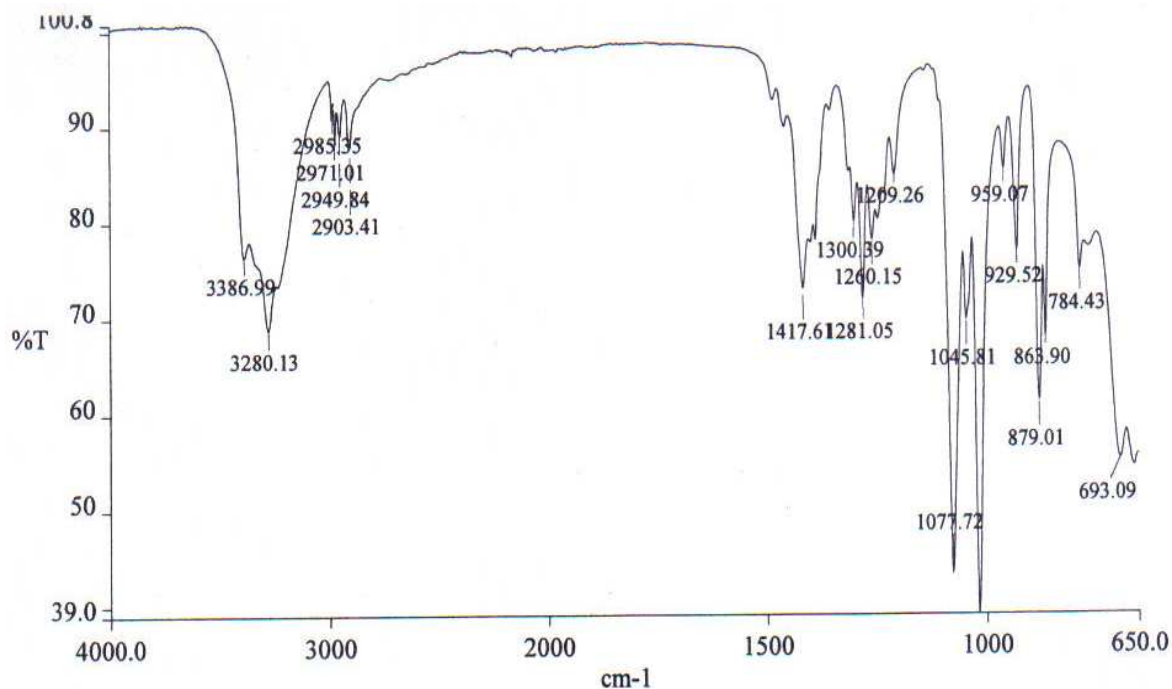
- Equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) marca Varian, modelo Mercury 200 a 2000 MHz para los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ .
- Equipo FTIR Spectrum One Perkin Elmer para los espectros de infrarrojo los cuales se leyeron en pastillas de KBr.
- Equipo Hp 5973 MSD para los espectros de cromatografía de gases-masas por inserción directa.

La determinación del punto de fusión no corregido de los sólidos obtenidos se realizó en un Fisher Johns marca Fischer Scientific, modelo Fisher Johns Melting Point Apparatus. El índice de refracción se realizó en un refractómetro Abbe 2WAJ con precisión de  $\pm 0.001$ . La densidad obtenida durante la preparación del medio marino artificial utilizando sal marina se determinó con el uso de un hidrómetro flotador marca Salimeter Aquamedic, con rango de medida entre 1.018 a 1.028 y exactitud de  $\pm 0.00025$ . Para el revelado de las placas cromatográficas se utilizó una lámpara ultravioleta UVSL 25.

## Espectros

Los espectros realizados al alcaloide(s), manitol( $\text{C}_5$ ) y el 2,5-dimetiltritriacotano ( $\text{A}_1$ ) se muestran a continuación:

## E1. Espectro de IR del compuesto C<sub>5</sub>



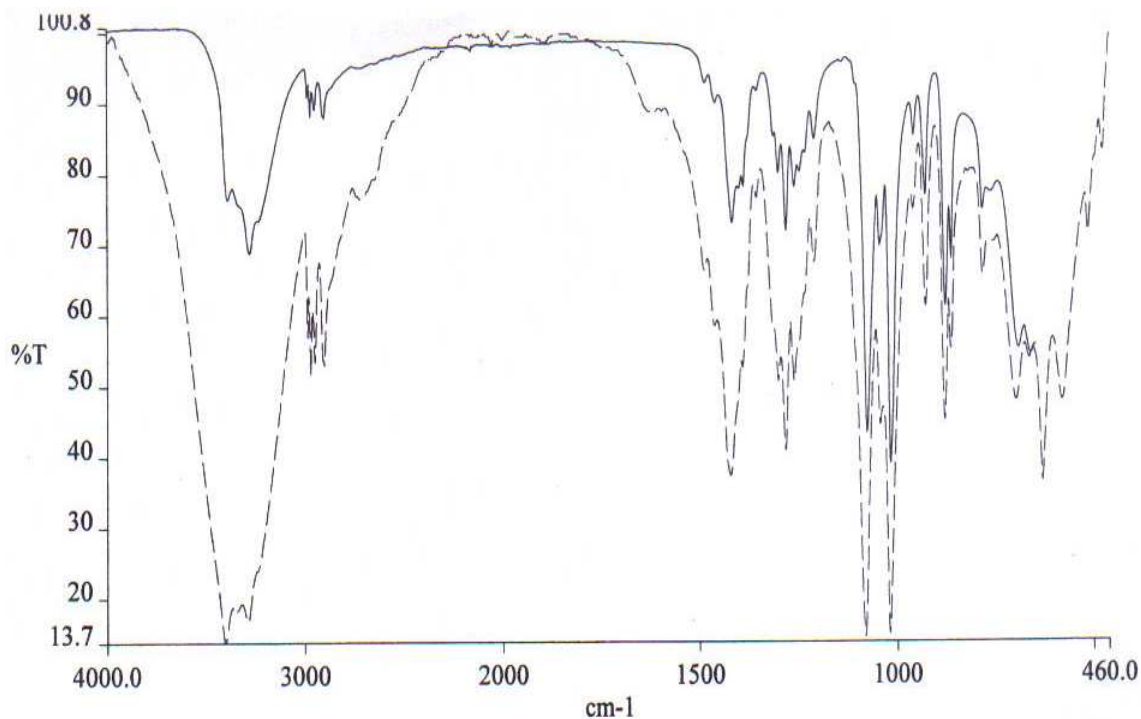
MAC C5.pk

MACC5~1.SP 3351 4000.00 650.00 38.98 100.77 4.00 %T 4 1.50

REF 4000 100.41 2000 97.89 600

3386.99	76.41	3280.13	68.86	2985.35	90.72	2971.01	88.17	2949.84	89.04
2903.41	87.84	1417.61	72.95	1300.39	79.97	1281.05	71.88	1260.15	78.04
1209.26	84.76	1077.72	43.26	1045.81	69.67	1018.02	38.98	959.07	85.29
929.52	76.75	879.01	61.24	863.90	67.79	784.43	74.76	693.09	55.16

