



## INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades malignas durante siglos, por sus propiedades curativas entre ellas tenemos:

*Citrus aurantifolia* (limón ácido), es beneficioso para combatir las diarreas, los vértigos, vahídos y mareos . Es antiescorbútico, astringente, disentería, afecciones nerviosas, palpitaciones del corazón, cáncer y sífilis. (8)

La infusión de la hoja de *Catharanthus roseus* (mariposa), se emplea en forma de gargarismos para casos de laringitis y faringitis, tiene propiedades anticancerígenas y especialmente en el caso de la llamada enfermedad de Hodgkin, afectación maligna que ataca los ganglios. (10)

*Tabebuia rosea* (roble), cuya corteza se usa en México para enfermedades protozoarias, malaria y cáncer uterino; mientras que las hojas se emplean para contusiones. (9)

La corteza y semillas de *Pouteria sapota* (sapote), son usados en la caída del pelo y bajar la leche materna. La semilla machacada se usa para la disnea. La semilla presenta actividad antiinflamatoria , antitusiva, expectorante y preventivo del cáncer. (3)

Hoy en día, muchas drogas usadas por la medicina moderna son los principios activos de plantas medicinales, surgiendo de esta manera el siguiente estudio en el cual se evalúa el grado de citotoxicidad, a través de bioensayo de *Artemia salina* y la caracterización de alcaloides mediante reacciones de precipitación y cromatografía en capa fina, radicando aquí la importancia de nuestra investigación al determinar la actividad biológica y núcleos de alcaloides presentes en dichas plantas. Brindando así un aporte a las ciencias medicinales.



## OBJETIVOS

### General:

1. Evaluar el grado de citotoxicidad a través del bioensayo de *Artemia salina* en 4 especies vegetales : *Citrus aurantifolia* ( Limón ácido ), *Catharanthus roseus* ( Mariposa ), *Tabebuia rosea* ( Roble ), *Pouteria sapota* ( Sapote ), y caracterizar los alcaloides presentes en dichas plantas.

### Específicos:

1. Preparar diluciones de las fracciones (extracto crudo, éter de petróleo, acetato de etilo y cloroformo), a concentraciones de 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mg / ml y aplicarle el bioensayo de *Artemia salina*, determinando la DL<sub>50</sub> aguda, subaguda y crónica e indicar las fracciones más activas.
2. Realizar pruebas de coloración para la caracterización de alcaloides en cada una de las fracciones.
3. Proponer núcleos de alcaloides que brinden la actividad a las fracciones de las especies vegetales, a través de cromatografía de capa fina (TLC).



## ESPECIES VEGETALES

Nombre científico:	<i>Citrus aurantifolia</i>
Nombre común:	Limón, limón agrio, limón castillo, limón criollo, limón de castilla.
Familia:	Rutaceae.

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

*Citrus aurantifolia* es un arbolito frutal de 5-10m de largo, ramas irregulares, espinosas. Hojas ovales, 5-8cm de largo, siempre verde, crenadas, peciolo alado. Flores solitarias o en grupo, blancas, 2cm de largo fragantes. Frutos redondos 3-6cm de diámetro, verdes o amarillos, pulpa ácida amarillo-verdosa, 6-15 segmentos; semilla elíptica, suave.

### COMPOSICIÓN QUÍMICA

La hoja, cáscara y la flor del fruto son ricos en aceites esenciales que contienen derivados terpénicos (limoneno, linalol, felandreno, citronelal, citral, nerol, terpinol), principios amargos, flavonoides (hesperósido, citrina, diosmenina) y cumarinas (limetina, bergamotina). En las flores encontramos el alcaloide cafeína, en la hoja también hay alcaloides.

El pericarpio del fruto contiene además pectina, las semillas contienen el compuesto amargo limonina. La pulpa del fruto contiene azúcares, ácidos orgánicos (cátrico, ascórbico, málico) y flavonoides.



## PROPIEDADES CURATIVAS

El limón es una fruta asombrosa debido al gran número de propiedades curativas que posee, por lo que ha sido llamado "uno de los mayores regalos de la naturaleza". A pesar de su sabor ácido, el jugo del limón es un excelente neutralizador de la acidez de la sangre y depurativo, estimula la salud y combate numerosas enfermedades.

El jugo del fruto tiene un amplio uso medicinal, solo o en combinación. Por vía oral se usa para tratar afecciones respiratorias (amigdalitis, bronquitis, catarro, cefalea, gripe, inapetencia, neumonía, tos, resfrío), gastrointestinales (diarrea, disentería, es antiescorbútico, astringente, palpitations del corazón, arterioesclerosis, el cáncer, la tuberculosis y la sífilis, estomatitis, flatulencias, gastralgias, gastritis, fiebre tifoidea, náuseas, vómitos) fiebre, gonorrea, hepatitis, hipertensión, ictericia, paludismo, sarampión, reumatismo y neuralgia. El polvo del fruto disecado se usa para los mismos fines que el jugo.

Tópicamente se usa el jugo puro o diluido en lavados para tratar candidiasis, erisipela, escarlatina, exantema, heridas, herpes, infecciones, llagas, quemaduras y tiñas; en gargarismo para infecciones de la boca y garganta; el jugo o esencia en colirios se usa para conjuntivitis.

## INDICACIONES TERAPÉUTICAS

Por el amplio uso popular, abundante información farmacológica y la falta de toxicidad, está indicado su uso oral en el tratamiento de diversas afecciones tales como: fiebre, fragilidad capilar, gota, gripe, hemorroides, hiperacidez gástrica, hipertensión, reumatismo y várices. En el caso del jugo se recomienda beber 10-60ml de jugo del fruto fresco en ayuna, 3-10 gotas dos veces al día de esencia.

Para uso tópico puede usarse el jugo puro o diluido en compresas, lavados, colutorios, gargarismo, colirios, irrigaciones vaginales o instilaciones óticas en los casos de infecciones, inflamaciones o úlceras agudas y crónicas.



**Nombre científico:** *Catharanthus roseus*

**Nombres comunes:** Chatilla, chavelita, chichirica, ninfa, rosa roja, mauco, Flores Rosadas.

**Sinonimia:** *Ammocallis, rosea, vinca rosea, vinca speciosa.*

**Familia:** Apocynaceae.

**Floración:** En primavera aparecen las flores y duran hasta casi el final del otoño.

La pervinca de Madagascar, *Catharanthus roseus*, G. Don, se ha denominado de diversas maneras, como *Vinca rosea L.* y *Lochnera rosea (L.)* Reichenbach; es probablemente originaria de Madagascar, pero en la actualidad está extendida en las regiones cálidas y se cultiva mucho como planta ornamental. Crece profusamente en el sur de Florida. Los abastecimientos comerciales de la droga se obtienen, tanto de plantas espontáneas como de las cultivadas en diversas partes, entre ellas África, India, Tailandia, Taiwán, este de Europa y Austria.

## DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El *Catharanthus roseus* es semiarbusto, de 40-80cm de altura, leñoso en la base. Las hojas son opuestas, ablongas, con base aguda y peciolada, ápice redondeado o mucronado y margen entero. Las flores recuerdan por su forma a las de la pervinca común y son de color violeta, rosa y blancas con un ribete rojo. El fruto es un folículo divergente. Se estima que las plantas tetraploides crecen más vigorosas y con flores mayores que las diploides. Las flores son planas compuestas por 5 pétalos que nacen en el extremo de los tallos.



## HISTORIA

Aunque la planta gozó de cierta reputación en medicina popular para el tratamiento de la diabetes, los modernos investigadores no han logrado confirmar tal propiedad. No obstante, investigadores canadienses descubrieron durante los años 1955-1960 que los extractos de las hojas producían leucopenia en las ratas. Estas observaciones llevaron a los investigadores de Eli Lilly y Cía a emprender una investigación fitoquímica intensiva de la planta con vistas al aislamiento de componentes de valor en la terapéutica del cáncer. Seis alcaloides se mostraron activos a este respecto y en la actualidad se dispone de dos de ellos a escala comercial.

## COMPONENTES QUÍMICOS:

A partir de *C. roseus* se han aislados hasta la fecha unos 90 alcaloides; algunos, como ajmalicina, lochnerina, serpentina y tetrahydro-alstonina, existentes en otros géneros de la familia. De especial interés es un grupo de unos 20 alcaloides dímeros, que comprende los que poseen actividad antineoplásica, entre ellos leurocristina (vincristina) y vincalucoblastina (vinblastina). La vinblastina es, por tanto, un dímero del alcaloide indólico catarantina y el alcaloide dihidro-indólico vindolina existente ambos en la planta en estado libre. La vinblastina se forma por dimerización de la catarantina y la vindolina, mediante el intermediario 3',4'-anhidrovindolina; éste ha sido aislado de plantas frescas y cultivos celulares y su formación a partir de monómeros se ha efectuado con isozimas peroxidásicas aisladas de cultivos en suspensión de *C. roseus* y con peroxidasa comercial del rábano picante.

Dado que estos alcaloides constituyen tan sólo componentes menores de la planta (la vincristina se obtiene con sólo 0,0002 % del rendimiento de la droga total), se necesitan grandes cantidades de materia prima vegetal y los procedimientos de aislamiento utilizan de forma intensiva los fraccionamientos cromatográficos.



## USOS

El sulfato de vinblastina se utiliza principalmente para el tratamiento de la enfermedad generalizada de Hodgkin y del corioepitelioma. El sulfato de vincristina es también un agente citotóxico y se emplea principalmente en el tratamiento de la leucemia infantil; con él se han conseguido breves remisiones de la enfermedad de Hodgkin y del sarcoma retículocelular. El sulfato de vindesina semi-sintético se ha usado también en el tratamiento de la leucemia linfoide aguda en niños. En un intento de producir compuestos menos tóxicos (vinblastina y vincristina producen neuropatías), se han estudiado los metabolitos microbiológicos de estos alcaloides.



**Nombre científico:** *Tabebuia rosea*.

**Familia :** Bignoniaceae

**Sinónimos:** *Couralia rosea* (Bertol.) Donn. Sm.  
*Sparattosperma rosea* (Bertol.) Miers.  
*Tabebuia mexicana* (Mart. ex Dc) Hemsl.  
*Tabebuia pentaphylla* (L.) Hemsl.  
*Tabebuia punctatissima* (Kranzl) Standley  
*Tecoma evenia* Donn. Sm.  
*Tecoma mexicana* Mart. ex Dc.  
*Tecoma mexicana* (Mart. ex Dc) Hemsl.  
*Tecoma rosea* Bertol.

**Nombres Comunes:**

**Costa Rica:** Roble de sabana, Roble blanco

**Guatemala:** Matiliguate, Roble blanco, Palo blanco, yaxte.

**Panamá:** Roble encina.

## DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árboles perennes de 25-30 m de alto, corteza con fisuras verticales, gris opaca o negruzca. Hojas palmaticompuestas, 5 folíolos desiguales, elípticos a elíptico-oblongos. Inflorescencia en panículas terminales; cáliz cupular, bilabiado; corola rosado-lavanda o magenta, infundibuliforme; estambres didínamos. Fruto, una cápsula linear-cilíndrica, atenuada en los extremos, con semillas aladas. Distribuida desde el sur de México a Venezuela. Encontrada en los bosques secos y húmedos tropicales, y también es extensivamente cultivada como ornamental y por su madera. Florece durante la estación seca cuando sus hojas son caducas.



## HISTORIA

Las cualidades estéticas de las vistosas flores de la Bignoniaceae son apreciadas en los países nativos. Muchos países de América Latina han seleccionado especies Bignoniaceae como su flor Nacional. Entre los cuales se incluyen: el Salvador (*Tabebuia rosea*), Venezuela (*Tabebuia billbergii*), Brasil (*Tabebuia serratifolia*), Ecuador (*Tabebuia chysantha*) y Paraguay (*Tabebuia* sp.); *jacaranda minosifolia* está designada como flor Nacional en segundo lugar en Argentina.

El uso principal de *Tabebuia rosea* es de ornato, por la belleza de sus flores rosadas, se encuentra a la orilla de los caminos, avenidas, parques y jardines. La madera es de excelente calidad y se utiliza para fabricar muebles y gabinetes, artesanías, remos, culatas para armas de fuego, decoración de interiores, mangos para herramientas e implementos agrícolas.

Nativa de climas húmedos, selvas de clima seco o campos abiertos sobre costas del centro y sur de México, Yucatán, Guatemala, Venezuela y Ecuador sobre 1200 m.s.n.m. Introducida y cultivada en muchas regiones tropicales del mundo.

## USOS ETNOMÉDICOS

La corteza de *Tabebuia rosea* se usa en México para enfermedades protozoarias, malaria y cáncer uterino, mientras que la hoja se emplea para contusiones. La corteza de *Tabebuia rosea* en Bolivia también tiene uso anticáncer.

En Guatemala, la decocción de la corteza es utilizada como remedio para la anemia, para el constipado y para proteger de la rabia que transmiten los perros.

Toda la planta es utilizada en decocción interna y externamente como antídoto para las mordeduras de serpientes (Morton, 1981). A la decocción de hojas, flores y raíces se le atribuyen propiedades febrífugas, analgésicas y sudoríficas.



En Costa Rica, (Núñez Meléndez, 1975), la decocción de las flores, hojas o raíces ha ganado reputación como antídoto de las mordeduras de serpientes. La corteza pulverizada como antipirético y también para aliviar el dolor de cabeza y para los resfriados. *Tabebuia Pentaphylla*, comúnmente llamada Roble, Roble de Sabana, es considerada como analgésico, antisifílico y antipirético. La corteza es rica en taninos.

En Panamá, se usa para amigdalitis, cicatrización de heridas, antimicótica, úlceras externas, diarreas y disentería. Se prepara un cocimiento con la corteza de este árbol. Esta preparación tibia es utilizada para curar las heridas, úlceras externas e infecciones micóticas de la piel. En forma de duchas vaginales se usa para eliminar los flujos y en forma de gárgaras para la amigdalitis. Una taza diaria durante 3 ó 4 días sirve como un remedio antidiarréico y antidisentérico. En Brasil, *Tabebuia leucoxyloides*, se usa como diurético y como desobstruyente del hígado y del bazo. La cáscara de los frutos contienen un principio hipnótico no muy fuerte. La corteza de *Tabebuia barbata* se considera tóxica.

## QUÍMICA

Se han registrados los siguientes compuestos químicos en diferentes partes de este árbol: ácidos cafeico, p-hidroxicumárico, p-cumárico, oleanólico, ferúlico y gentísico; cianidina-3-O-β-D-rutinósido; hentriacontan-1-ol, N-hentriacontano, N-hexacosano; lapachol, α-isodeshidrolapachona, lupenona, Nafto-(2,3-β-) furano 4,9 – diona, 2-(1-hidroxi)etil; sitosterona, β-sitosterol; especióside, tecomaquinona I, II y III y deshidrotectol.

## FARMACOLOGÍA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

González et al. en 1992 demostraron que la β-lapachona tiene actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*. El lapachol tiene actividad antitumoral.



El extracto metanólico de la corteza tiene actividad moluscicida e inhibidora de germinación vegetal. El extracto etanólico de las flores presentan actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. El extracto metanólico de las hojas y tallos demuestran actividad inhibidora de la transcriptasa inversa en concentraciones de 200.0 µg/ ml.

El lapachol es inactivo frente a levadura y hongos mientras que un compuesto relacionado xiloidina demuestra actividad contra *Brucella* sp y *Candida* sp. El lapachol es un antimalárico activo y antitripanosoma.

Extracto acuosos de la corteza interna de *Tabebuia impetiginosa* inhibieron en 44% el crecimiento de un sistema tumor animal (Walker carcinoma 256) en dosis de 200 mg / kg ip en ratas. El lapachol inhibió yoshida sarcoma y el carcinoma Walker 256 en 82% y 50% , respectivamente, la β- lapachona tiene un poco menos actividad antitumoral.

Los estudios realizados por el instituto Nacional de Cáncer concluyeron que la actividad antitumoral de los extractos de *Tabebuia* sp no se le pueden atribuir al lapachol, pero puede ser debido a un compuesto de tipo pro-fármaco. Se realizó un estudio clínico en humano con lapachol. No se observó efectos antineoplásicos significativos, presumiblemente debido a la absorción incompleta del lapachol.



**Nombre Científico:** *Pouteria sapota*

**Nombres comunes:** Sapote, mamey colorado, mamey jaka, sabudi.

**Sinonimia:** *Pouteria sapota* (jacq.) H. E Moore & steam colocarpum mamnosun (L.)  
*Pierre Sideroxylon Sapota Jacq.*

**Familia:** Sapotaceae

## DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Nativa de México hasta Nicaragua. Cultivadas en otras regiones tropicales del continente Americano.

## DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol de hasta 30m. Hojas anchamente oblanceoladas o estrechamente obovadas, de 10 a 60 cm, a veces finamente reticuladas. Flores en glomérulos en nudos defoliados; sépalos de 6 a 12; corola blanca de 9 a 10mm. fruto elipsoideo u ovoideo a subgloboso, de 8 a 20 cm; pulpa roja; semillas de 1 a 2, grandes, negras, lustrosas.

## QUÍMICA

La semilla contiene un heterósido cianogenético, la Amigdalina (oR-amigdalosido), azúcares, proteínas, y taninos.



## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La envoltura de la semilla, posee una actividad antiteratogénica y deprime el sistema nervioso central. Los trabajos en relación con la almendra de la semilla son contradictorios.

La amigdalina es un principio antiinflamatorio, antitusivo, expectorante y preventivo del cáncer. En la corteza, hojas y raíz se encuentran alcaloides.

## TOXICIDAD

Los heterósido cianogénéticos constituyen un pequeño grupo de compuestos de origen natural que incluyen unas 13 estructuras diferentes. Metabólicamente pueden ser hidrolizados por enzimas vegetales que los transforman en ácido cianhídrico (compuestos tóxicos). Muchas plantas que contienen este compuesto, están acompañadas por enzimas  $\beta$ -glucosidasa activas degradantes que incrementan la disponibilidad del ácido cianhídrico, y pueden provocar peligrosas intoxicaciones por toxicosis cianhídrica aguda o crónica. Específicamente la amigdalina, es un heterósido cianogénético que en el tracto digestivo es hidrolizado y transformado en el monoglúcosido prunasina, el cual es mejor absorbido. La administración oral de la amigdalina puede ser 40 veces más tóxica por vía endovenosa.

## ADVERTENCIA

La toxicidad de la amigdalina, presente en la semilla de esta especie, obliga a clasificar el uso interno de la semilla machacada contra la disnea (asma), en categoría «**TOX**», recomendando desalentarlo y desaconsejarlo, independientemente del reconocimiento de las cualidades terapéutica de este compuesto.



## RECOLECCIÓN

Para cada planta medicinal existe un momento adecuado para realizar su recolección. La determinación de los principios activos permite establecer con exactitud el tiempo correcto de la recolección. Sin embargo, para las plantas cuyos principios activos todavía no se conocen, pueden aplicarse algunas reglas generales:

- ▶ Las cortezas deben ser recogidas en la primavera, en el inicio del verano o del otoño.
- ▶ Los órganos subterráneos: las raíces, los tubérculos, y los bulbos deben de ser recogidos durante el invierno.
- ▶ Las plantas herbáceas y las hojas deben ser recolectadas cuando se inicia la floración.
- ▶ Las sumidades floridas son recogidas durante su floración y antes de la formación de sus semillas.
- ▶ Las frutas se recolectaran antes de alcanzar su estado maduro.

Los períodos de sequía y de lluvia influyen en el contenido de los principios activos. Por ejemplo, el contenido de alcaloides disminuye después de las lluvias y el de los aceites esenciales aumenta.

## SECADO

El secado del material vegetal elimina suficiente cantidad de humedad como para conservar la calidad de la droga y prevenir el enmohecimiento, la acción de las enzimas y de las bacterias, y posibles alteraciones químicas. El secado fija los constituyentes y facilita la trituración y la molienda, obteniéndose una forma mas conveniente para la comercialización de la droga. Este procedimiento comprende dos principios básicos: control de la temperatura y regulación de la ventilación. El control del secado depende de la naturaleza del material que ha de secarse y del aspecto que se desee dar al producto terminado.



El material vegetal puede secarse al sol o mediante calor artificial. El secado al aire puede hacerse al sol o a la sombra, según el material.

El secado al sol es apto para las drogas que no son alteradas por los rayos solares. El secado a la sombra se hace cuando se desea conservar el color natural de la droga.

El secado con calor artificial es el método más aceptable si se hace con habilidad. Requiere el empleo de diversos secadores que pueden adquirirse o armarse especialmente. En principio, el secador consiste en un espacio cerrado donde se ubican varias bandejas movibles y separadas, para permitir la circulación libre de aire caliente; la ventilación puede ser regulada y del mismo modo la fuente de calor, que generalmente se encuentra en el piso. Dicho espacio debe tener capacidad para un poco más de la cantidad prevista. La temperatura debe ser conveniente para eliminar la humedad, pero no tan elevada como para afectar a los constituyentes de la droga. La ventilación se efectúa de manera que se aprovechen las unidades calóricas del aire, y que este se elimine saturado de humedad. Si la ventilación y el calor se controlan debidamente, el material se seca bien y produce una droga de máxima cantidad, tanto en sus constituyentes como en su aspecto.

## MOLIENDA

La molienda tiene como objetivo la disminución del tamaño de las partículas de la droga vegetal para adecuarla a la etapa siguiente del proceso de extracción. La extracción de una droga entera o dividida en fragmentos gruesos sería incompleta, debido a la pobre penetración del solvente en el tejido vegetal, y será igualmente muy lenta, una vez que las membranas celulares actúan como verdaderas barreras que dificultan el proceso de extracción.

El proceso de molienda es precedido de la selección para aislar las impurezas. En esta operación se separan manualmente los materiales extraños como pedazos de madera, de metal o materiales de otra naturaleza. En instalaciones de mayor tamaño, los metales pueden ser separados empleándose imanes. La tierra, la arena y el polvo muy fino son separados por medio de tamices. La selección del equipo para la molienda esta en función de la naturaleza de la droga vegetal y del tamaño que se pretende obtener.



## MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción de drogas crudas comprende aquellas operaciones que tienen por objeto la separación de los principios solubles de las drogas para lo cual se tratan éstas con un disolvente.

La extracción se diferencia de la disolución en que aquella opera sobre materiales que tienen sustancias insolubles, por lo que se requieren métodos adecuados para extraer los componentes solubles separándolos de los insolubles. Los modos principales de extracción empleados en farmacia son los siguientes:

1. **MACERACIÓN**
2. **LIXIVIACIÓN**
3. **DIGESTIÓN**
4. **INFUSIÓN**
5. **DECOCCIÓN**

### 1. **MACERACIÓN :**

Consiste sencillamente en remojar la droga o sustancia, debidamente fragmentada, en un menstro, hasta que éste penetre muy bien en la estructura celular y se ablande y disuelvan las porciones solubles. Se pone la droga en un frasco con el disolvente, se tapa bien y se agita de cuando en cuando por un período de 2 – 14 días; luego se decanta el líquido, se exprime el residuo para evitar pérdida y se filtran los líquidos mezclados. La maceración se debe efectuar a temperatura de 15 – 20 grados centígrados.

#### ➤ **MACERACIÓN ACELERADA**

Es la misma técnica tradicional de la maceración empleada en algunos laboratorios de extracción de compuestos naturales con la diferencia de que se toman en cuenta algunos parámetros para agilizar dicha operación, siendo éstos: temperaturas de 45 °C – 50 °C, tiempo de 30 minutos y agitación constante.



## **2. LIXIVIACIÓN:**

Es la operación en la cual un polvo depositado en un receptáculo especial es privado de sus componentes solubles mediante el descenso de algún disolvente que pasa por él.

## **3. DIGESTIÓN:**

Es una forma de maceración que consiste en aplicar calor moderado a la sustancia que esta siendo tratada. Se ejecuta en aquellos casos en que no perjudica las temperaturas moderadamente altas y con ellas se acrecienta el poder disolvente del menstuo.

## **4. INFUSIONES:**

Son preparados líquidos de extracción de sustancias vegetales con agua caliente o fría. Sobre la droga se vierte agua hirviendo y se deja asentar la mixtura en un vaso cerrado hasta que se enfría.

## **5. DECOCCIÓN O COCIMIENTO:**

Son preparados líquidos que se confeccionan hirviendo con agua sustancias vegetales.



# SCREENING

## Etapas de *Screening*

La estrategia de *Screening* comprende por lo general dos etapas: el *Screening primario* y el *Screening secundario* o de orden superior. Cada una de estas etapas implica la realización de uno o más ensayos de actividad biológica ( bioensayo ). Ambas etapas tienen por objeto reducir a un número manejable, el conjunto de los extractos vegetales, para efectuar sobre estos el fraccionamiento guiado por los bioensayos para encontrar el o los compuestos de interés.

El bioensayo utilizado para el *Screening primario* debe reunir las siguientes características:

- Ser de amplio espectro, esto es, debe detectar una amplia gama de actividades biológicas.
- Tener alta capacidad para permitir el procesamiento simultáneo de muchas muestras.
- Ser rápido.
- Utilizar poca cantidad de muestra. Ser sencillo, económico y capaz de predecir la actividad biológica buscada.

En la década del 60 los ensayos estándar para evaluar potenciales drogas se basaban en suministrar el material en estudio a animales de laboratorios y observar si estos permanecían enfermos y eventualmente morían o si mejoraban o mostraban algún otro cambio en su comportamiento o estado de salud. Este tipo de *Screening* era de respuesta lenta, de elevado costo de resultados imprecisos. Actualmente, los bioensayos ( que frecuentemente están automatizados ) son mucho más rápidos, económicos y significativamente más precisos, los estudios en animales de laboratorios y eventualmente en seres humanos se reserva para etapas posteriores más especializadas.

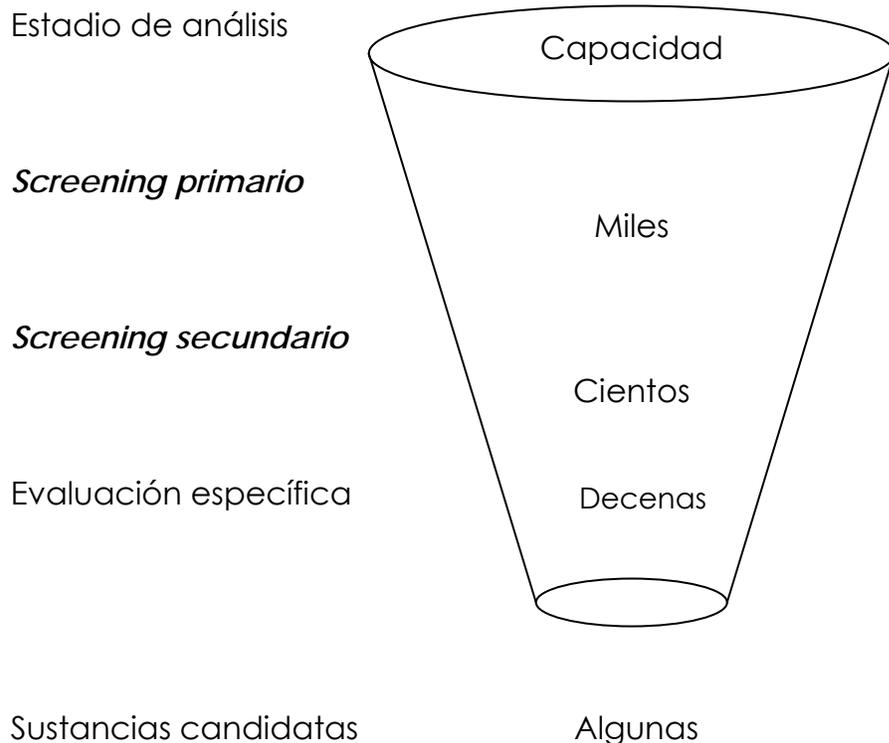
Los extractos que poseen actividad biológica en el *Screening primario* pasan a ser analizados en el *Screening secundario*. Este emplea bioensayos más específicos, que generalmente son de menor capacidad, de respuestas más lenta y tienen mayor complejidad y costo que los bioensayos primarios. Con los extractos vegetales que demuestran actividad en esta segunda etapa se efectúa el fraccionamiento guiado por bioensayos a fin de detectar el o los compuestos responsables de dicha actividad. Este fraccionamiento



utiliza un bioensayo denominado monitor, que tienen las características de un bioensayo primario ( sencillo, económico, de alta capacidad y respuesta rápida ) y que frecuentemente es el mismo con que se realizó el **Screening primario**. Actualmente, a nivel industrial, los procedimientos de **Screening** son efectuados por analizadores automatizados de alta capacidad, que permiten el procesamiento muy rápido de una gran cantidad de muestras ( high throughput Screening ).

Una vez que los compuestos con actividad biológica son aislados, se determina su estructura y se someten a estudios detallados y específicos que se efectúan in vivo, y son de baja capacidad, alto costo y respuestas lentas. Estos estudios incluyen, por lo general, la determinación de la farmacocinética ( que permite conocer el modo y velocidad de distribución de la droga ) y la toxicidad de la droga. Luego de esta etapa, las moléculas promisorias pueden ser modificadas químicamente en el laboratorio, si se considera que esto puede conducir, por ejemplo, a aumentar su actividad o disminuir su toxicidad. Finalmente, se realizan los ensayos preclínicos y clínicos.

Una estrategia de **Screening** puede simbolizar mediante un tamíz a través del cual las muestras se van filtrando de modo tal que el número que se someterá a la evaluación específica se va reduciendo a una cifra manejable para el desarrollo de nuevas drogas.





Es importante mencionar que una vez finalizado el **Screening secundario**, es frecuentemente necesario aplicar uno o más criterios de selección con el fin de asignar un orden de prioridad a los extractos clasificados como activos antes de proceder a su fraccionamiento guiado por bioensayos.

## Screening para la búsqueda de actividad antitumoral

Este método tiene por objeto el desarrollo y aplicación de bioensayos para la búsqueda de actividad antitumoral en extractos de plantas medicinales. Para dicha búsqueda, se eligió una estrategia de **Screening** o tamizado que comprende 3 etapas: el **Screening primario** de citotoxicidad, el **Screening secundario** de actividad antitumoral y finalmente la investigación de principios activos de los extractos más promisorios ( líderes ). El **Screening primario** de citotoxicidad se efectúa con el test de **Artemia Salina**. Los extractos que resultan activos en dicho ensayo, pasan al **Screening secundario** que se realizan con un conjunto de tests celulares y moleculares.

El primer bioensayo empleado es el del disco de papa, en el que se mide la capacidad de inhibición en la formación de los tumores en galla de corona provocados por el **Agrobacterium tumefaciens**. Luego, los extractos que resultan activos se analizan en el ensayo de citotoxicidad en células de carcinoma nasofaríngeo humano ( KB ), y los que resultan más promisorios se investiga su interacción con el ADN ( bioensayo del Metil green-ADN ) y las ADN-topoisomerasas. Esta estrategia que emplea una bacteria de bioensayo de complejidad y costo creciente permite ir disminuyendo el número de extractos bajo estudio.

Así mismo se ha puesto a punto el bioensayo del Metil green-ADN y se encuentran en desarrollo los bioensayos de citotoxicidad en células KB y de inhibición de las ADN-topoisomerasas.



## ARTEMIA SALINA

La *Artemia salina* es un crustáceo Branquípodo y Anostráceo. Se caracteriza por estar dotado de apéndices torácicos en forma de hoja que son cada uno de ellos portadores de una branquia, y por la ausencia de caparazón rígido.

Se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, normalmente en las zonas templadas, tropicales y subtropicales. Vive en salinas costeras y en lagos de agua salada, aunque también se le puede encontrar en las lagunas interiores con una composición salina muy distinta a la del agua del mar. De hecho, la *Artemia* puede vivir en condiciones ecológicas muy diversas y adversas, soportando temperaturas que oscilan entre los 5 y los 35 °C, salinidades de hasta un 300 por mil y concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 1 parte por millón (1 ppm).

Existen diferentes cepas de *Artemia*, según el lugar de procedencia. Las distintas cepas presentan diferente color y tamaño, variando también sus condiciones ecológicas. Tradicionalmente se ha considerado a la *Artemia* como una sola especie con numerosas razas o cepas, pero actualmente muchos especialistas tienden a considerar algunas de las cepas como diferentes especies de *Artemia*, debido a su aislamiento reproductivo. Así por ejemplo se habla de *Artemia franciscana*, procedente de la Bahía de San Francisco, *Artemia monica*, procedente del lago Mono Lake en California, etc.

Generalmente la historia de la vida de esta criatura puede ser resumida así, pequeñas partículas de color rojizo, con una gran variedad de tonos entre el pardo rojizo y el rojo intenso, midiendo cerca de 0.20 mm a la expansión del diámetro a la superficie y son eventualmente sacados a tierra por el viento. Estos son inactivos o quietos, los huevos del camarón salinero pueden ser reunidos y separados de la arena.

El primer reporte del uso del camarón como un órgano de prueba apareció en 1956. Desde entonces han habido muchos reportes sobre el uso de este animal para estudios ambientales, análisis para toxinas naturales y como un examen general para sustancias bioactivas en extractos de plantas.