## E2. Espectro de IR del compuesto C<sub>5</sub> (-) y manitol (--)

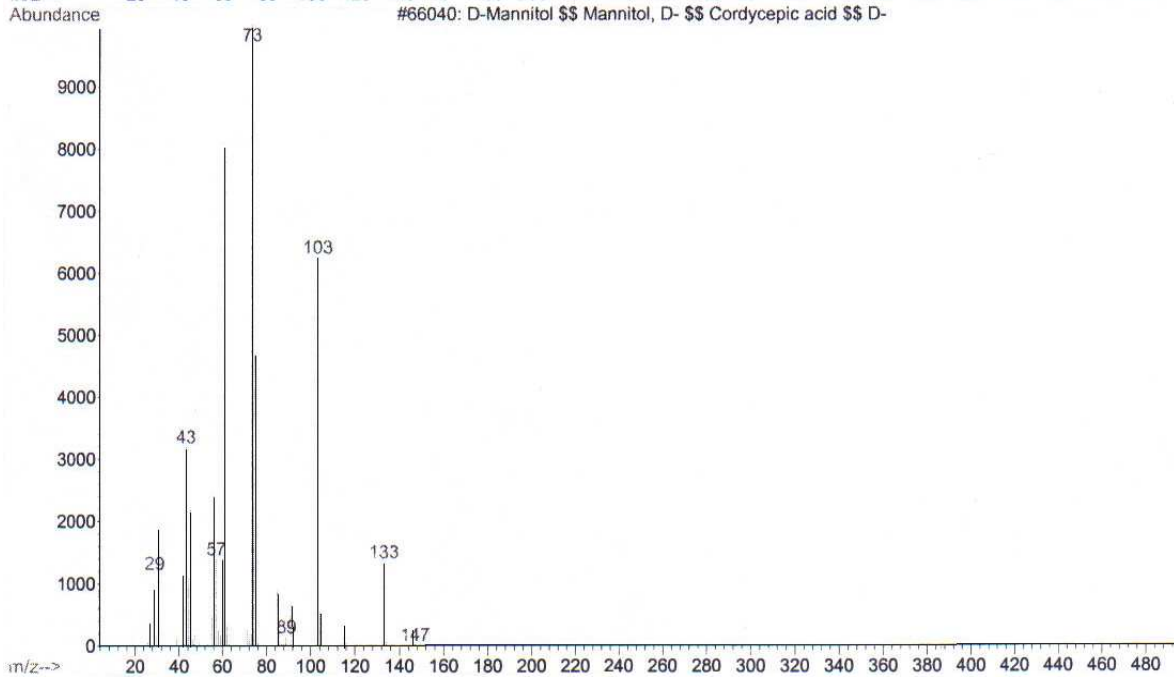
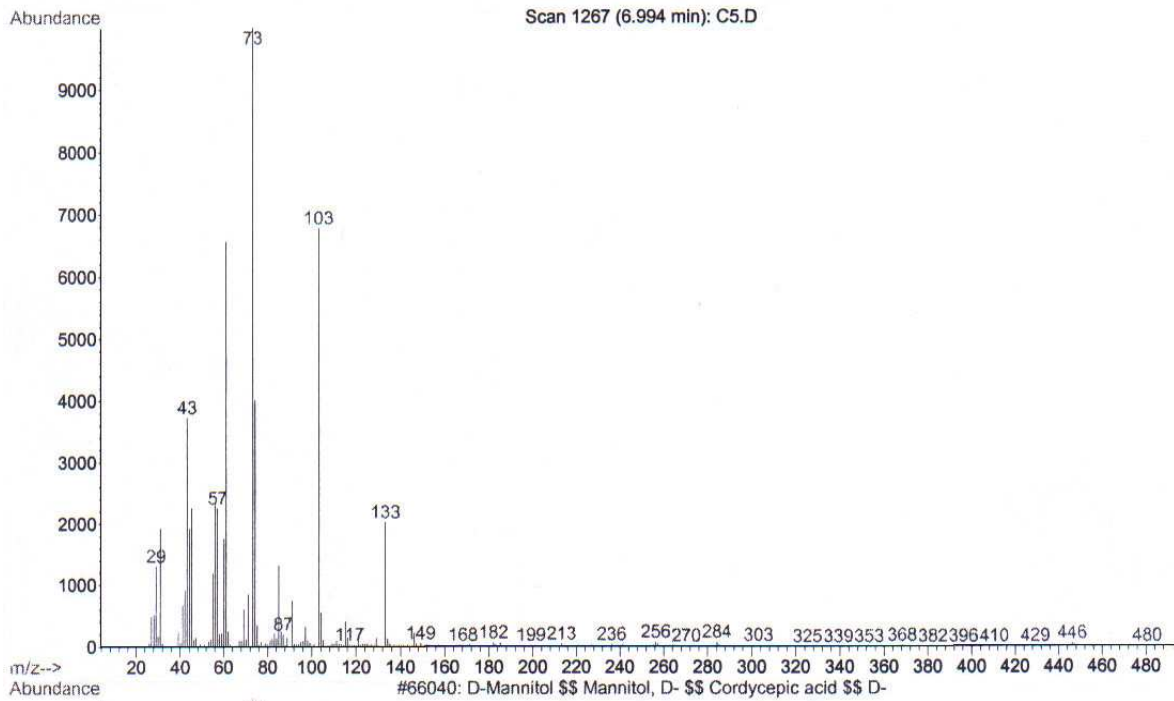


MAC C5.sp / Spectrum.lst Euclidean Search Hit List

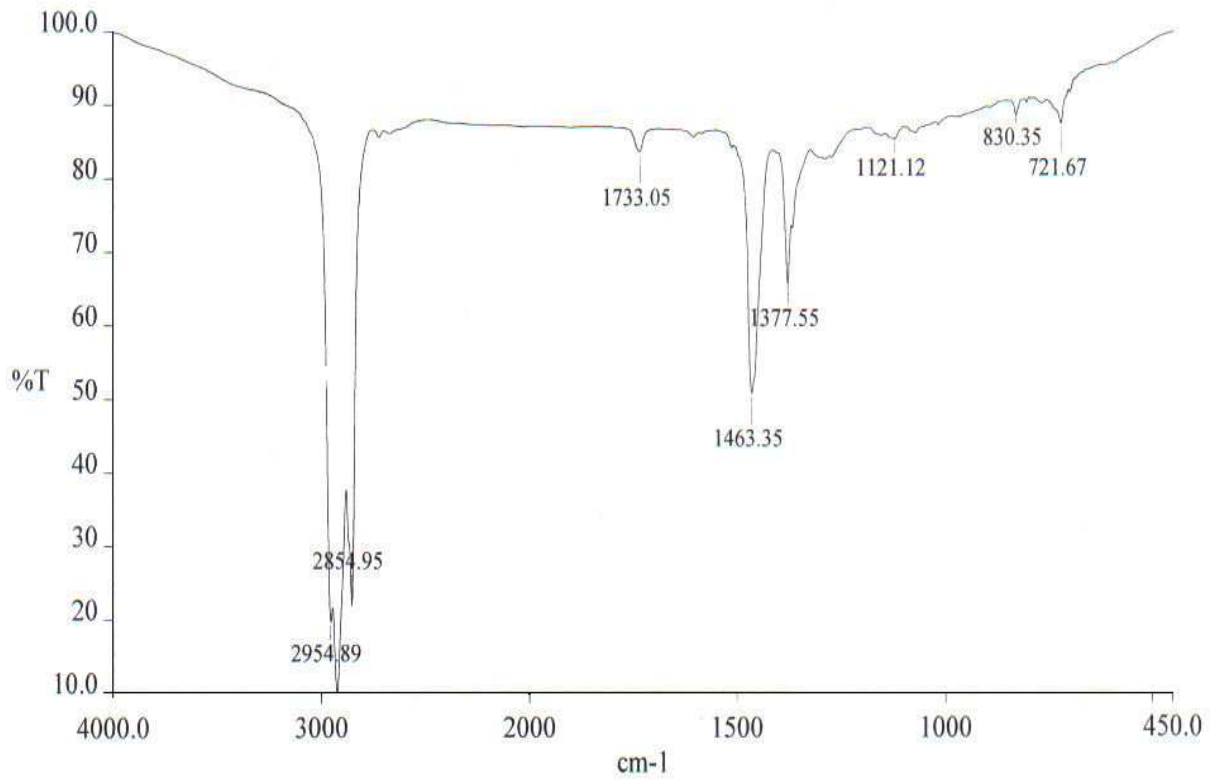
0.855 OR0660 OR0660.DX MANNITOL  
0.743 IC044A MANNITOL -REF:IDDA-  
0.723 TD2495 TD2505.DX MANNITOL NUJOL NACL; FLUKA AG LOT 240  
0.713 TD1006 TD1011.DX HEROIN HCL + MANNITOL (1:1); NUJOL NACL  
0.677 TD2725 TD2739.DX EPHEDRINE HCL + MANNITOL NUJOL; NACL  
0.619 TD0688 TD0691.DX XYLOSE + FRUCTOSE + MANNITOL; (1:1:1) NU  
0.609 PA0556 PA0564.DX FERRO STABILIZER 765 A  
0.596 TD0622 TD0625.DX MANNITE CONOSCENTI NUJOL NACL;  
0.569 VP5084 VP5087.DX BIS-2-CHLOROETHYL-2-CHLOROETHYLPHOSI  
0.560 TD2620 TD2634.DX COCAINE HCL:MANNITOL (1:1) NUJOL; NACL

### E3. Espectro de masas del compuesto C<sub>5</sub>

File : C:\HPCHEM\1\DATA\C5.D  
Operator : TM  
Acquired : 2 Jan 2008 13:19 using AcqMethod MADG\_01  
Instrument : GC/MS Ins  
Sample Name :  
Misc Info :  
Vial Number: 1



#### E4. Espectro de IR del compuesto A<sub>1</sub>



MAC F-21.pk

MACF-2~1.SP 3551 4000.00 450.00 10.00 100.00 4.00 %T 1 1.50

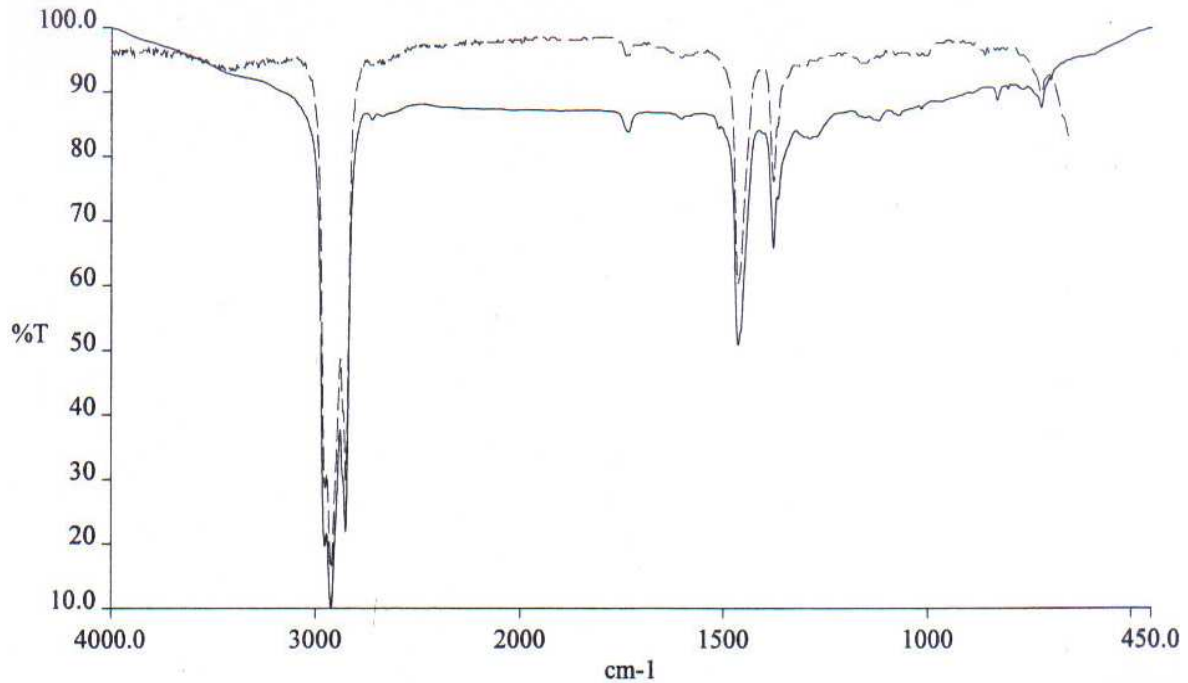
REF 4000 99.93 2000 87.19 600

2954.89 19.64 2924.91 9.99 2854.95 22.02 1733.05 83.73 1463.35 50.87

1377.55 65.82 1121.12 85.52 830.35 88.71 721.67 87.59



**E5. Espectro de IR del compuesto A<sub>1</sub> (-) y de diferentes compuestos (--)**

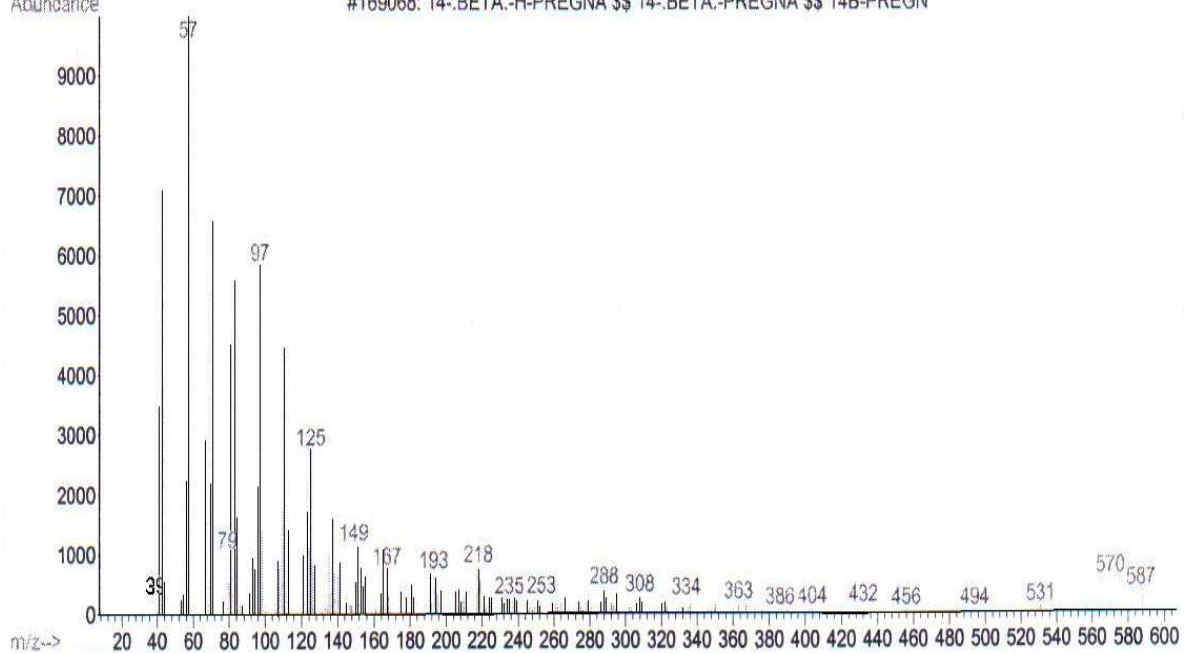
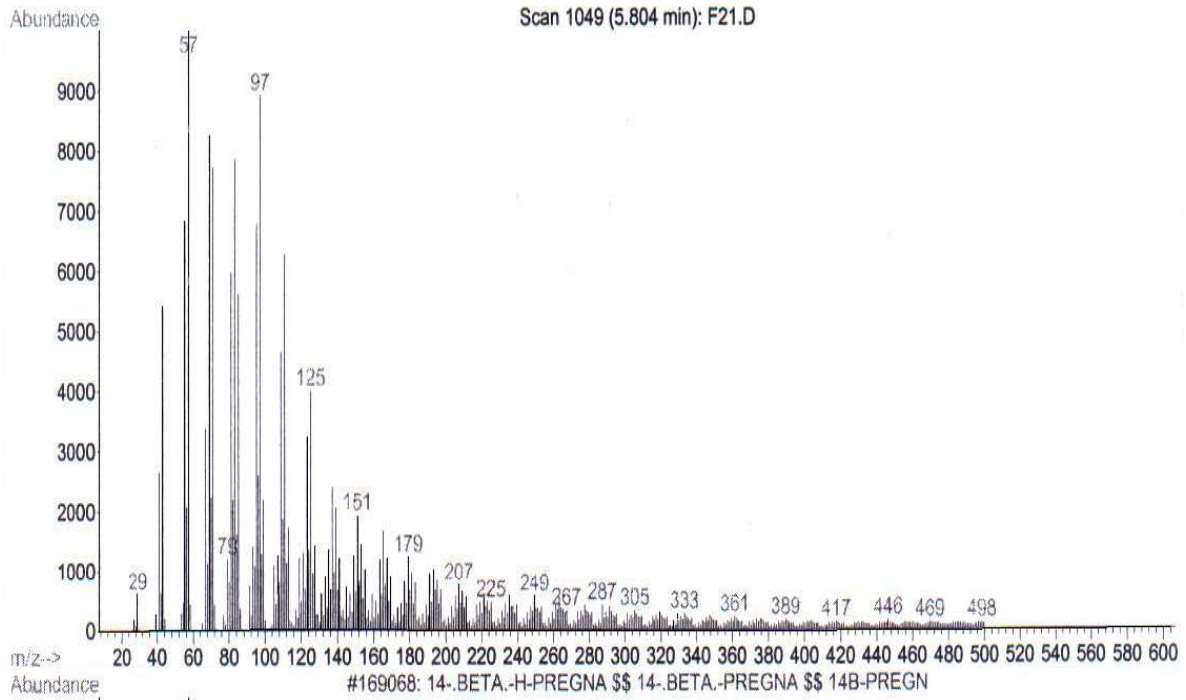