## CICLO DE VIDA DE LA ARTEMIA SALINA

El camarón salinero es un crustáceo que pertenece a la subclase Anostraca. Se encuentra en todo el mundo en los cuerpos de agua en un rango de salubre a ultra salinas. Estas tolerancias altas a un rango de salinidad (10-20 a 180-220 g / L) hacen de este animal relativamente fácil para cultivarlo y estudiarlo. En condiciones ultra salinas, existen pocos organismos ó depredadores, y esto probablemente explica el éxito de la *Artemia salina* en el establecimiento de poblaciones en lagos salados o en charcos salineros.

Cuando ellos son regresados a la solución salina (por ejemplo agua de mar), los huevos absorben agua. Comienza la embriogénesis y es completada entre 16 y 36 horas de la inmersión. El embrión sale de la concha todavía cubierto en una membrana de crianza; sin embargo, el pronto desarrollo de las antenas y mandíbulas, el rompimiento libre de la membrana de cultivo se convierte en un náuplio nadador activo.

La larva crece a través de 15 etapas, en el cultivo de crecimiento, pueden ser alimentado con células de levadura o algas unicelulares. Cerca de 20 a 35 días el animal alcanza una longitud de 8,5 – 9,5 mm y está sexualmente maduro. La reproducción puede ser ovípara o vivípara. Esta alternación puede ser gobernada por la cantidad de clorofila en la dieta y oxígeno en el ambiente.

El ensayo de la larva del camarón es una prueba de toxicidad rápida y simple para productos de plantas bioactivas no es selectivo por tipo químico y no han sido muy bien correlacionados con otras actividades biológicas. No menos es, que la simplicidad del procedimiento debe asegurar en un lugar de laboratorio de productos naturales como un bioensayo preliminar para examinar los extractos de plantas para ampliar estudios y para una guía de fraccionación.

## INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA ECLOSIÓN DE CISTES

La salinidad usualmente es un poco inferior a la del agua de mar, ya que se ha comprobado que da mejores resultados. Normalmente se trabaja con una salinidad de 28 a 30%. Con el agua de mar tiene una salinidad de 35 a 38%, hay que disminuirla, lo que se consigue fácilmente añadiendo agua dulce.



## **INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA ECLOSIÓN DE CISTES**

En general al aumentar la temperatura, aumenta la velocidad de desarrollo del embrión, con lo que se acelera la eclosión. La temperatura óptima para la incubación de los cistes oscila entre 28 y 30°C, ya que a temperaturas más elevadas pueden ocasionar problemas y llega a detener el metabolismo de los embriones, lo que inevitablemente sucede al alcanzar los 40°C de temperatura.

## **INFLUENCIA DEL pH EN LA ECLOSIÓN DE CISTES**

Un pH ligeramente básico, entre 8 y 8,2 como el que existe en el agua del mar, es el más adecuado para la eclosión de los cistes.

## **INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA ECLOSIÓN DE CISTES**

Se recomiendan niveles de oxígeno próximos a la saturación, normalmente, para conseguir que el oxígeno se mantenga en niveles aceptables, basta con airear intensamente el sistema, con lo que además se consigue que los cistes se mantengan en suspensión. El metabolismo se interrumpe cuando el oxígeno disuelto en el agua desciende por debajo de 1ppm (1mg / L).

## **INFLUENCIA DE LA LUZ EN LA ECLOSIÓN DE LOS CISTES**

Durante las primeras fases de hidratación de ciste es necesario mantener el sistema fuertemente iluminado, normalmente, lo que se hace es mantener una iluminación constante durante todo el proceso de incubación, aunque una vez el ciste puede prescindirse de la luz si el recipiente que se utiliza para la incubación es transparente.



## PRUEBA DE ARTEMIA SALINA

El camarón salino cuyo nombre científico es *Artemia salina*, es un pequeño crustáceo usado como un bioensayo preliminar y barato, para evaluar la actividad tóxica general no específica de los extractos vegetales en búsqueda de agentes biológicamente activos, específicamente anticancerígeno, puesto que se ha demostrado que existe una directa relación con las pruebas de citotoxicidad anticancerígena, in vitro. En este sentido, esta prueba se usa para determinar agentes antitumorales de una gran variedad de especies vegetales, obteniéndose los niveles de actividad citostática y citotóxica de la misma, siendo el parámetro de referencia los valores de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), obtenidos durante la prueba de *Artemia salina*, siendo ésta barata y además que puede realizarse en cualquier ambiente que reúne las condiciones ambientales.

## DETERMINACIÓN DEL DL<sub>50</sub>

El 95% del intervalo de confianza y el DL<sub>50</sub> se determina utilizando el conteo de análisis indagado a las 6 horas como toxicidad crónica (Finney 1971), para los casos donde los datos no son suficiente en el análisis se modifica según (Ashton et al 1972) para determinar el DL<sub>50</sub>.

También existen otras vías para tratar la información cuantitativa derivada de una serie de pruebas biológicas, tales como el método logarítmico de Probit, Miller, Tainter, el procedimiento de D-Berr y el método de Reed-Muench es el más conveniente. Este procedimiento asume que un animal que sobrevive a una dosis alta podría también sobrevivir a una dosis baja y viceversa, que un animal que muere a una cierta dosis baja podría también morir a cualquier dosis alta, de este modo la información de cualquier grupo puede ser adicionada a otro grupo dentro del rango de las dosis probadas.

La dosis que matará el 50 % de náuplios puede ser determinada por dos procedimientos gráficos que pueden ser utilizados. El primer procedimiento grafica el número de acumulados vivos y el número de acumulados muertos en la misma abscisa, (número de animales), versus logaritmo de la dosis. Las dos curvas se entrecruzarán (P. Ej. Log dosis), donde el número de acumulados vivos es igual al número de acumulados muertos. Esto puede ser utilizado para obtener un estimado rápido de la tolerancia media.



En el segundo método se grafica la dosis versus el porcentaje de mortalidad, la dosis al 50 % de mortalidad es obtenida por la interpretación de las curvas. En contraste el segundo método permite la utilización de la fórmula para estimar el error estándar.

$$SE DL_{50} = \sqrt{0.79 x h x R / n}$$

Donde :

H = Promedio de intervalo entre dosificaciones (Log de la dosis).

R = Extensión del rango (DL<sub>75</sub>- DL<sub>25</sub>) de los porcentajes acumulados.

N = Números de animales (el promedio).

R puede ser obtenida de la gráfica de porcentaje de mortalidad versus dosis.

Si un DL<sub>75</sub> o DL<sub>25</sub> no puede ser obtenidos de la gráfica, entonces la extensión del rango puede ser estimado como dos veces DL<sub>75</sub> para DL<sub>50</sub> o dos veces DL<sub>50</sub> para DL<sub>25</sub>.

El 95 % de los límites de confianza del DL<sub>50</sub> puede ser derivado de la siguiente relación :

$$LOG DL_{50} \pm 2 SE DL_{50}$$



## ALCALOIDES

Los alcaloides se definen como sustancias orgánicas nitrogenadas complejas de origen vegetal, conteniendo en la mayor parte de su molécula uno o varios anillos cíclicos nitrogenado, de reacción mas o menos básicos, dotados corrientemente de una fuerte actividad fisiológica y farmacodinámica, que presentan un conjunto de reacciones químicas comunes.

Se puede establecer una relación muy estrecha entre la formación u origen de los alcaloides y la síntesis o la destrucción de los materiales proteicos.

Los alcaloides raramente se encuentran en el estado libre; mas a menudo bajo forma de sales, solubles o insolubles, formando combinaciones con los ácidos orgánicos del plasma(málico, succínico, cítrico, etc.), o raramente combinados a radicales, ácidos especiales, tales como el ácido aconítico, micónico.

Un mismo vegetal contiene siempre o casi siempre, un conjunto de alcaloides vecinos, constituidos por un conjunto de productos que derivan de un núcleo común.

Aunque muy repartidos los alcaloides, suelen faltar en las algas y los musgos, poco frecuente en los hongos y en las Monocotiledóneas, se encuentran particularmente en las Colchicáceas y en las Dicotiledóneas, notablemente en las Ranunculáceas, Papaveráceas, Rubiáceas, Laganiáceas, Apocináceas, Solanáceas, etc. Carecen de ellos las Rosáceas y Crucíferas. Los órganos más ricos de las plantas que los poseen son las semillas, corteza y raíces, encontrándose en las plantas en mayor proporción en periodos de vegetación.

### CARACTERÍSTICAS GENERALES

1. La mayoría son metabolitos secundarios, que derivan de aminoácidos con excepción de los seudo alcaloides de las purinas y las adeninas.
2. El nitrógeno heterocíclico que posee puede ser una amina primaria, secundaria o terciaria.



3. La basicidad de los alcaloides varía notablemente, dependiendo de la actividad de la molécula y de los grupos funcionales.
4. La actividad farmacológica es específica de cada núcleo de alcaloide.
5. Son productos de reserva para síntesis de proteínas.
6. Actúan como núcleo de hormonas y coenzimas.

## PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

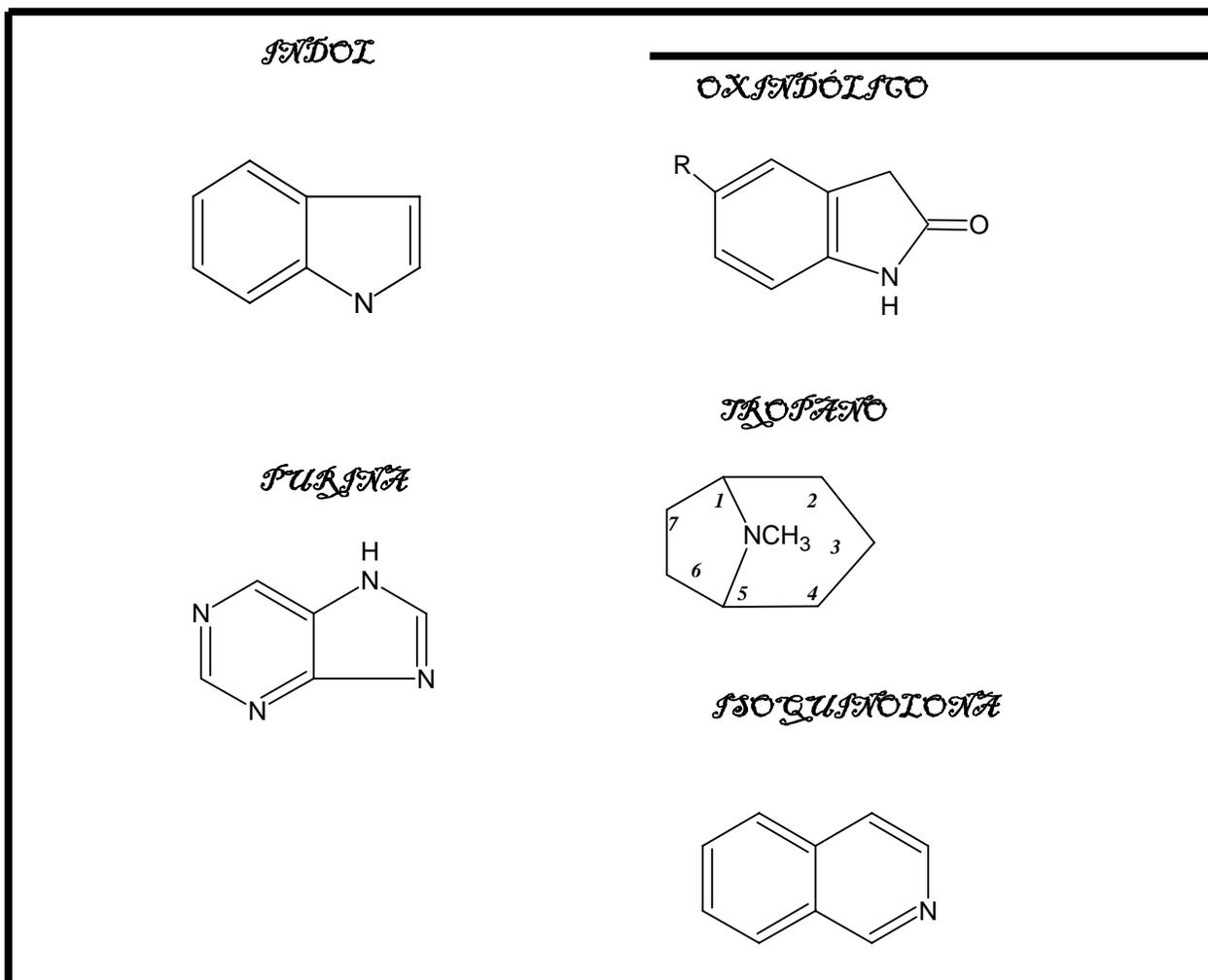
1. La solubilidad de las sales de los alcaloides es en general opuesta a la de los alcaloides mismos de que se derivan. Las sales son precipitables de sus soluciones por el ácido tánico y los taninos, los ácidos fosfotúngtico, fosfomolibólicos, pícricos y picrolónico.
2. Los alcaloides dan sales dobles con las soluciones de yoduro bismútico-potásico, etc. y si se reemplaza el yoduro potásico en estos reactivos por el yoduro de cesio, se aumenta extraordinariamente la sensibilidad.
3. Casi todos los alcaloides actúan sobre la luz polarizada, siendo casi todos levógiros, aunque su poder rotatorio varíe según el disolvente empleado.
4. Los no oxigenados, compuestos de C, H y N, son corrientemente líquidos a la temperatura ordinaria, volátiles y odorantes: nicotina, coniína y esparteína.
5. Generalmente los alcaloides son oxigenados siendo entonces sólidos a la temperatura ordinaria poco soluble en el agua y solubles en los disolventes orgánicos( éter, bencina, cloroformo, éter de petróleo, alcohol etílico, etc.). Algunos alcaloides oxigenados son líquidos a la temperatura ordinaria: peletierina y pilocarpina.
6. En cuanto a la basicidad de los alcaloides, es muy variable, pues mientras unos son bases fuertes ( nicotina ), otros lo son sumamente débiles, como la cafeína y la piperidina.
7. Los alcaloides poseen punto de fusión estable o definidos.



8. La solubilidad de los alcaloides va a depender de 2 factores:
- Forma de bases libres ( soluble en solventes orgánicos de baja polaridad)
  - Forma de sales libres ( solubles en solventes orgánicos de alta polarida )
9. La mayoría de los alcaloides son sensibles a la luz y al calor, degradándose a temperatura mayor de los 70 °C.

## CLASIFICACIÓN

Se han sugerido varias maneras de clasificar los alcaloides. La clasificación que aquí proponemos se basa en la estructura del anillo o núcleo. En la figura se muestra algunos núcleos de alcaloides.





## **TÉCNICAS RECOMENDADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES**

Debido a la gran diversidad de estructuras que pueden presentar los alcaloides, el tener como referencia la planta (familia y género) del cual ha sido aislado reduce el problema de identificación a un número menor de posibilidades y clasifica al alcaloide dentro de un determinado tipo; la posterior aplicación de pruebas de cromatografía de capa delgada en combinación con reacciones generales y específicas de coloración hace posible en muchos casos la identificación de un alcaloide conocido; esta asunción puede ser comprobada y complementada con un registro UV e IR, con mediciones de rotación específica, de dispersión rotatoria óptica o de dicroísmo circular que permitirían confirmar la estereoquímica.

## **REACCIONES DE COLORACIÓN Y DE PRECIPITACIÓN**

Para la comprobación de la presencia de alcaloides se ha desarrollado también un gran número de reactivos de coloración y de precipitación; algunos de ellos son considerados de aplicación general mientras otros son de uso más específicos y pueden servir para clasificaciones parciales de estas sustancias; generalmente se considera que hay presencia de alcaloides si dan reacción positiva por lo menos 4 de estos reactivos. Son de uso general los reactivos de Dragendorff, Mayer, Wagner, Sonneschein.

## **TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Dentro de las técnicas cromatográficas, la CCD es la más usual utilizando principalmente sílica gel G; otros adsorbentes usuales son: óxido de aluminio G, poliamida, celulosa o la misma sílica gel G hecha alcalina por



preparación de la placa con una solución de KOH 0,5N o NaOH 0,1N en vez de agua. Los sistemas de solventes son también muy variados, y al igual que las reacciones de coloración y de precipitación, algunos son considerados de uso generales. El agente revelador de uso general es el reactivo de Dragendorff, cuya aplicación produce manchas generalmente de color naranja; son reactivos más específicos, el reactivo de Ehrlich y el  $\text{FeCl}_3/\text{HClO}_4$  para alcaloides indólicos, el reactivo de Marquis para la solanina, etc.

## CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La cromatografía es una técnica analítica y cuantitativa que ha alcanzado un alto grado de desarrollo y modalidades en los laboratorios de química y bioquímica. En sus diversas aplicaciones, la cromatografía sirve para separar compuestos químicos diferentes a partir de mezclas multicomponentes, las cuales pueden contener varios centenares de sustancias diferentes. En general, la cromatografía consiste en hacer pasar una fase móvil con un determinado disolvente ( o eluyente ) que permite el aislamiento de múltiples compuestos.

### DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

La cromatografía de capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de absorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte ( sílica, alúmina, etc. ) distribuido uniformemente sobre una placa de vidrio o de aluminio. La placa se coloca verticalmente dentro de una cámara previamente saturada con el vapor del disolvente adecuado, de tal forma que la parte inferior de la placa que contiene la muestra entre en contacto con la fase móvil. El disolvente va a migrar por capilaridad en la placa cromatográfica, separado por migración diferencial los diversos componentes de la mezcla a ser estudiada. Después de que ha ocurrido, se evapora el disolvente y la placa se analiza utilizando luz UV o luz Visible, o aplicando reactivos que dan como resultado reacciones de coloración con las sustancias contenidas en la mezcla analizada.



En el mercado podemos encontrar las placas cromatográficas prefabricadas a un precio relativamente elevado, las cuales no necesitan de la fase preparatoria y son más homogéneas y uniformes, facilitando de esta manera una mejor separación y haciendo más reproducibles los valores de Rf ( factor de retención ). El factor de retención es la medida de la migración de una sustancia determinada en un solvente dado.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

La importancia del Rf está determinada por representar una característica funcional la cual es propia del compuesto que a su vez es independiente de otras sustancias aplicadas simultáneamente.

## FACTORES QUE PUEDEN AFECTAR EL VALOR DEL Rf

Los siguientes factores causan variaciones en el valor de Rf no permitiendo que sea un valor absoluto:

- Las variaciones de temperatura del medio ambiente.
- El grado de pureza de los solventes utilizados.
- Las variaciones de homogeneidad de las diferentes placas de capa fina.

Debido a estos factores, el uso de una sustancia de referencia para garantizar la identificación, es muy importante, principalmente cuando se trata de extractos de plantas.

## ABSORBENTES

Los absorbentes más utilizados en la cromatografía de capa fina son:

- Sílica gel ( se utiliza en el 80% de las separaciones )
- Óxido de Aluminio o Alúmina ( ácida, neutra o básica )
- Tierra Silíceá o Kieselguhr
- Celulosa ( Nativa o micro-cristalina )
- Poliamidas



Estos adsorbentes deben tener las siguientes características:

- Tamaño de Partícula
  - Volumen de poro
  - Diámetro de poro
  - Área Superficial
- Homogeneidad
- Pureza

## PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Se elabora la papilla que generalmente se utiliza sílica gel F254 ( fluoresceína ) indicador. La papilla se vierte sobre la placa de vidrio previamente tratada para ello lavamos placa con detergente seguidamente la secamos y se sumerge en H<sub>2</sub>O caliente permitiendo la eliminación de la grasa y burbujas.

La obtención de la papilla puede aplicarse de 3 formas:

- 1) El extendedor móvil; permite la elaboración de las placas de diferentes espesor.
- 2) Técnica de vertido; la papilla se vierte sobre la placa y se realizan giros circulatorios.
- 3) Técnica de inversión; la papilla se coloca en una bandeja posteriormente se sumerge la placa.

## APLICACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se aplica en la placa según el objetivo: Analítico o Preparativa en :

- Banda
- Punto o Mancha

## CÁMARA PARA EL DESARROLLO

Existen varios tipos de cámaras:

- Normal



- Doble Compartimiento
- Sándwich
- Horizontal
- Varios KS
- U

## DESARROLLO DE LA PLACA FINA

### Tipos de desarrollo :

1. Ascendente; generalmente se utilizan papeles largos o placas de largo diámetro, es la más ampliamente utilizada y su fundamento está dado por que la muestra asciende por capilaridad.
2. Radial; se pueden utilizar placas petri y esta técnica se recomienda por su alta resolución ( grado del resultado, se aplica la muestra en el centro y se va girando luego se va viendo la separación de muestras, es útil para extractos o solventes coloreados.
3. Horizontal; la fase móvil recorre la muestra en sentido horizontal sobre la placa.
4. Múltiple; generalmente con desplazamiento ascendente, posteriormente un desplazamiento descendente. Primero dejamos correr la muestra sobre la fase móvil, sacamos la placa de la cámara, secamos e introducimos la muestra en otra fase diferente. La utilidad es que obtenemos  $R_f$  cercanos.
5. Fraccionamiento; se realiza con un tipo de fase móvil, se deja correr la placa y posteriormente se corre la placa con una fase móvil de polaridad diferente de la primera.
6. Bidimensional; se realiza aplicando muestra en el extremo de la placa, se desarrolla en un sentido ( ascendente, descendente, u horizontal ), luego en un segundo sentido realizando giros de  $90^\circ$  se utilizan solventes de diferentes polaridad.



## PROCESO DE ADSORCIÓN

La muestra aplicada en la placa es adsorbida en la superficie del material por la acción de fuerzas electrostática ( fuerzas de Vander Waals, Puentes de Hidrógenos, efectos inductivos, etc. ) luego cuando la placa es expuesta a un flujo por acción capilar, se inicia una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la substancia con el solvente.

## DETECCIÓN O VISUALIZACIÓN

Si la muestra ( mancha ) no es coloreada se requiere de métodos que nos permitan visualizar el (los) componentes (s) presentes. También se conoce este procedimiento como Revelado.

Estos métodos son:

- Químicos ( por inmersión o rociado ); se obtienen derivados coloreados o fluorescente.
- Físicos ( ópticos ); generalmente se utiliza radiación UV.

## EVALUACIÓN DE UN CROMATOGRAMA DE CAPA FINA

- Análisis Cualitativo
  - Medida de R<sub>f</sub>
  - Comparación Visual de color / Intensidad
  - Propiedades UV / IR / MS / NMR

## FACTORES QUE AFECTAN LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Existen 3 factores:

1. Papel utilizado; presencia de impurezas y grupos carboxilos.
2. Disolventes; la selección de los disolventes puede emplearse por la experiencia en su defecto se seleccionaron los disolvente por la serie electrofórica o la constante dieléctrica.

Ejemplo : aumento polar: con H<sub>2</sub>O, MeOH



Intermedio polar : benceno y éter de petróleo  
Disminución polar: hexano y clorobenceno

3. Temperatura, esta influye en la fase móvil, debido a que solvente volátiles afectan el coeficiente de difusión entre las fases.

## VENTAJAS DEL USO DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

- ⇒ Equipo simple y de bajo costo.
- ⇒ Fácil comprensión y ejecución.
- ⇒ Rapidez, reproducibilidad y versatilidad en el análisis.
- ⇒ Utilización de una pequeña cantidad de solvente y de la muestra a ser analizada.
- ⇒ Posibilidad de analizar varias muestras en una sola placa cromatográfica.
- ⇒ Posibilidad de revelar las placas con reactivos cromogénicos, lo cual hace posible detectar sustancias que no absorben en la región UV / Visible.
- ⇒ Posibilidad de efectuar separaciones en escala semi-preparativa.



## MATERIAL Y MÉTODO

### Tipo de estudio:

El presente estudio es de tipo experimental y descriptivo.

### Área de estudio:

Lo constituyó el Dpto. de Análisis de drogas y medicamentos de la facultad de Ciencias Químicas, el cual se encuentra ubicado en el complejo docente de la salud ( CAMPUS- MEDICO ) donde se realizan prácticas con los estudiantes de pre-grado e investigaciones monográficas.

### Universo:

Especies vegetales con actividad anticáncer de interés etnomédico existentes en la ciudad de León.

### Muestra:

Cuatro especies vegetales recolectadas en la ciudad de León: *Citrus Aurantifolia* ( hojas), *Catharanthus roseus* ( hojas ) *Tabebuia roseus* ( corteza ) y *Pouteria sapota* ( semilla ).

## PROCEDIMIENTO

Para la ejecución de este estudio se realizaron revisiones bibliográficas en libros, monografías, revistas y diferentes sitios de páginas Web, además consultas a docentes especializados en la materia.

### Recolección

Las especies vegetales fueron recolectadas directamente en diferentes puntos de la ciudad de León, de las cuales se recolectaron: las hojas de *Citrus aurantifolia* y *Catharanthus roseus*, la corteza de *Tabebuia rosea*, y la semilla de *Pouteria sapota*, posteriormente fueron trasladadas al área de estudio para la realización de los respectivos ensayos.

### Secado

El proceso de secado de las partes a utilizar se llevó a cabo al aire libre en la sombra.



## Molienda

Las partes correspondientes de cada planta fueron pulverizadas utilizando un molino eléctrico ( ver equipo utilizado), obteniendo 300 g de muestra de cada especie.

## Método de extracción

El método empleado fue maceración acelerada.

## Preparación de la muestra

1. Pesamos 200 g de muestra por especie vegetal.
2. Preparamos la muestra con una solución hidroalcohólica 70: 30
  - 70 ml – alcohol grado reactivo
  - 30 ml – agua destilada

## Fraccionamiento

Se realizó el fraccionamiento del extracto crudo por especie vegetal utilizando tres solventes en el siguiente orden : éter de petróleo, acetato de etilo y cloroformo, llevándose a cabo de la siguiente manera:

1. En un embudo separador de 250 ml se añadió 20 ml del extracto crudo, le adicionamos 20 ml de éter de petróleo y guardamos la fracción etérea.
2. El residuo obtenido fue tratado dos veces más con 20 ml de éter de petróleo, guardándose el triplicado de dicha fracción y el residuo.

Este mismo procedimiento se realizó con los otros dos solventes utilizando el mismo residuo.

## Almacenamiento

Los extractos con sus respectivas fracciones fueron almacenadas en frascos de color ámbar y conservados bajo refrigeración.



## BIOENSAYO DE ARTEMIA SALINA

### PROCEDIMIENTO

#### Preparación del medio de cultivo ( agua de mar Sea Salts )

El agua de mar utilizada para el ensayo fue obtenida en el laboratorio pesando 30 g de SEA SALTS ( sigma chem. Coc. ) disolviéndolo en un litro de agua destilada. Se pesaron 6 mg de levadura ( ácido adenélico ) y se disolvió en 20 ml de agua destilada. Se mezclaron ambas soluciones y se aforó hasta obtener 1000 ml de solución con agua destilada.

#### Incubación de los náuplios

1. En un Percolador previamente lavado, se colocaron alrededor de 500 ml de agua de mar sintética ( a temperatura ambiente ) y aproximadamente 100 mg de huevecillos.
2. Se burbujeó la mezcla con la ayuda de una bomba de aire para acuario, durante 72 horas aproximadamente, a una temperatura de 28 a 30 °C (con la ayuda de un bombillo).
3. Transcurrida las 72 horas, se colocó una cantidad de náuplios en un beacker de 100 ml . Luego se pasó una pequeña cantidad a un vidrio de reloj.
4. Con la ayuda de una fuente de luz y una pipeta pauster se contaron los náuplios en promedio de 5 intentos y se colectaban 10 náuplios vivos a cada una de las fracciones por especie vegetal.

#### Preparación del blanco (DMSO)

El blanco se preparó adicionando 0.5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en 9.5 ml de agua destilada ( solución acuosa al 5% DMSO ).



## Preparación del patrón ( 5 H<sub>2</sub>O. CuSO<sub>4</sub> )

Se preparó una concentración inicial de 250 mg / L, para esto se pesaron 0.025 g de sulfato de cobre II pentahidratado ( sal metálica pesada usada como tóxico de referencia ) y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Usando tubos de ensayo se realizaron diluciones a partir de la concentración inicial, con el objetivo de evaluar el efecto positivo de este sobre los náuplios de *Artemia salina* a varias concentraciones.

## Preparación de la muestra

1. Se pesaron 11 mg de cada una de las fracciones seca de cada especie vegetal.
2. Se agregó 0.55 ml de DMSO a cada una de las fracciones hasta completar la disolución.
3. Se adicionó 10.45 ml de agua de mar sintetica para obtener una concentración inicial de 1 mg / ml .

## Preparación de las diluciones

A partir de la muestra preparada a una concentración inicial de 1 mg / ml se hacen diluciones a concentraciones inferiores de la inicial como: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mg / ml realizando por triplicado cada concentración, obteniéndose dosis de 1000, 800, 600, 400 y 200 ppm.

## Aplicación del bioensayo de *Artemia salina*

Al cumplir las 72 horas de incubación, los náuplios son transferidos a un recipiente limpio y con la ayuda de una pipeta pauster se toman 10 náuplios vivos, estos son introducidos en cada patrón, blanco y diluciones respectivas de cada muestra conservándose bajo iluminación a temperatura de 28 a 30 °C.



Con la ayuda de una lupa se procede a realizar lecturas de los náuplios sobrevivientes a las 6, 12 y 24 horas de siembras en las respectivas diluciones.

Posteriormente se procesan los datos en tabulación y se determinan la DL50 mediante la intersección de las curvas en los gráficos utilizando el método de Reed-Muench; luego se analiza cada gráfico y el porcentaje de mortalidad verificando así las especies más activas.

## CARACTERIZACIÓN DE ALCALOIDES

### PROCEDIMIENTO

La caracterización de alcaloides se realizó a través de dos métodos:

#### 1. Reacciones de coloración

Para utilizar este método realizamos la preparación de los reactivos ( ver tabla No. 52, 53 )

##### Generales:

- Mayer
- Wagner
- Drangendorff

##### Específicos:

- Ehrlich ( indólicos )
- Erdmann ( isoquinoleína, Tropolona, Tropano, Indólicos )
- Mandelin ( esteroides, indólicos )
- Yodo-HCl ( purina )

Posteriormente adicionamos de 5 a más gotas de un reactivo diferente a los tubos de ensayos conteniendo cada uno de ellos 1 ml de fracción correspondiente por especie vegetal.



## 2. Cromatografía de capa fina

La aplicación de este método se realizó de la siguiente manera:

### Preparación de las placas cromatográficas:

- 1) Adicionamos aproximadamente 200 ml de agua destilada previamente calentada a 300 g de sílica gel F<sub>254</sub>, hasta obtener una mezcla homogénea y de buena consistencia.
- 2) Vertimos esta mezcla sobre placas de vidrio previamente lavadas y secadas.
- 3) Una vez preparada, se deja secar por 30 minutos, después se llevaron al horno por 20 minutos a temperatura de 40 °C.
- 4) Después saturamos la cámara cromatográfica por 1 hora para cada fase móvil a utilizar.
- 5) Posteriormente medimos la placa cromatográfica dejando 1 cm del borde inferior y 2 cm de distancia entre cada punto.
- 6) Aplicamos 10 µl de una fracción diferente en cada punto señalado en la placa, realizando este mismo procedimiento para cada especie vegetal.
- 7) Luego se dejó correr la muestra 12 cm de distancia hacia el borde superior y la dejamos secar por 15 minutos.
- 8) Observamos las placas en el UV y señalamos las manchas, aplicamos revelador Dragendorff, la llevamos al horno por 10 minutos a 40 °C.
- 9) Posteriormente determinamos los valores de R<sub>f</sub> de las fracciones por especie vegetal.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$



### Preparación de la fase móvil

- **Generales**

- ⇒ n-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH: CHCl<sub>3</sub>: CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H ( 45: 15: 5 )
- ⇒ EtOAc: MeOH: H<sub>2</sub>O ( 100: 13,5: 10 )

- **Específicos**

- ⇒ CHCl<sub>3</sub>: MeOH: NH<sub>4</sub>OH ( 45: 2: 0.1)- núcleo indólico
- ⇒ CHCl<sub>3</sub>: EtOH (19: 1)- núcleo oxindólico
- ⇒ CHCl<sub>3</sub>: EtOH ( 9: 1)- núcleo purina
- ⇒ Me<sub>2</sub>CO: H<sub>2</sub>O: NH<sub>3</sub> ( 80: 15: 2)- núcleo tropano
- ⇒ CHCl<sub>3</sub>: MeOH (85: 15)- núcleo isoquinolínico



## EQUIPO UTILIZADO

- ✓ Molino eléctrico ( modelo No.: 4 )
- ✓ Cocina corning hot
- ✓ Balanza analítica ( Electronic Balance, Serie No.: 4704233 )
- ✓ Refrigeradora ( White-Westinghouse / FROST FREE )
- ✓ Horno ( GCA corporation, model 16, serie No. 21AL9 )
- ✓ Balanza mecánica ( Triple Beam Balance, USA 700-800 series )
- ✓ Bomba oxigenadora (Elite 799 TM Mansfield Ma. 02048 115 volts )
- ✓ Bombillo ( philips 60w 125-130volts)
- ✓ Secadora ( Heat-BLO-GUN, modelo No. 750x )
- ✓ Micropipeta (25 µl )
- ✓ Termómetro ( NBS, monograh 90, proper cap. 420 °C )
- ✓ Cámara Cromatográfica (ultra-violet. Modelo No.:CC-20 )
- ✓ Cámara de saturación DESAGA HEIDELRBERG Made in W.  
GERMANY(22X22X10)
- ✓ Papel Filtro 0.5 ml
- ✓ Panas de baño María
- ✓ Gradilla de madera(cap. 6) y metálicas(cap. 20)
- ✓ Clan
- ✓ Trípode
- ✓ Soporte
- ✓ Malla
- ✓ Espátula Fisher
- ✓ Percolador VITAX USA



## CRISTALERIA

- ✓ Tubos de ensayo de vidrio ( KIMAX )10ml
- ✓ Balones de 50 Pyrex No 5581 y 100 ml Pyrex No 5642
- ✓ Embudo separador de 250ml ( KIMAX 22 )
- ✓ Beacker de 100 ml No. 1000, 250 ml No. 14000 , 500 ml No. 14000 y 1000 ml No. 14000 ( Pyrex y Kimax )
- ✓ Vidrio reloj ( Pyrex )
- ✓ Agitador de vidrio
- ✓ Mortero y pilón ( COORS )No. 52012
- ✓ Probeta 100 ml ( Pyrex )No. 3044
- ✓ Pipetas 10, 1 y 0.2 ml ( KIMAX )
- ✓ Embudo ( Pyrex )
- ✓ Placa de vidrio para Cromatografía
- ✓ Capilares de 5  $\mu$ l



## HIPÓTESIS

Actualmente, en la región del occidente de Nicaragua las plantas medicinales han sido una de las formas más utilizadas para contrarrestar enfermedades, despertando un gran interés por estas plantas con uso etnomédico , lo que nos motiva a realizar dicho trabajo, en el cual se plantea que las cuatros especies vegetales colectadas en la ciudad de León, evaluadas con el bioensayo de *Artemia salina*, presentan actividad biológica al determinarles su citotoxicidad y la presencia de alcaloides que ejerzan dicha actividad.