MAC F-21.sp / Spectrum.lst Euclidean Search Hit List

- 0.992 TD0547 TD0549.DX SHELL X-100 10W30 MOTOR OIL; FILM NACL
- 0.989 LU255A SHELL TELLUS LUBRICANT
- 0.987 LU260A MOBIL GEAR OIL
- 0.986 LU259A IRONSIDES TEH/EP2 LUBRICANT
- 0.985 LU247B LUBRICANT ADDITIVE, ENGINE SEALANT
- 0.984 LU258A GULF HARMONY HYDRAULIC OIL
- 0.983 PA0125 PA0125.DX NAPHTHENIC BASE OIL
- 0.983 LU236A GEAR OIL, HYPOID TYPE SAE 80W/90
- 0.983 LU261A SPARTAN GEAR OIL
- 0.982 PA0126 PA0126.DX AROMATIC BASE OIL

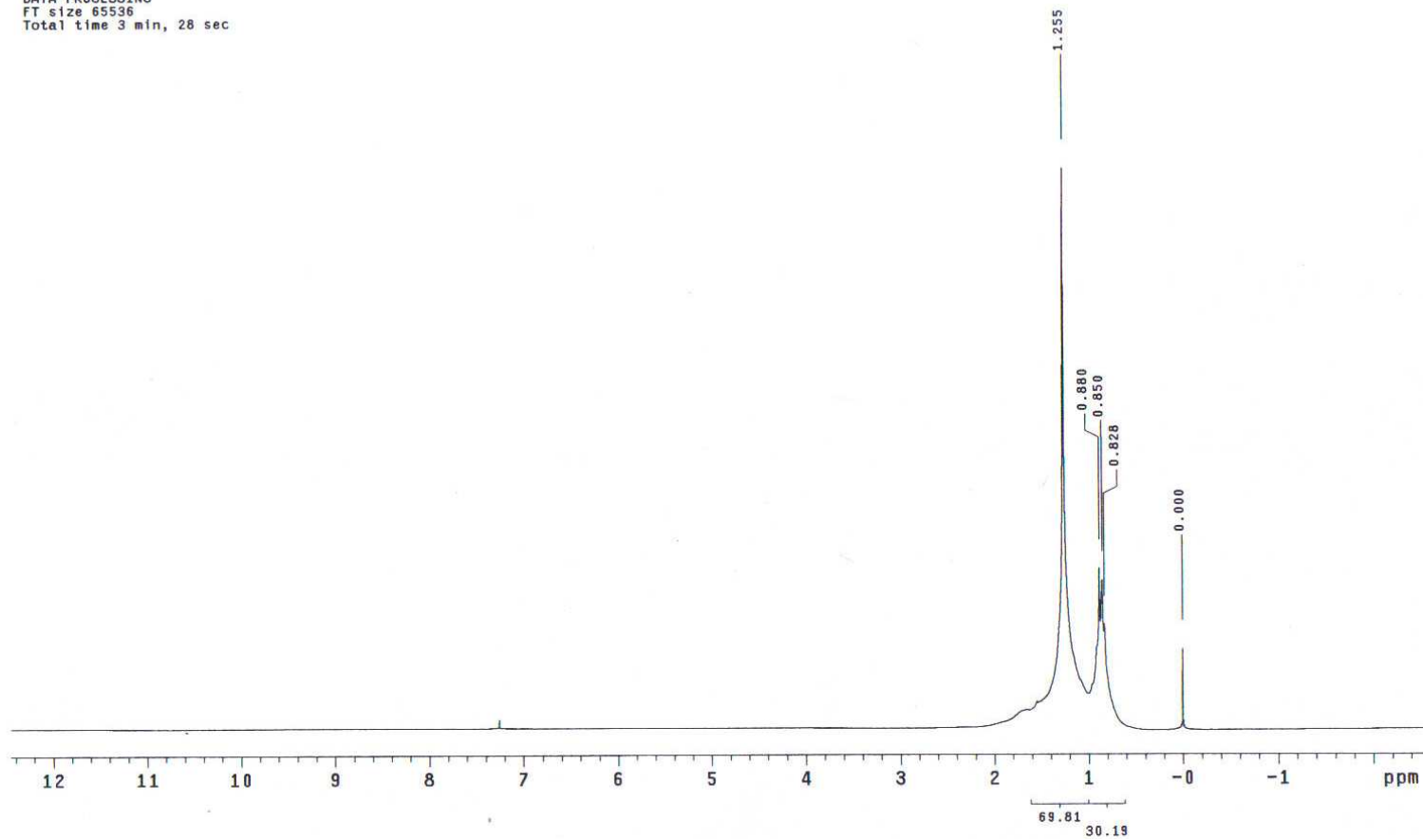
## E6. Espectro de masas del compuesto A<sub>1</sub>

Library Searched : C:\DATABASE\WILEY275.L  
Quality : 76  
ID : 14-.BETA.-H-PREGNA \$\$ 14-.BETA.-PREGNA \$\$ 14B-PREGNANE



# E7. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto A<sub>1</sub>

Cuphea a1 16Mayo2008  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"  
  
Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 40.0 degrees  
Acq. time 1.994 sec  
Width 3000.3 Hz  
64 repetitions  
OBSERVE H1, 199.9750830 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 65536  
Total time 3 min, 28 sec



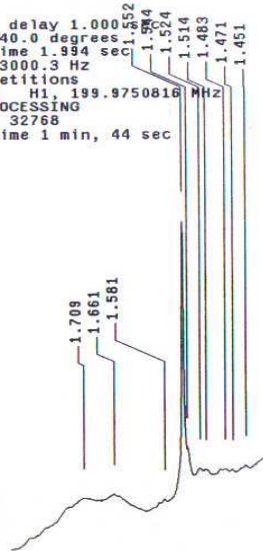
# E8. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto A<sub>1</sub>

A-1 Cuphea CDCL3 4Junio2007

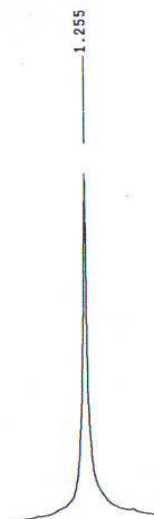
Pulse Sequence: s2pu1

Solvent: CDC13  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"

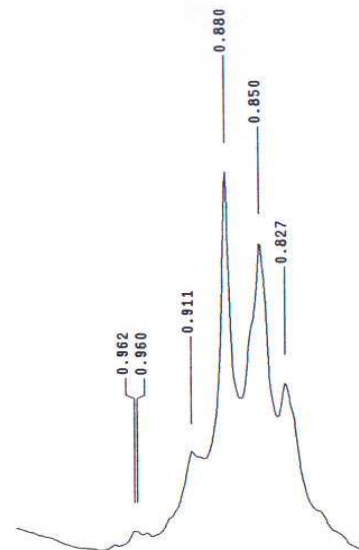
Relax. delay 1.000  
Pulse 40.0 degrees  
Acq. time 1.994 sec  
Width 3000.3 Hz  
32 repetitions  
OBSERVE H1, 199.9750816 MHz  
DATA PROCESSING  
FT size 32768  
Total time 1 min, 44 sec



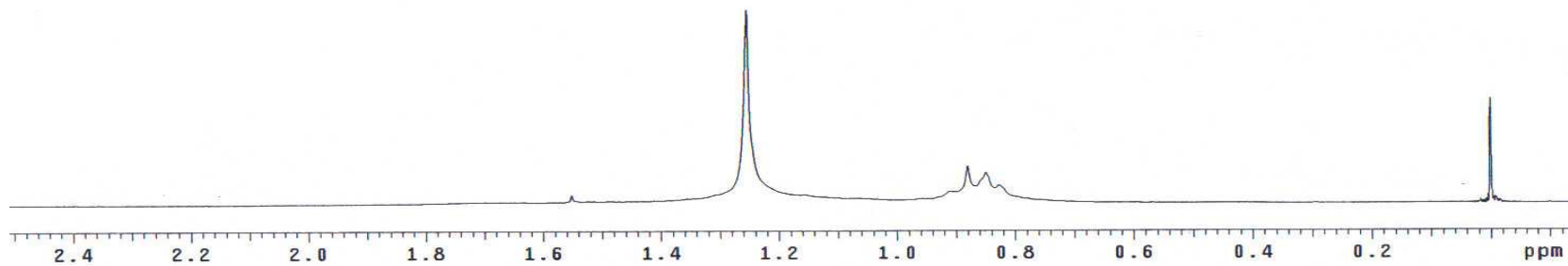
1.75 1.60 ppm



1.32 ppm

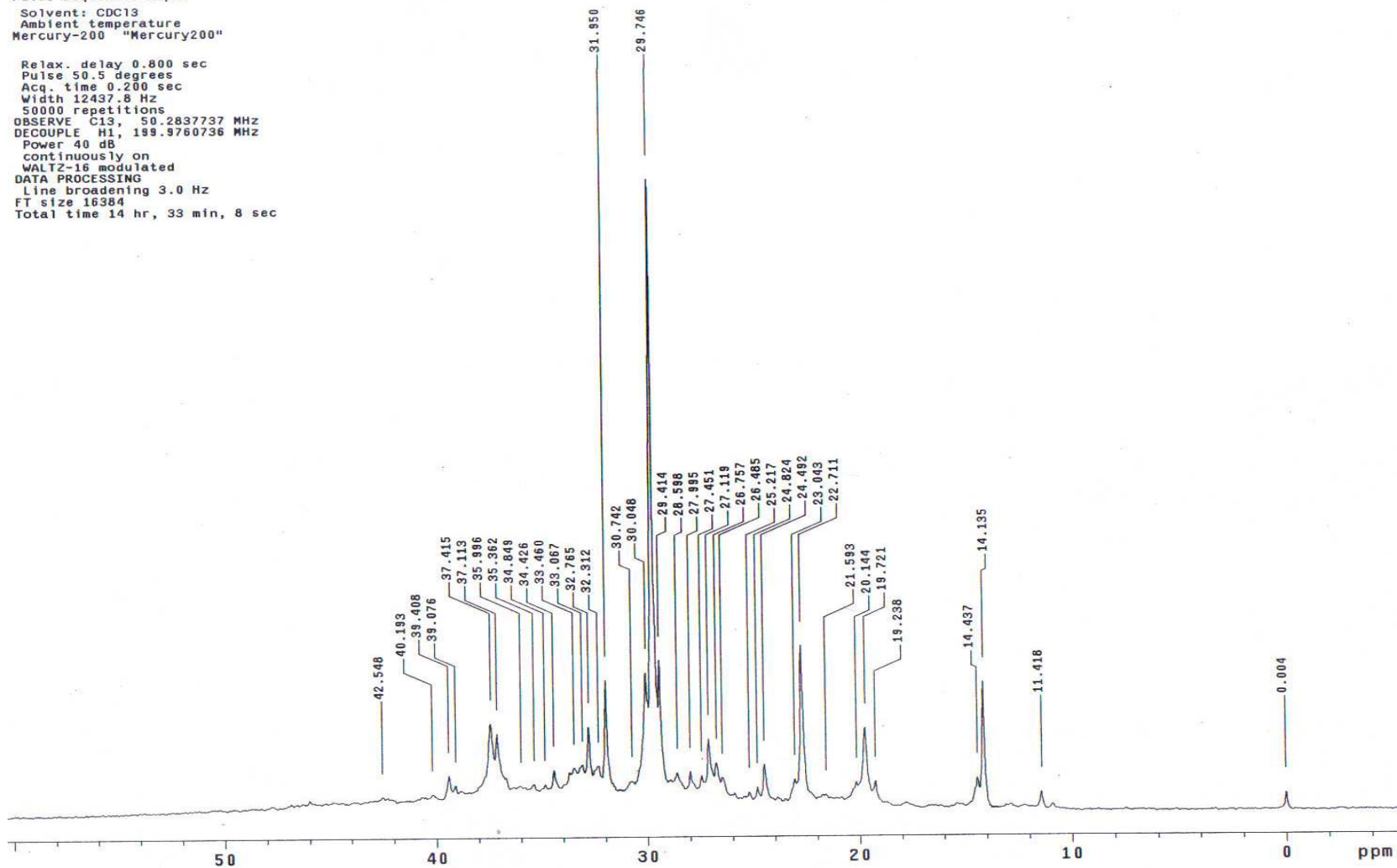


1.00 0.92 0.84 ppm

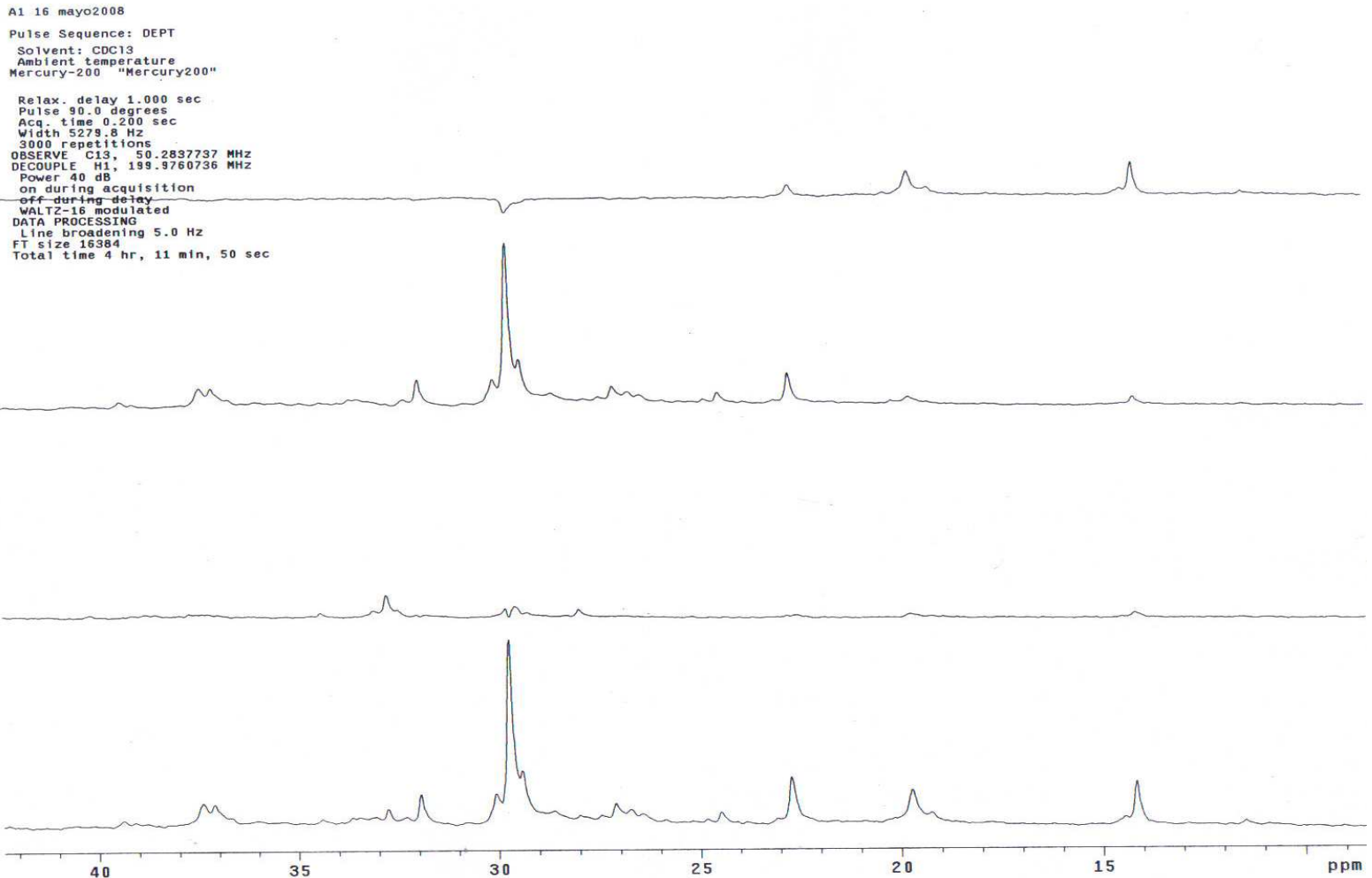


# E9. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto A<sub>1</sub>

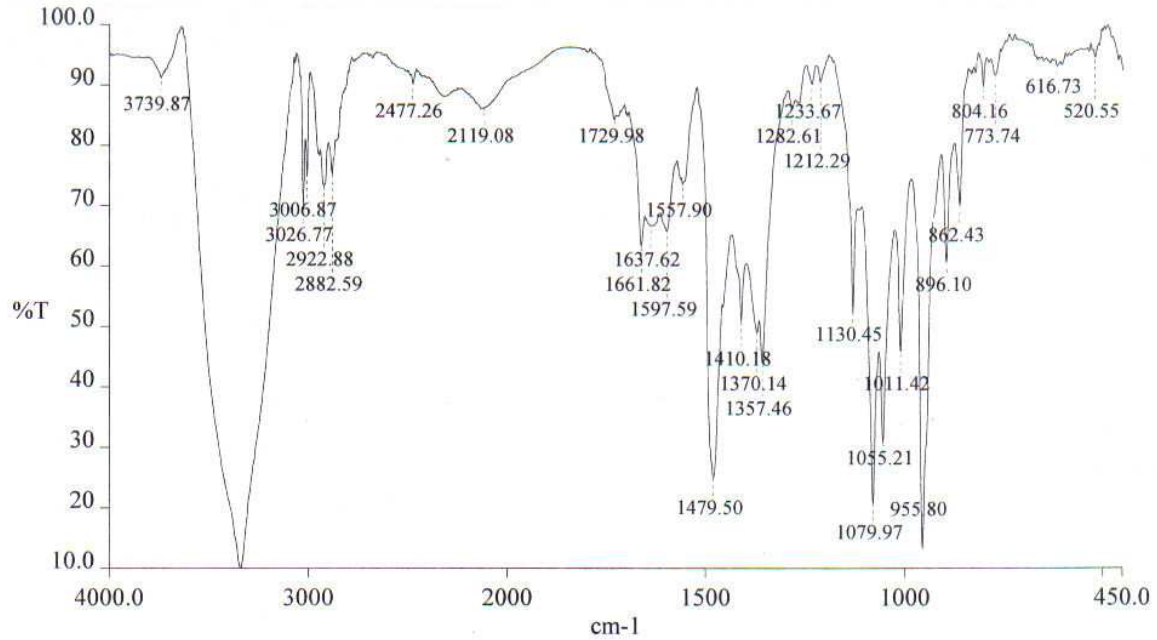
A1 16 mayo2008  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: CDCl<sub>3</sub>  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"  
Relax. delay 0.800 sec  
Pulse 50.5 degrees  
Acq. time 0.200 sec  
Width 12437.8 Hz  
50000 repetitions  
OBSERVE C13, 50.2837737 MHz  
DECOUPLE H1, 199.9760736 MHz  
Power 40 dB  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 3.0 Hz  
FT size 16384  