**TABLA No. 1**

Extracto crudo de la especie *Citrus aurantifolia*

Lectura: 6 Horas

<b>ppm</b>	<b>Log. Dosis</b>	<b>A. Vivos</b>	<b>A. Muertos</b>	<b>% Mortalidad</b>
200	2.3	33	2	5.7143
400	2.6	25	5	16.6667
600	2.77	18	8	30.7692
800	2.9	11	12	52.1739
1000	3	5	17	77.2727

**GRÁFICO No.1**

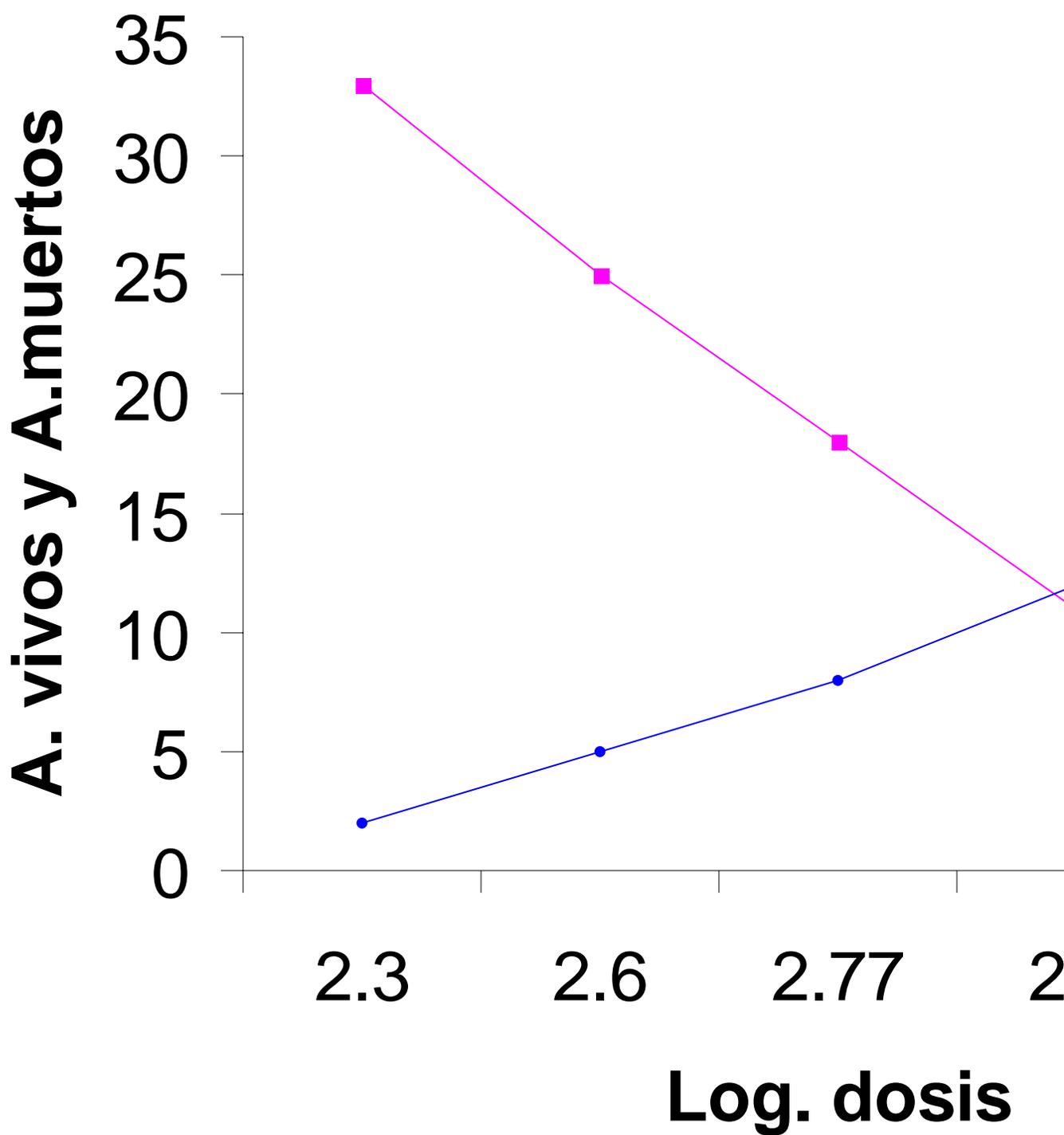




TABLA No. 2

Extracto crudo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	19	5	20.8333
400	2.6	14	10	41.6667
600	2.77	9	16	64.0000
800	2.9	5	23	82.1429
1000	3	2	31	93.9394

GRÁFICO No.2

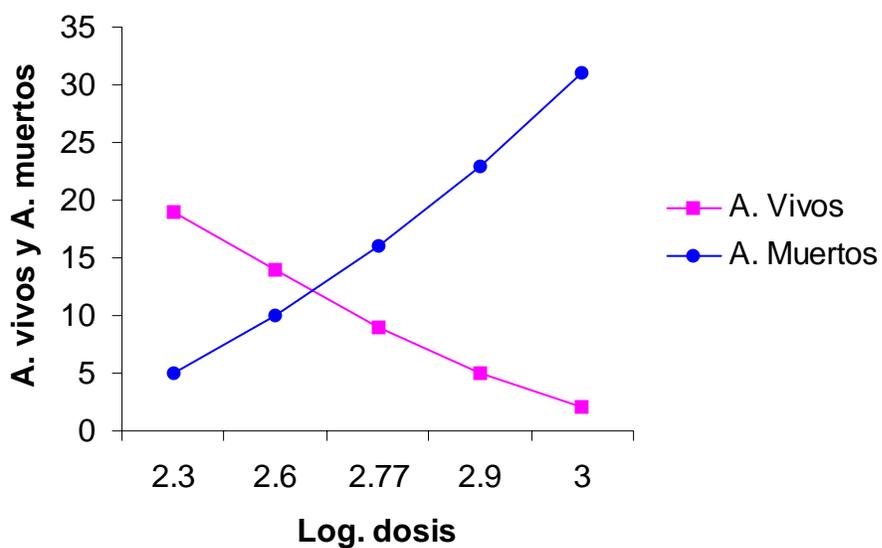




TABLA No. 3

Extracto crudo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	0	10	100.0000
400	2.6	0	20	100.0000
600	2.77	0	30	100.0000
800	2.9	0	40	100.0000
1000	3	0	50	100.0000

GRÁFICO No.3

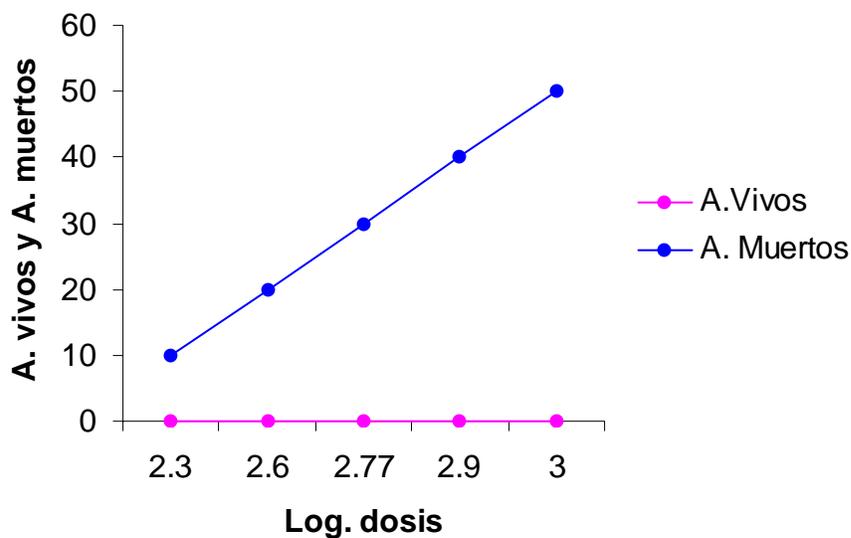




TABLA No. 4

Fracción éter de petróleo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A.muertos	% Mortalidad
200	2.3	33	2	5.7143
400	2.6	25	5	16.6667
600	2.77	18	8	30.7692
800	2.9	11	12	52.1739
1000	3	5	17	77.2727

GRÁFICO No.4

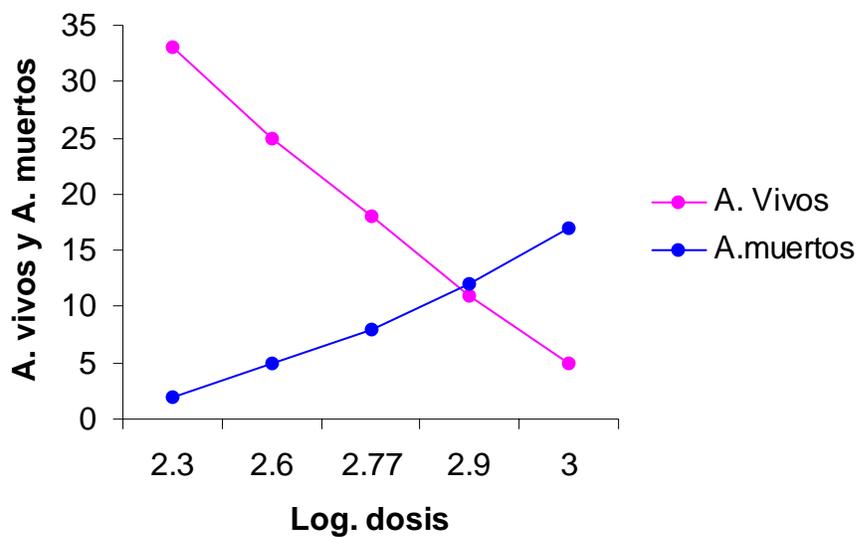




TABLA No. 5

Fracción éter de petróleo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	17	5	22.7273
400	2.6	12	11	47.8261
600	2.77	8	18	69.2308
800	2.9	5	25	83.3333
1000	3	2	33	94.2857

GRÁFICO No.5

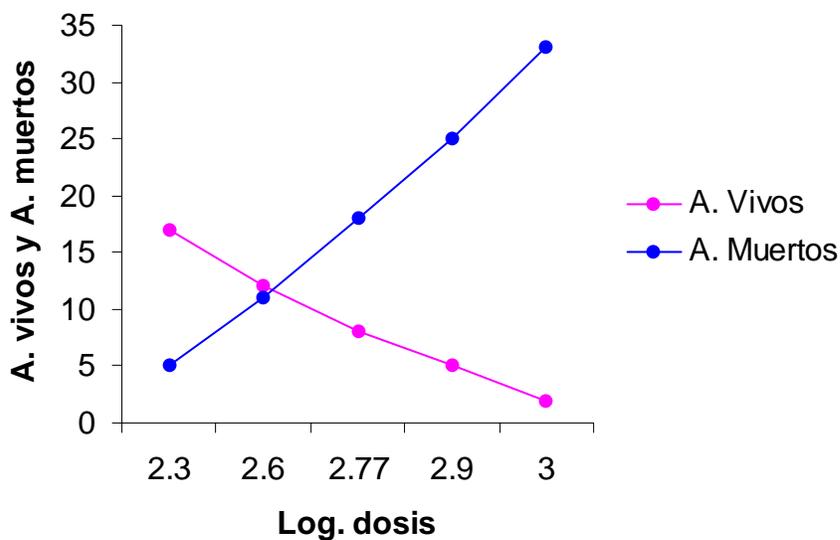




TABLA No. 6

Fracción éter de petróleo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	0	10	100.0000
400	2.6	0	20	100.0000
600	2.77	0	30	100.0000
800	2.9	0	40	100.0000
1000	3	0	50	100.0000

GRÁFICO No.6

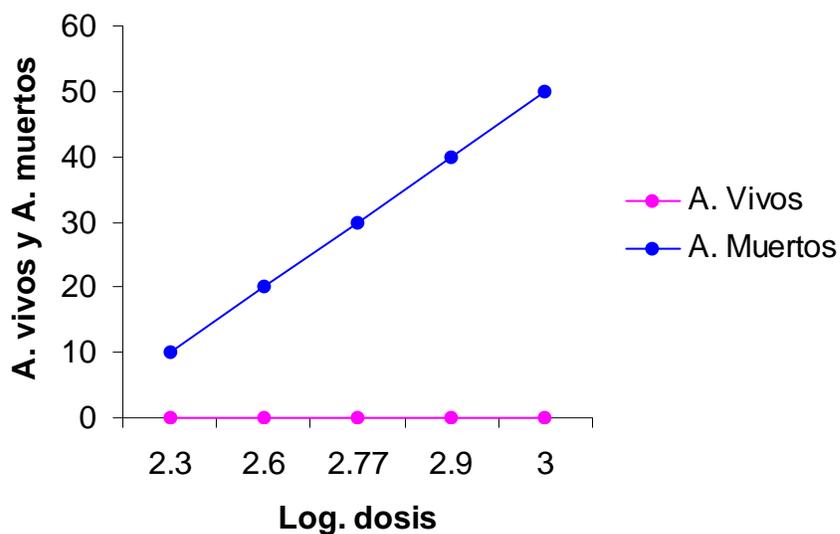




TABLA No. 7

Fracción acetato de etilo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	36	2	5.2632
400	2.6	28	4	12.5000
600	2.77	20	7	25.9259
800	2.9	13	10	43.4783
1000	3	6	14	70.0000

GRÁFICO No.7

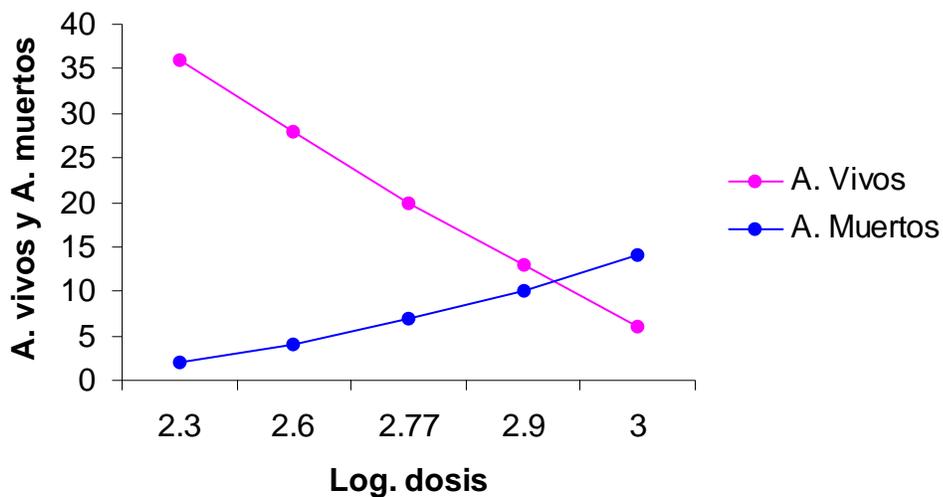




TABLA No. 8

Fracción acetato de etilo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	23	4	14.8148
400	2.6	17	9	34.6154
600	2.77	12	14	53.8462
800	2.9	7	20	74.0741
1000	3	3	27	90.0000