Total time 14 hr, 33 min, 8 sec



# E10. Espectro DEPT del compuesto A<sub>1</sub>



## E11. Espectro de IR del alcaloide(s)



MAC C3.pk

MACC3~1.SP 3551 4000.00 450.00 10.00 100.00 4.00 %T 1 1.50

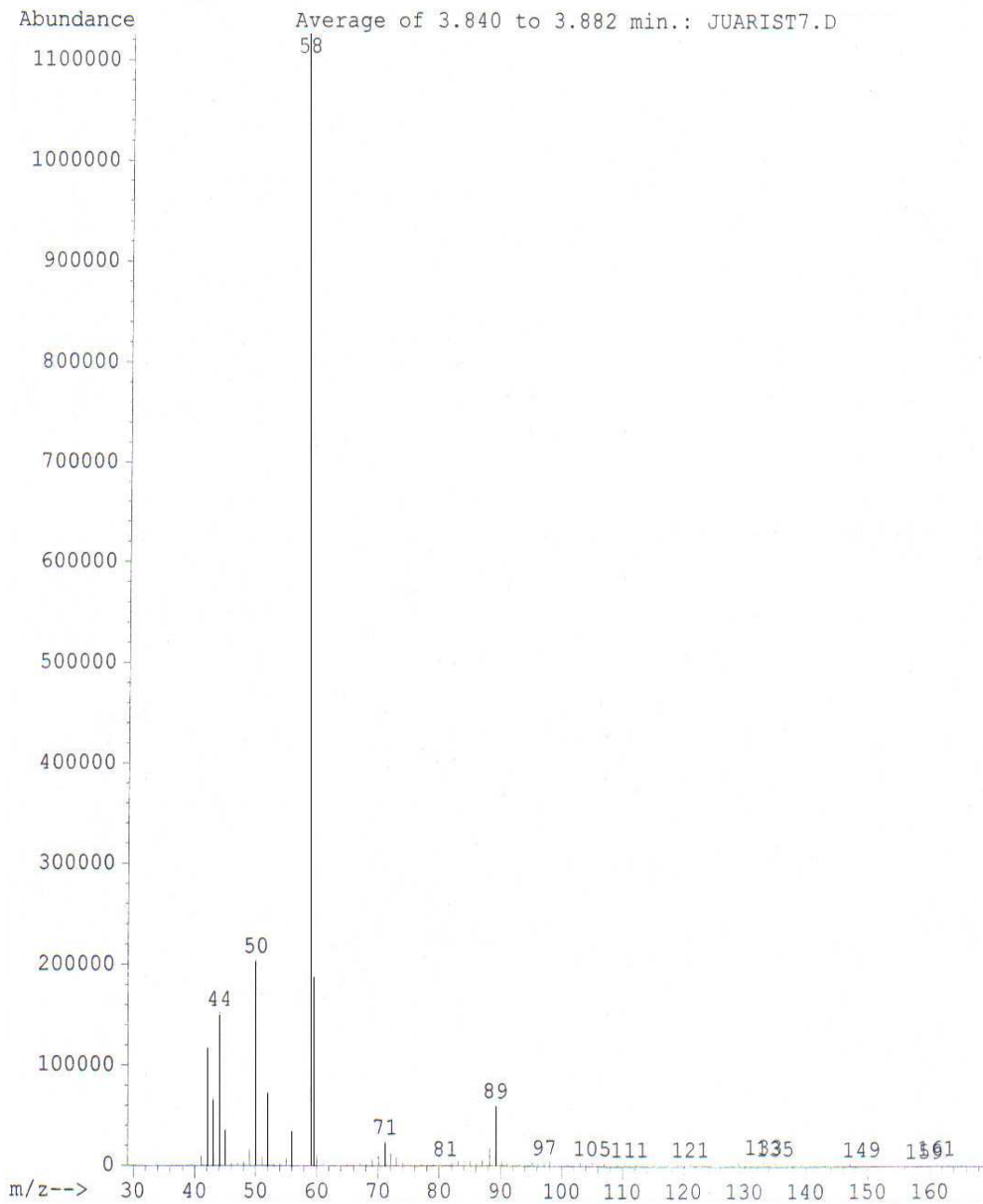
REF 4000 94.66 2000 90.83 600

3739.87	91.19	3339.56	9.99	3026.77	70.45	3006.87	74.88	2922.88	73.35
2882.59	75.29	2477.26	90.32	2119.08	86.10	1729.98	84.31	1661.82	63.39
1637.62	66.66	1597.59	65.75	1557.90	73.58	1479.50	24.94	1410.18	50.93
1370.14	49.02	1357.46	44.08	1282.61	86.18	1233.67	90.17	1212.29	90.65
1130.45	52.03	1079.97	20.58	1055.21	30.87	1011.42	45.91	955.80	13.43
896.10	60.61	862.43	70.13	804.16	89.88	773.74	91.65	616.73	93.14
520.55	94.68								