GRÁFICO No.8

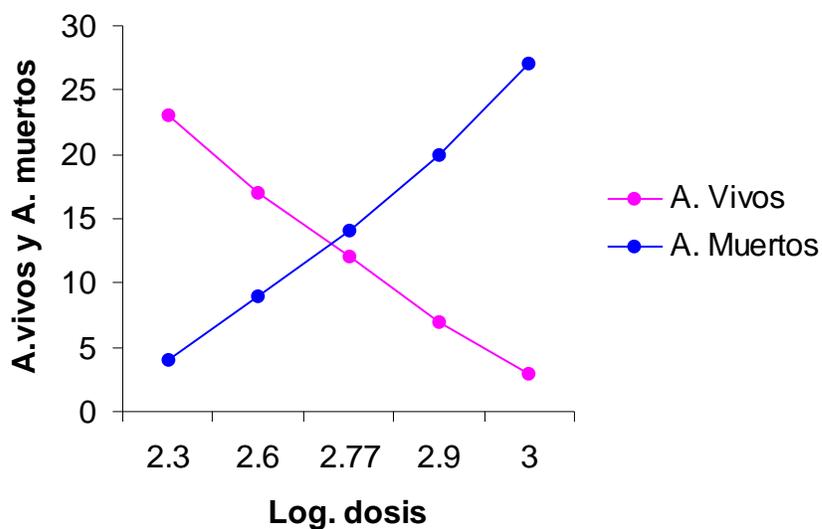


TABLA No. 9



Fracción acetato de etilo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	0	10	100.0000
400	2.6	0	20	100.0000
600	2.77	0	30	100.0000
800	2.9	0	40	100.0000
1000	3	0	50	100.0000

GRÁFICO No.9

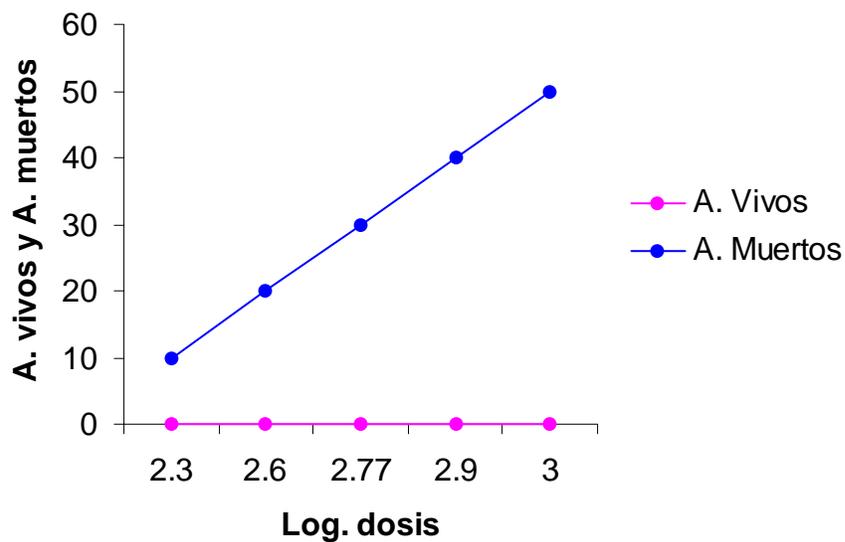




TABLA No. 10

Fracción cloroformo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	38	1	2.5641
400	2.6	29	3	9.375
600	2.77	21	5	19.2308
800	2.9	13	8	38.0952
1000	3	6	12	66.6667

GRÁFICO No.10

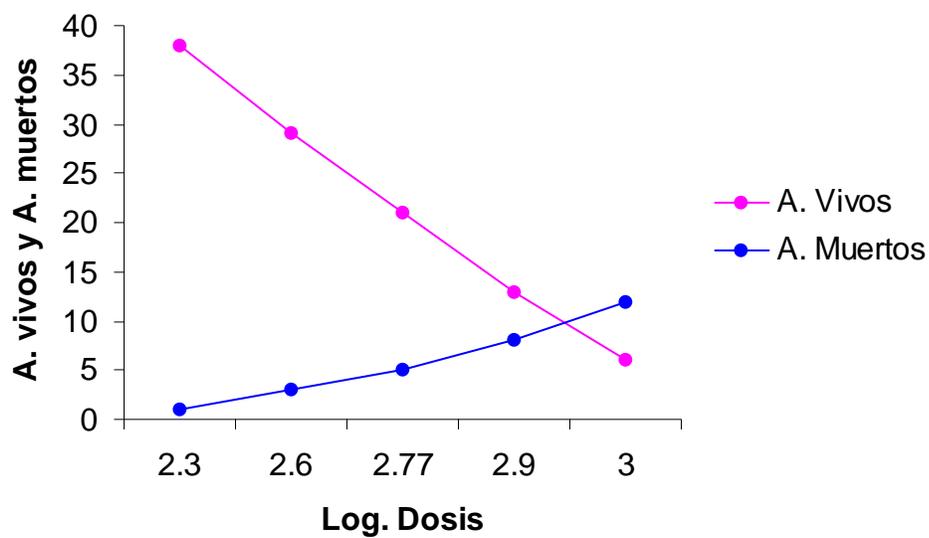




TABLA No. 11

Fracción cloroformo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 12 Horas

ppm	log. Dosis	A. Vivos	A.muertos	% Mortalidad
200	2.3	21	5	19.2308
400	2.6	16	10	38.4615
600	2.77	11	16	59.2593
800	2.9	7	22	75.8621
1000	3	3	29	90.6250

GRÁFICO No.11

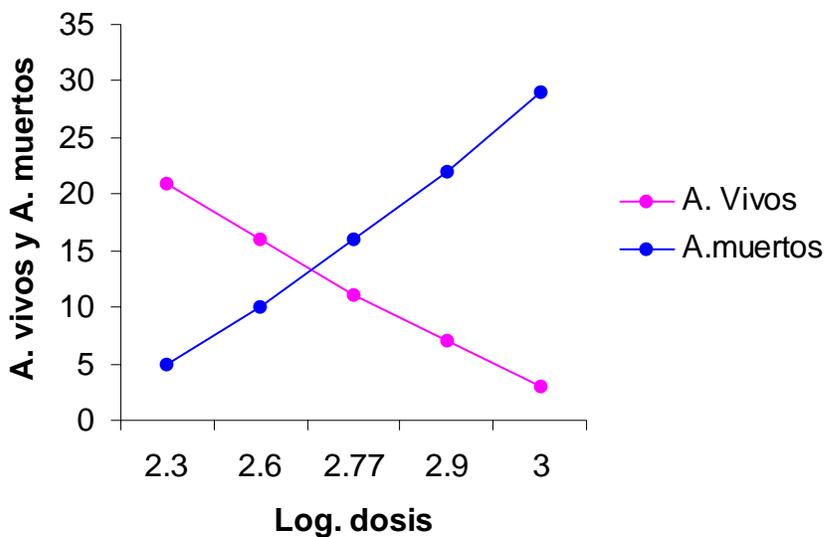




TABLA No. 12

Fracción cloroformo de la especie *Citrus aurantifolia*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A.vivos	A. Muertos	%Mortalidad
200	2.3	2	9	81.8182
400	2.6	1	18	94.7368
600	2.77	0	28	100.0000
800	2.9	0	38	100.0000
1000	3	0	48	100.0000

GRÁFICO No.12

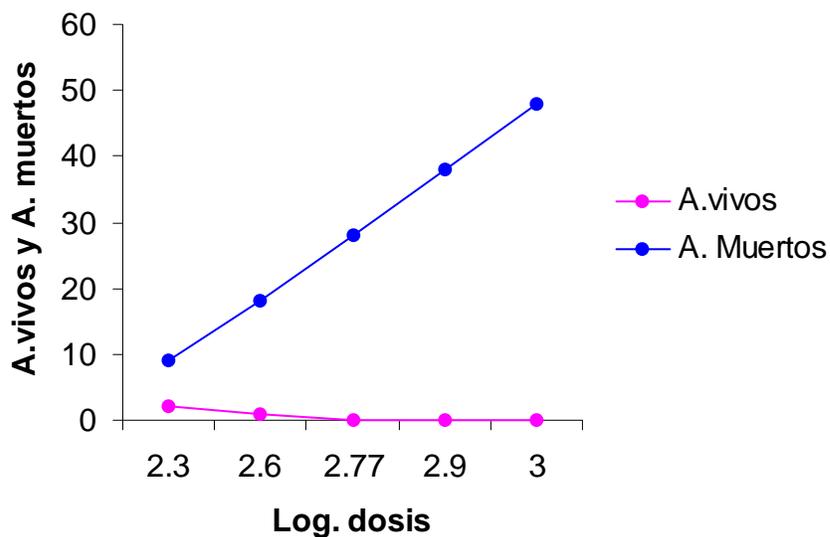




TABLA No.13

Extracto crudo de la especie *Catharathus roseus*  
Lectura: 6 Horas

ppm	log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	40	1	2.439
400	2.6	31	3	8.8235
600	2.77	23	5	17.8571
800	2.9	15	7	31.8182
1000	3	7	10	58.8235

GRÁFICO No.13

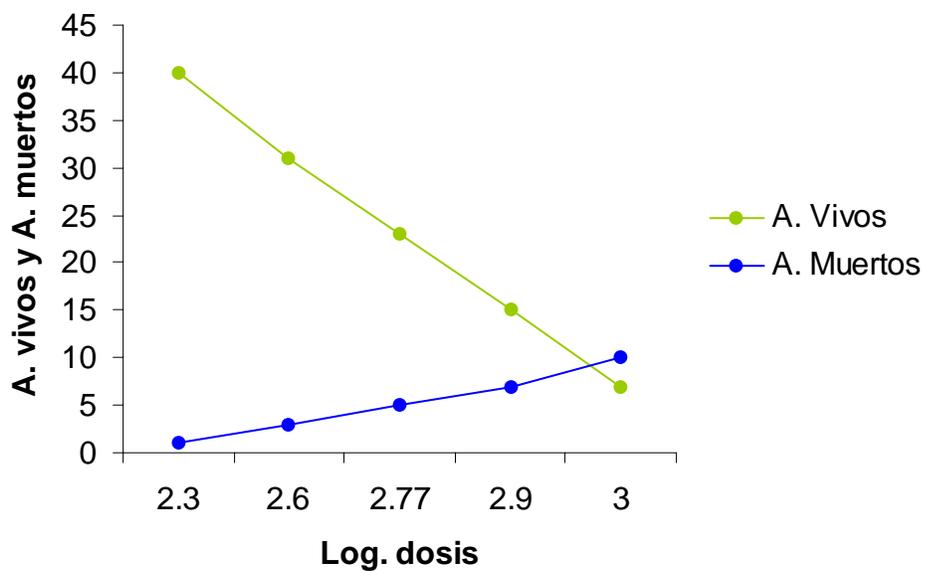




TABLA No. 14

Extracto crudo de la especie *Catharathus roseus*  
Lectura: 12 Horas

ppm	log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	30	3	9.0909
400	2.6	23	7	23.3333
600	2.77	17	11	39.2857
800	2.9	11	15	57.6923
1000	3	5	20	80.0000

GRÁFICO No.14

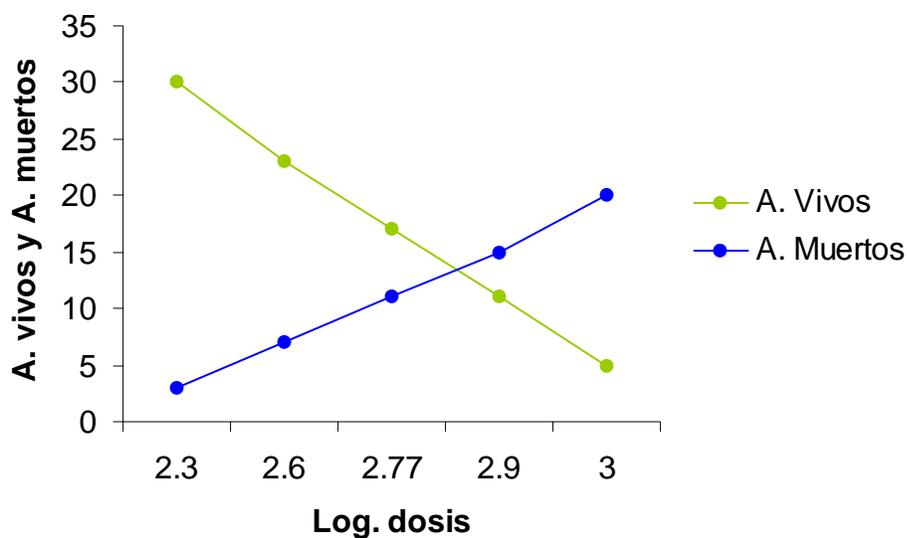




TABLA No. 15

Extracto crudo de la especie *Catharathus roseus*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A.muertos	% Mortalidad
200	2.3	5	8	61.5385
400	2.6	3	17	85.0000
600	2.77	2	26	92.8571
800	2.9	1	35	97.2222
1000	3	0	45	100.0000

GRÁFICO No.15

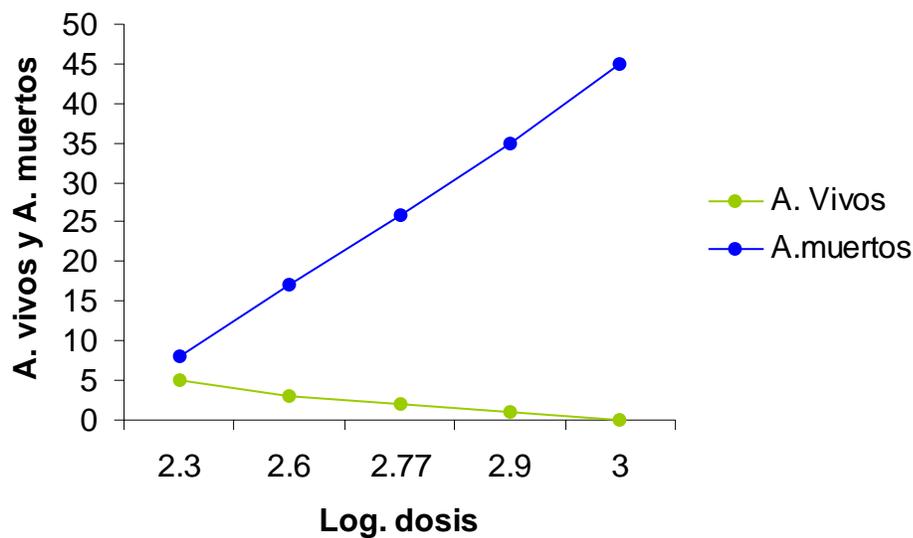




TABLA No. 16

Fracción éter de petróleo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	40	1	2.4390
400	2.6	31	2	6.0606
600	2.77	22	4	15.3846
800	2.9	14	7	33.3333
1000	3	7	10	58.8235

GRÁFICO No.16

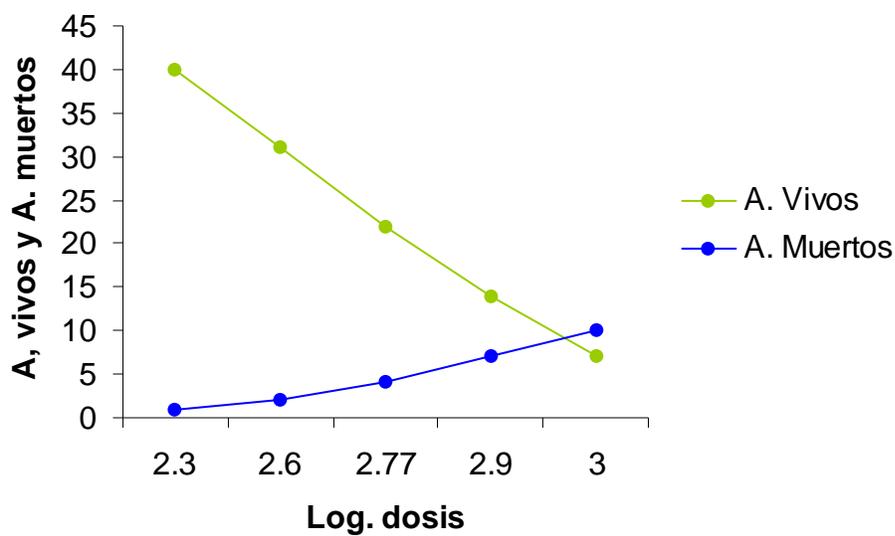




TABLA No. 17

Fracción éter de petróleo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	30	3	9.0909
400	2.6	23	6	20.6897
600	2.77	16	10	38.4615
800	2.9	10	15	60.0000
1000	3	5	20	80.0000