## E12. Espectro de masas del alcaloide(s)

File : C:\HPCHEM\1\DATA\JUARISTI\JUARIST7.D  
Operator : Erika  
Acquired : 12 Mar 109 9:47 am using AcqMethod DIP  
Instrument : 5989 - In  
Sample Name: C3  
Misc Info : DIP 20 eV  
Vial Number: 1

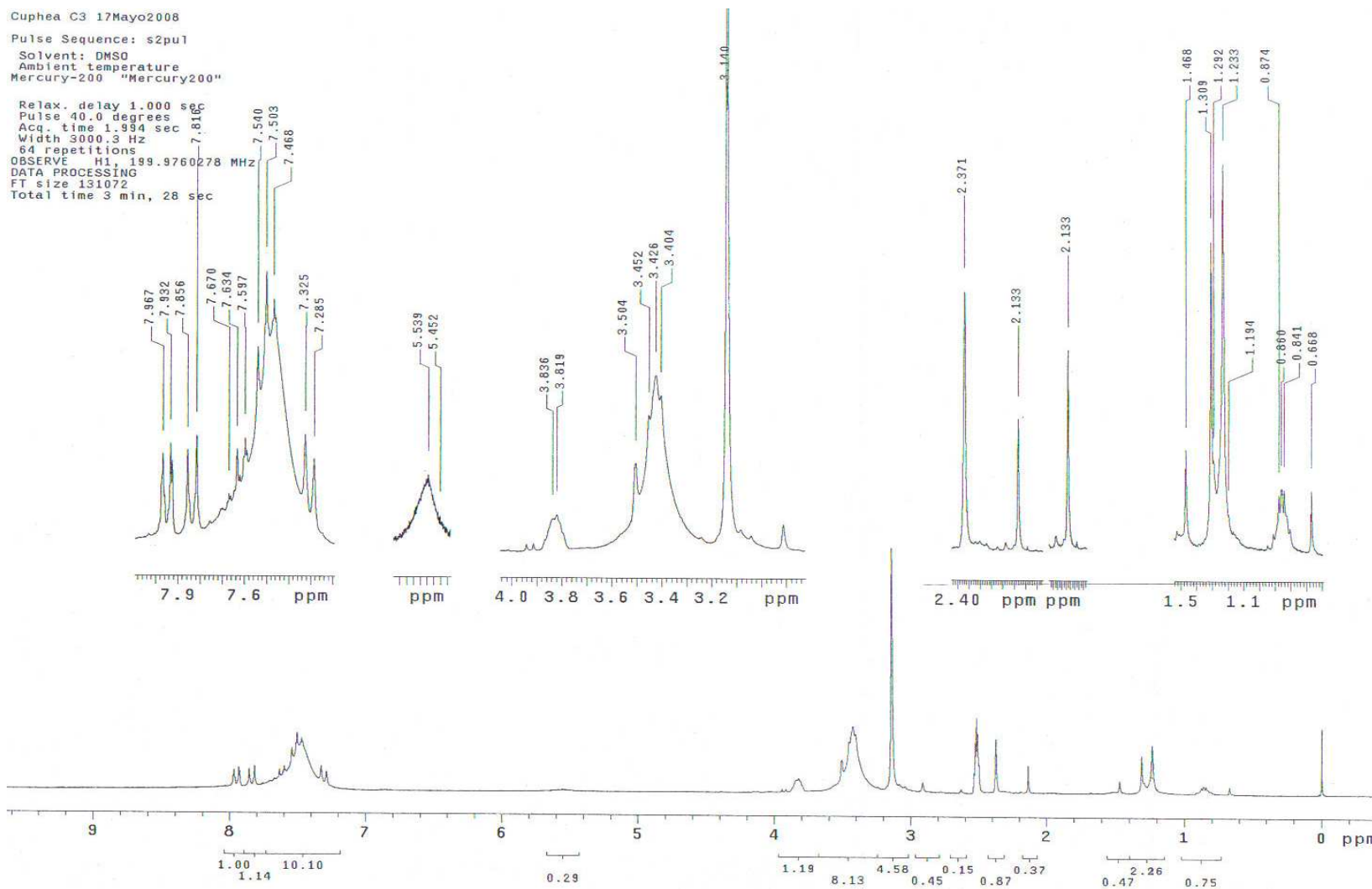




# E13. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H del alcaloide(s)

Cuphea C3 17Mayo2008  
 Pulse Sequence: s2pu1  
 Solvent: DMSO  
 Ambient temperature  
 Mercury-200 "Mercury200"

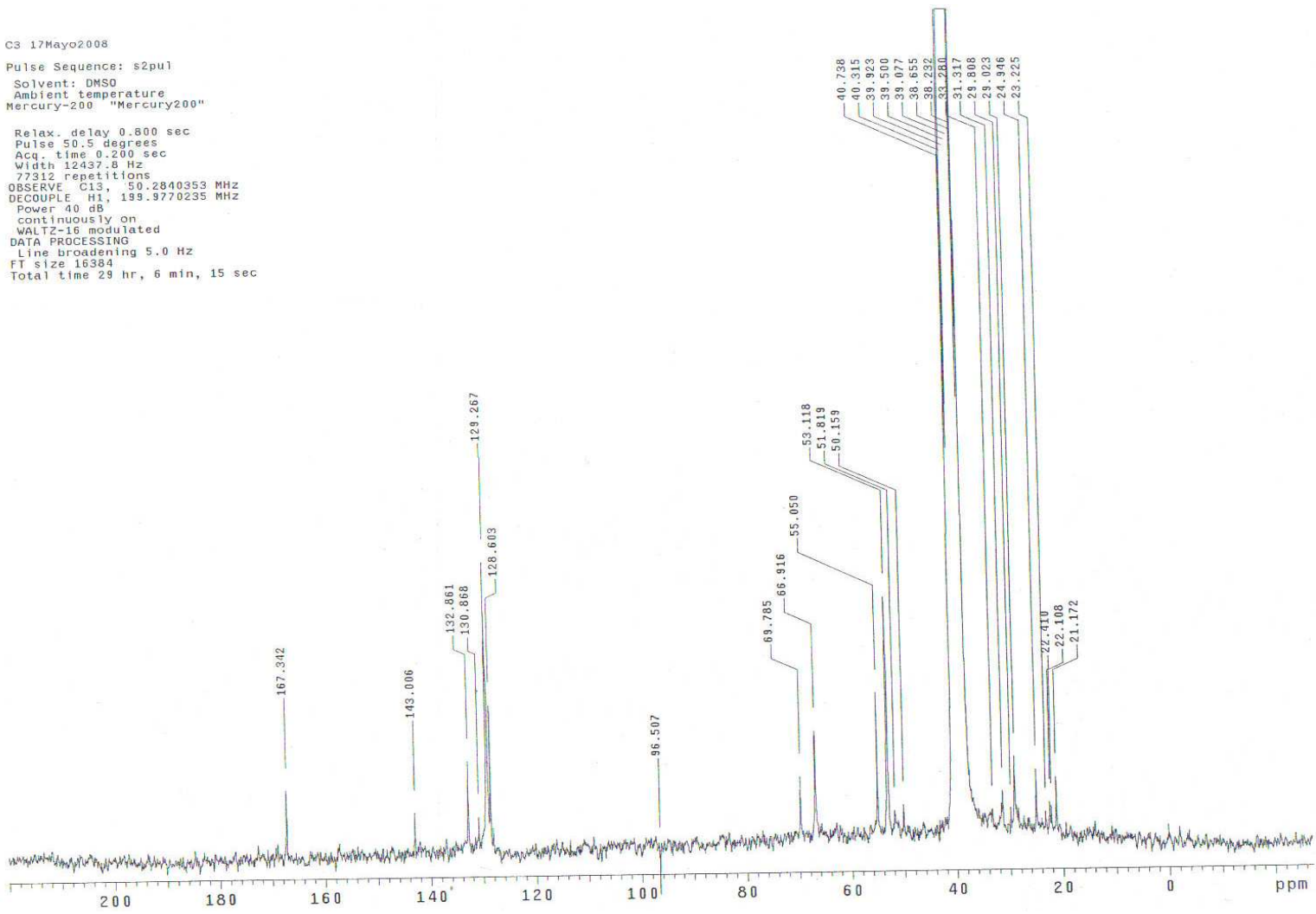
Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 40.0 degrees  
 Acq. time 1.994 sec  
 Width 3000.3 Hz  
 64 repetitions  
 OBSERVE H1 199.9760278 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 131072  
 Total time 3 min, 28 sec