GRÁFICO No.17

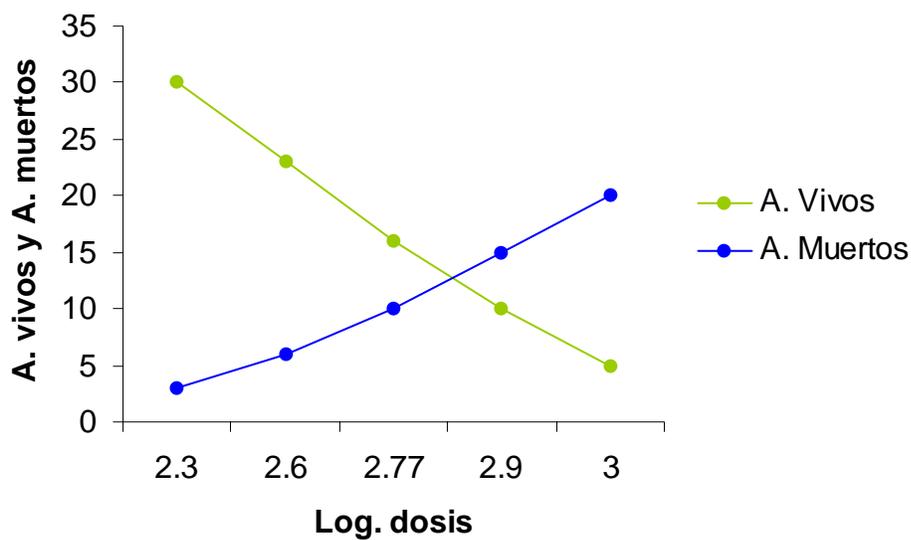




TABLA No.18

Fracción éter de petróleo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	7	7	50.0000
400	2.6	4	14	77.7778
600	2.77	1	23	95.8333
800	2.9	0	33	100.0000
1000	3	0	43	100.0000

GRÁFICO No.18

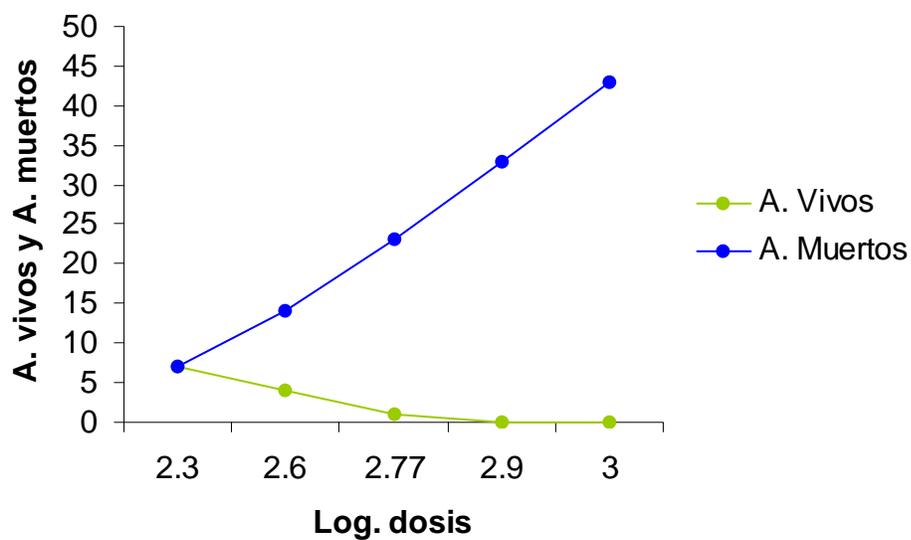




TABLA No.19

Fracción acetato de etilo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	44	0	0.0000
400	2.6	34	1	2.8571
600	2.77	25	2	7.4074
800	2.9	16	3	15.7895
1000	3	7	6	46.1538

GRÁFICO No.19

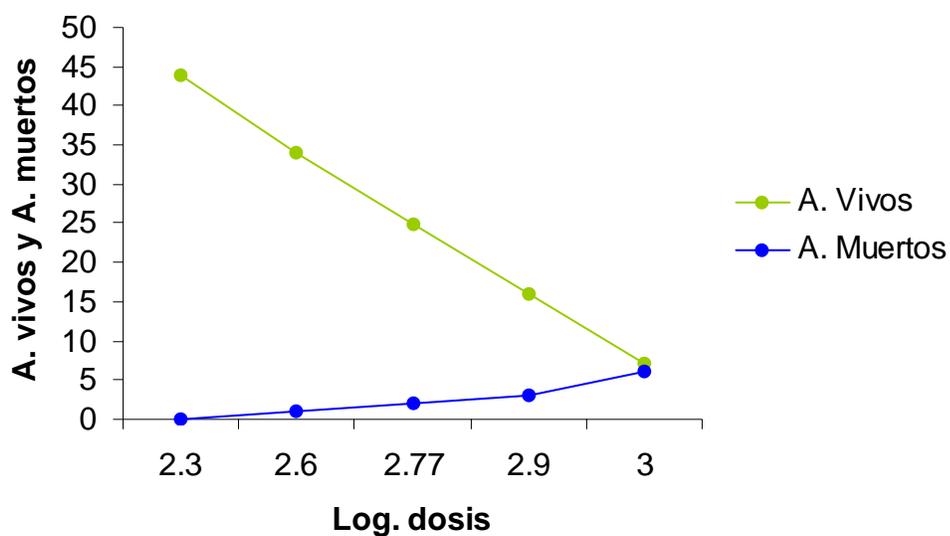




TABLA No. 20

Fracción acetato de etilo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	35	1	2.7778
400	2.6	26	3	10.3448
600	2.77	18	5	21.7391
800	2.9	10	9	47.3684
1000	3	4	15	78.9474

GRÁFICO No.20

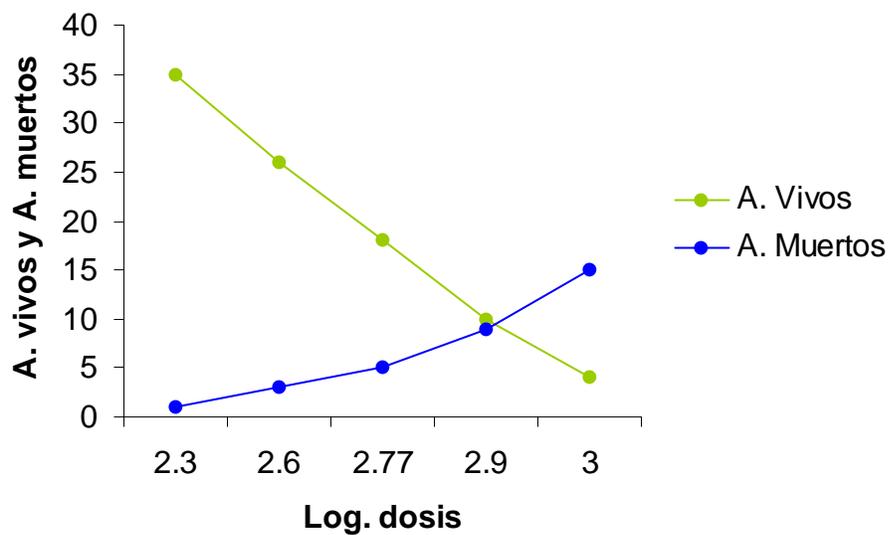




TABLA No. 21

Fracción acetato de etilo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	12	4	25.0000
400	2.6	6	12	66.6667
600	2.77	4	20	83.3333
800	2.9	2	29	93.5484
1000	3	1	38	97.4359

GRÁFICO No.21

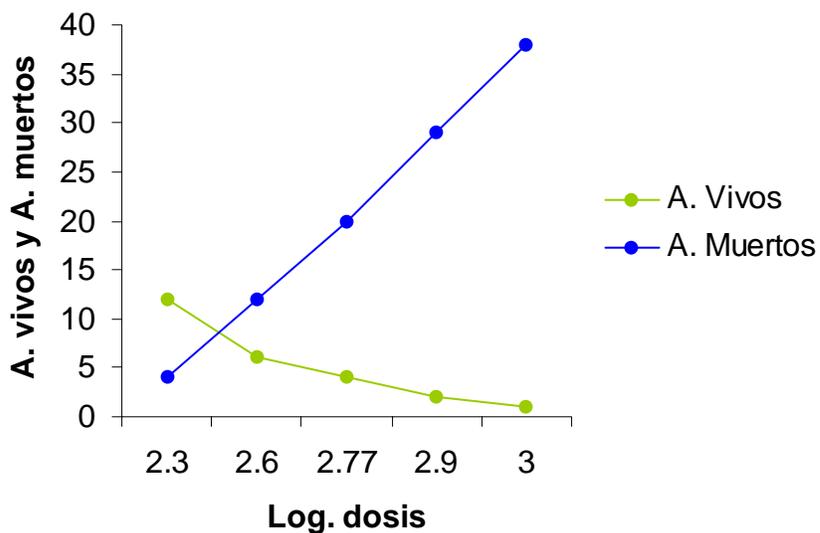




TABLA No. 22

Fracción cloroformo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	44	0	0.0000
400	2.6	34	1	2.8571
600	2.77	25	2	7.4074
800	2.9	16	4	20.0000
1000	3	8	6	42.8571

GRÁFICO No.22

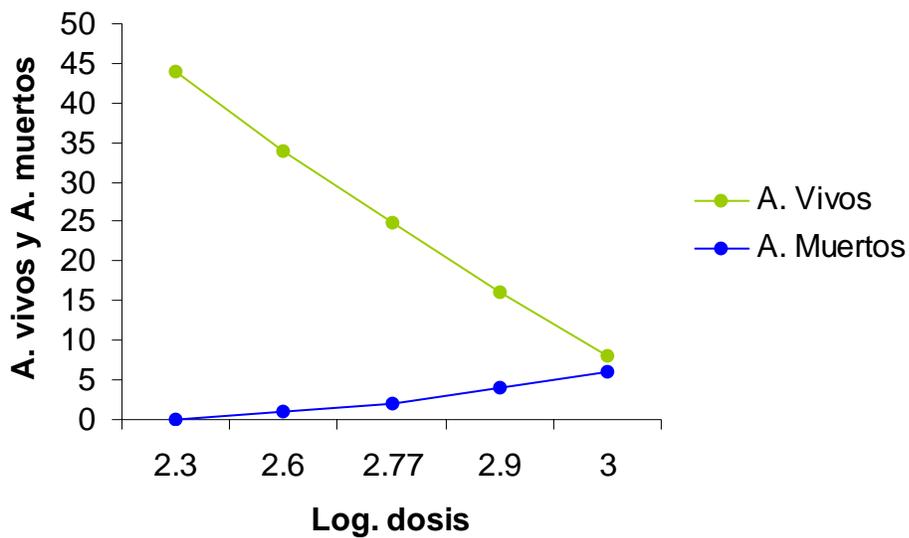


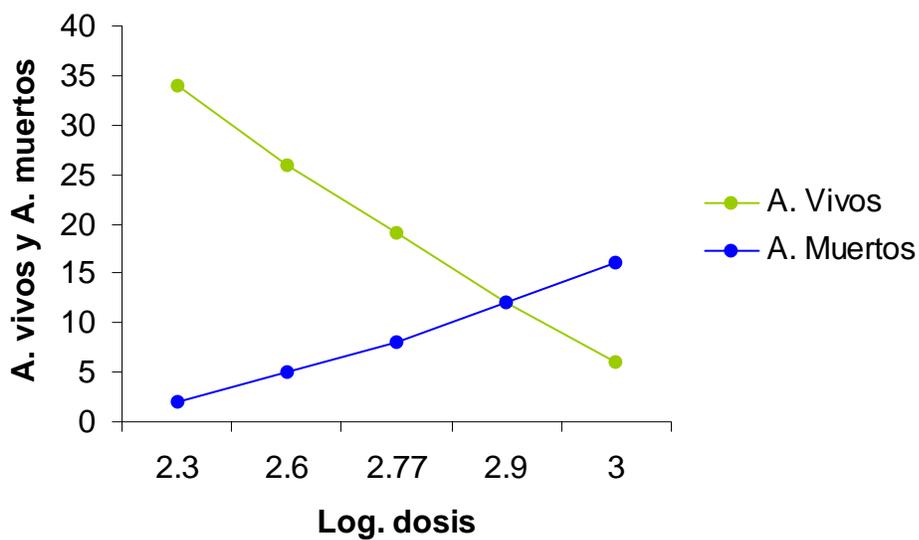


TABLA No. 23

Fracción cloroformo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log.dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	34	2	5.5556
400	2.6	26	5	16.1290
600	2.77	19	8	29.6296
800	2.9	12	12	50.0000
1000	3	6	16	72.7273

GRÁFICO No.23





**TABLA No. 24**

Fracción cloroformo de la especie *Catharanthus roseus*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	14	5	26.3158
400	2.6	9	12	57.1429
600	2.77	6	19	76.0000
800	2.9	3	27	90.0000
1000	3	1	36	97.2973

**GRÁFICO No.24**

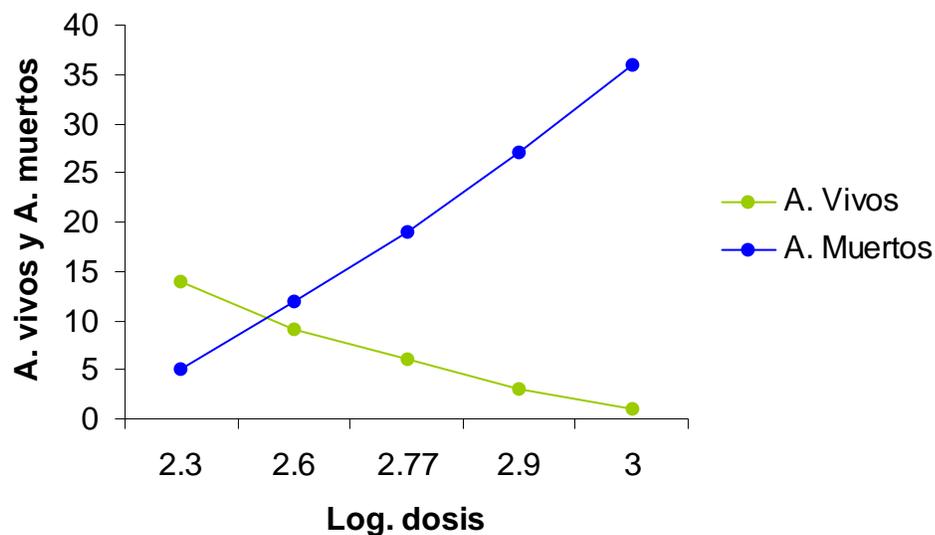




TABLA No. 25

Extracto crudo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	41	0	0.0000
400	2.6	31	1	3.1250
600	2.77	22	3	12.0000
800	2.9	14	6	30.0000
1000	3	7	9	56.2500

GRÁFICO No.25

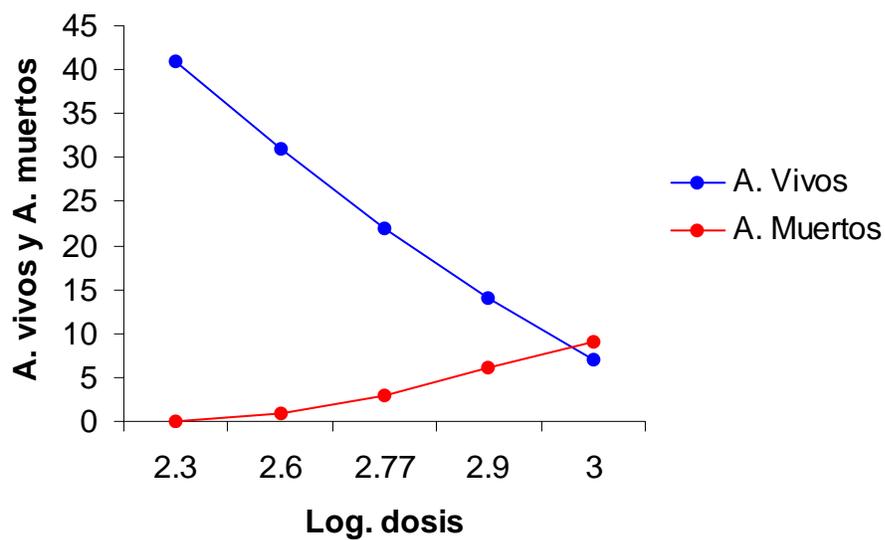




TABLA No. 26

Extracto crudo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	35	2	5.4054
400	2.6	27	4	12.9032
600	2.77	19	7	26.9231
800	2.9	12	11	47.8261
1000	3	6	15	71.4286