# E14. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C del alcaloide(s)

CS 17Mayo2008  
Pulse Sequence: s2pu1  
Solvent: DMSO  
Ambient temperature  
Mercury-200 "Mercury200"

Relax. delay 0.800 sec.  
Pulse 50.5 degrees  
Acq. time 0.200 sec  
Width 12437.8 Hz  
77312 repetitions  
OBSERVE C13, 50.2840353 MHz  
DECOUPLE H1, 199.9770235 MHz  
Power 40 dB  
continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 5.0 Hz  
FT size 16384  
Total time 29 hr, 6 min, 15 sec



## ANEXO II

### Glosario

**BSLT:** brine shrimp lethality test (Prueba de toxicidad para la *Artemia salina*)

**CCF:** cromatografía en capa fina

**CGM:** cromatografía de gases-masas

**D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>6</sub>, D<sub>7</sub>, D<sub>8</sub>:** desecho 1,2,3,4,5,6,7 y 8

**ECEH:** *Escherichia coli* Enterohemorrágica

**ED<sub>50</sub> :** dosis efectiva media

**IR:** infrarrojo

**LC<sub>50</sub>:** concentración letal media crónica

**LD<sub>50</sub>:** dosis letal media

**MIC:** concentración mínima inhibitoria

**MT:** medicina tradicional

**MTM:** medicina tradicional mexicana

**pp:** precipitado

**RMN <sup>13</sup>C:** resonancia magnética nuclear de Carbono<sup>13</sup>

**RMN <sup>1</sup>H:** resonancia magnética nuclear de Hidrógeno<sup>1</sup>

## ANEXO III

### Preparación de reactivos

- **Reactivo de ácido silicotúngstico:** 12 g de ácido se aforan con agua a 100 mL.
- **Reactivo de agua de bromo:** solución saturada de bromo.
- **Reactivo de benedict:** 17.3 g de citrato de sodio más 10 g de carbonato de sodio anhidro, se mezclan con 60 mL de agua destilada. La mezcla se añade lentamente y con agitación a una mezcla preparada previamente con 1.73 g de sulfato de cobre pentahidratado y 15 mL de agua. Se afora a 100 mL.
- **Reactivo de drangendorff:** disolver 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ác. nítrico al 30 % y 27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la solución y se afora a 100 mL con agua.
- **Reactivo de fehling:** sol. "A": 3.5 g de sulfato de cobre pentahidratado se aforan a 50 mL Sol. "B": 17.5 g de tartrato de sodio y potasio más 5 g de hidróxido de sodio se aforan a 50 mL.
- **Reactivo de FeCl<sub>3</sub>:** disolver 1.25 g de FeCl<sub>3</sub> en 25 mL de agua y aforar a 50 mL con etanol.
- **Reactivo de gelatina:** 1 g de gelatina pura se hidrata con 100 mL de agua.
- **Reactivo de grignard:** Aforar 1 g de carbonato de calcio y 100 mg de ác. pícrico a 100 mL.
- **Reactivo de hager:** sol. saturada de ác. pícrico en agua.

- **Reactivo de mayer:** disolver 1.36 g de bicloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se mezclan las dos soluciones y se aforan a 100 mL.
- **Reactivo de rosenthaler:** diluir 1 g de vainillina en 100 mL de etanol
- **Reactivo de wagner:** disolver 1.27 g de yodo resublimado y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; aforar a 100 mL con agua destilada.
- **Reactivo de reineckato:** Disolver 1 g de reineckato de amonio en 100 mL de agua durante 12 horas en la obscuridad.

# PARTE VIII

# REFERENCIAS



- A.Graham, S., Hirsinger, F. and Röbbelen, G. (1981). Fatty acids of *Cuphea* (*Lythraceae*) seed lipids and their systematic significance. *American Journal of Botany*, 68 (7), 909-911.
- Alcalde, J.[et.al.]. (2002). Retrato íntimo de las alternativas más usadas. La gran familia, el herbolario químico. *Muy interesante*, (3), 16-20.
- Argueta Villamar, A. [et.al.]. Hierba del cáncer. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II*. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Barba Chávez, J.M. (1997). Análisis fitoquímico preliminar. *Introducción al análisis de los productos naturales. Laboratorio de fitoquímica*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Berkov, S. (2001). Size and alkaloid content of seed in induced autotetraploids of *Datura innoxia*, *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*. *Pharmaceutical Biology*, 39 (5), 329-331.
- Bruneton, J. 1991. Alcaloides, drogas con flavonoides, drogas con taninos, triterpenos y esteroides. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. España: Acribia, S.A.
- Emes Boronda, M. [et.al.]. (1994). Hierba del cáncer. *Flora medicinal indígena de México, Tomo II*. México: Instituto Nacional Indigenista.
- Kuklinski, C. (2000). Saponinas. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Ediciones Omega,S.A.
- M. Colegate, S. and J. Molyneux, R. (1993). Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. *Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination*. USA: CRC Press.
- Maldoni, B. (1991). Alkaloids: isolation and purification. *Journal of Chemical Education*, 68 (8), 700-703.

- Marquez Alonso, C. [et.al.]. (1999). Hierba del cáncer. *Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica*. México: UNAM.
- Martínez, M. (1979). Hierba del cáncer. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de cultura económica.
- Mata Essayag, R. (2000). Curso teórico de farmacognosia. 2a. version. México: UNAM.
- Mendoza Castelan, G. [et.al.]. (1999). Cuadro resumen No. 1. Plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado de Sonora, D.F., ordenadas por nombre común. *Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el mercado de Sonora*. México: Universidad Nacional Autónoma Chapingo.
- Morales Delgado, M.A. [et.al.]. (1989). Terpenos, Alcaloides. *Manual de prácticas de laboratorio. Productos Naturales QFB. Depto. de Ingeniería y Tecnología. Tecnología Farmacéutica*. México: FESC-UNAM.
- Práctica 4. Cromatografía de intercambio iónico. *Manual de prácticas de laboratorio de análisis V. (Q e IQ)*, 36-37, México: FESC UNAM.
- Pretsch, E. [et.al.]. (2002). Espectrometría de masas. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. España: Masson, S.A.
- R. M., S. and Bassler G., C. (1991). Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc.
- Roath, W.W., Widrlechner, M.P., Kleiman R. Variability in *Cuphea viscosissima* Jacq. collected in east-central United States. *Industrial Crops and Products an international Journal*, 3, 217-223.
- Sakagami, Y. [et.al.]. (2001). Inhibitory effect of plant extracts on production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Health Science*, 47 (5), 473-475.



- Sanabria Galindo, A., Isabel López, S. y Gualdrón, R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista colombiana de ciencias químicas farmacéuticas*, 26, 15-19.
- Scior, T. (2007). La planta medicinal: ¿Una auténtica planta química?. Parte I. *Informacéutico*, 14 (6), 18-24.
- Tapia, U. (1988). Hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*). *Cura por las plantas medicinales*. México: Editores mexicanos unidos.
- Valencia Ortiz, C. (1995). Carbohidratos, glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiotónicos. *Fundamentos de fitoquímica*. México: Trillas.
- Vega Avila, E. [et.al.]. (2004). Citotoxic activity of *Cuphea aequipetala*. *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 47, 129-133.
- Vega Avila, E. (2005). Actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones con actividad citotóxica. *Tesis doctoral en ciencias biológicas: Estudio de Cuphea aequipetala Cav. sobre la proliferación in vitro de células humanas transformadas*. México: UAM