GRÁFICO No.26

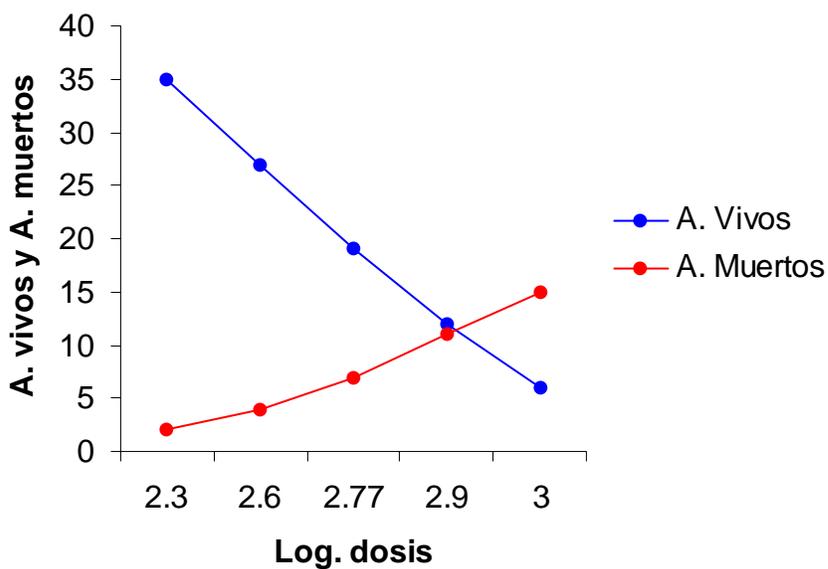




TABLA No. 27

Extracto crudo de la especie *Tabebuia rosea*

Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. muertos	% Mortalidad
200	2.3	6	8	57.1429
400	2.6	4	16	80.0000
600	2.77	2	25	92.5926
800	2.9	1	34	97.1429
1000	3	0	44	100.0000

GRÁFICO No. 27

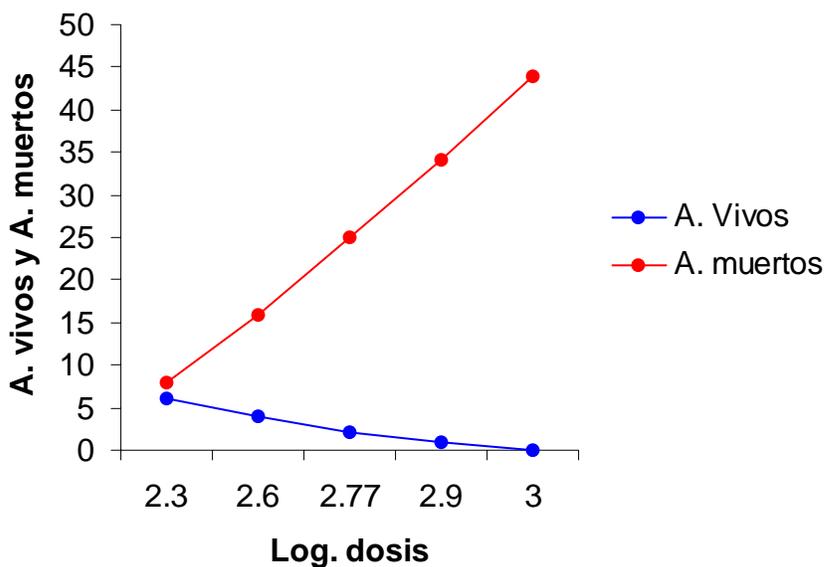




TABLA No. 28

Fracción éter de petróleo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	%Mortalidad
200	2.3	40	1	2.4390
400	2.6	31	2	6.0606
600	2.77	22	4	15.3846
800	2.9	14	7	33.3333
1000	3	7	10	58.8235

GRÁFICO No. 28

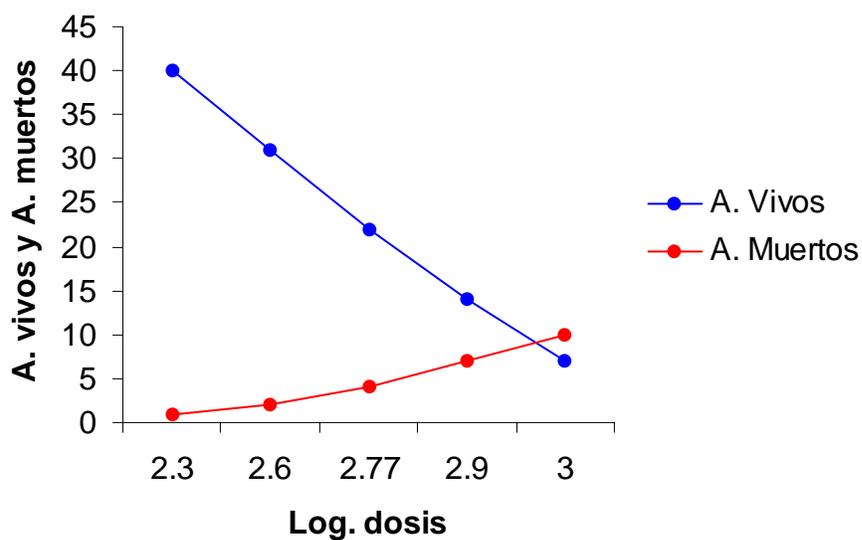




TABLA No. 29

Fracción éter de petróleo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	30	3	9.0909
400	2.6	23	6	20.6897
600	2.77	16	10	38.4615
800	2.9	10	15	60.0000
1000	3	5	20	80.0000

GRÁFICO No. 29

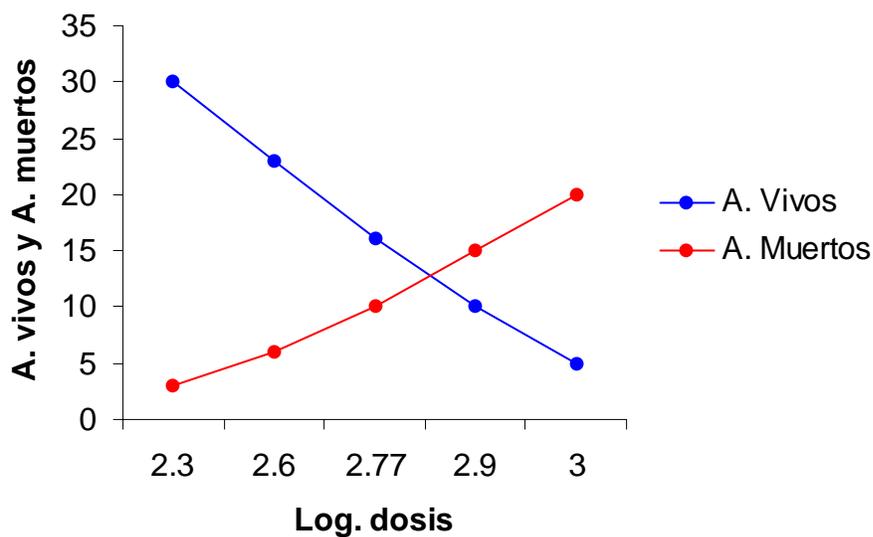


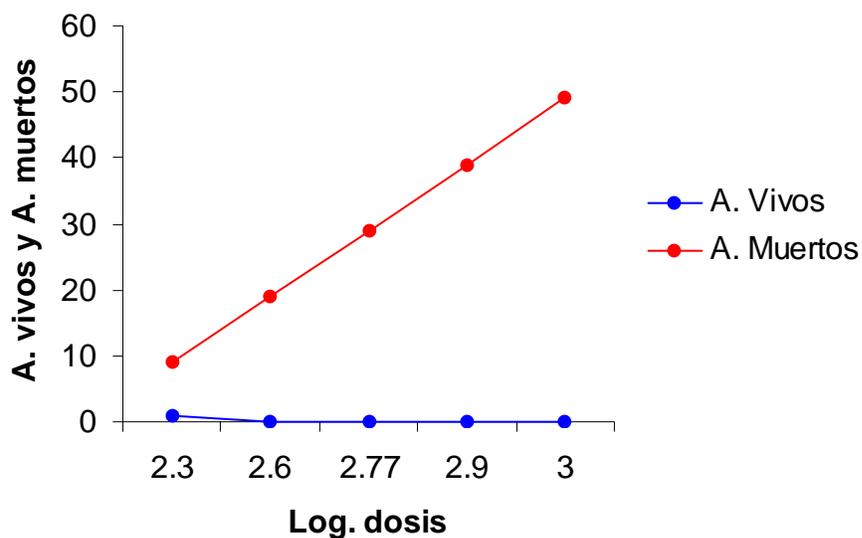


TABLA No. 30

Fracción éter de petróleo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	1	9	90.0000
400	2.6	0	19	100.0000
600	2.77	0	29	100.0000
800	2.9	0	39	100.0000
1000	3	0	49	100.0000

GRÁFICO No.30





**TABLA No. 31**

Fracción acetato de etilo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 6 Horas

ppm	log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	40	1	2.4390
400	2.6	31	2	6.0606
600	2.77	22	4	15.3846
800	2.9	14	7	33.3333
1000	3	7	10	58.8235

**GRÁFICO No. 31**

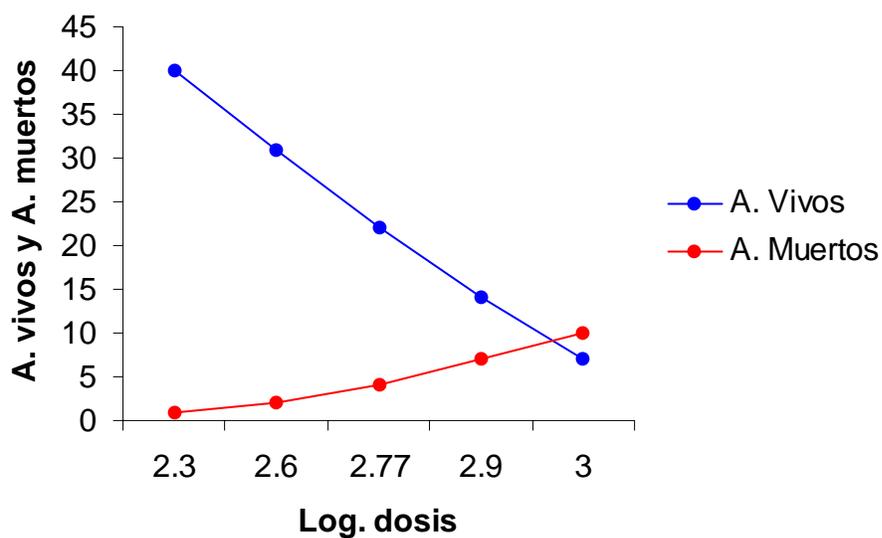




TABLA No. 32

Fracción acetato de etilo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 12 Horas

ppm	log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	30	3	9.0909
400	2.6	23	6	20.6897
600	2.77	16	10	38.4615
800	2.9	10	15	60.0000
1000	3	5	20	80.0000

GRÁFICO No. 32

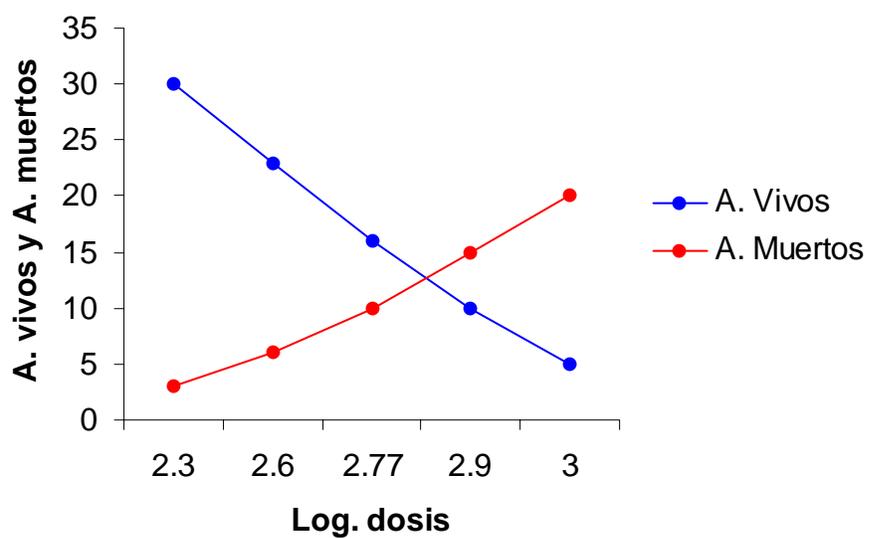




TABLA No. 33

Fracción acetato de etilo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 24 Horas

ppm	log.dosis	A.vivos	A.muertos	%Mortalidad
200	2.3	1	9	90.0000
400	2.9	0	19	100.0000
600	2.77	0	29	100.0000
800	2.6	0	39	100.0000
1000	2.3	0	49	100.0000

GRÁFICO No. 33

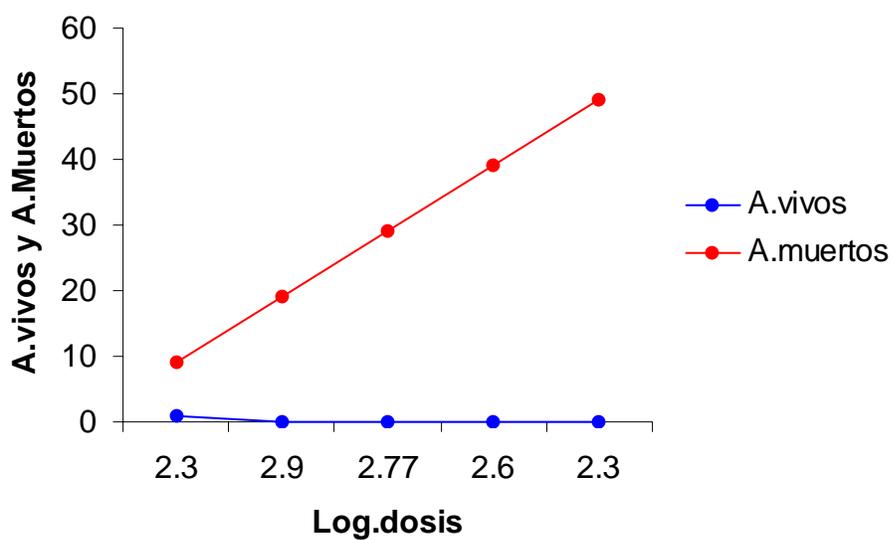




TABLA No. 34

Fracción cloroformo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 6 Horas

ppm	log.dosis	A.vivos	A.muertos	%Mortalidad
200	2.3	36	2	5.2632
400	2.6	28	4	12.5000
600	2.7	20	7	25.9259
800	2.9	13	10	43.4783
1000	3	6	14	70.0000

GRÁFICO No. 34

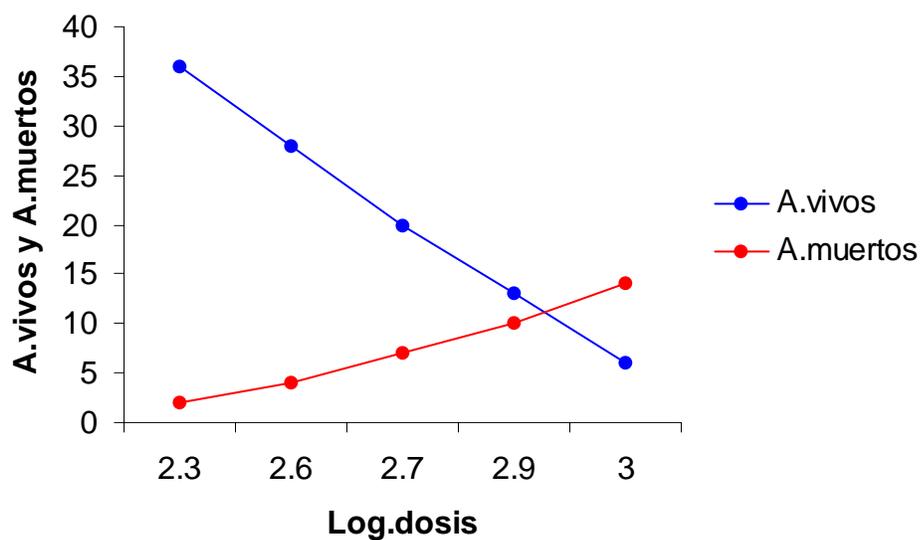




TABLA No. 35

Fracción cloroformo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 12 Horas

ppm	log.dosis	A.vivos	A.muertos	%mortalidad
200	2.3	18	5	21.7391
400	2.6	13	11	45.8333
600	2.77	9	17	65.3846
800	2.9	5	24	82.7586
1000	3	2	32	94.1176

GRÁFICO No. 35

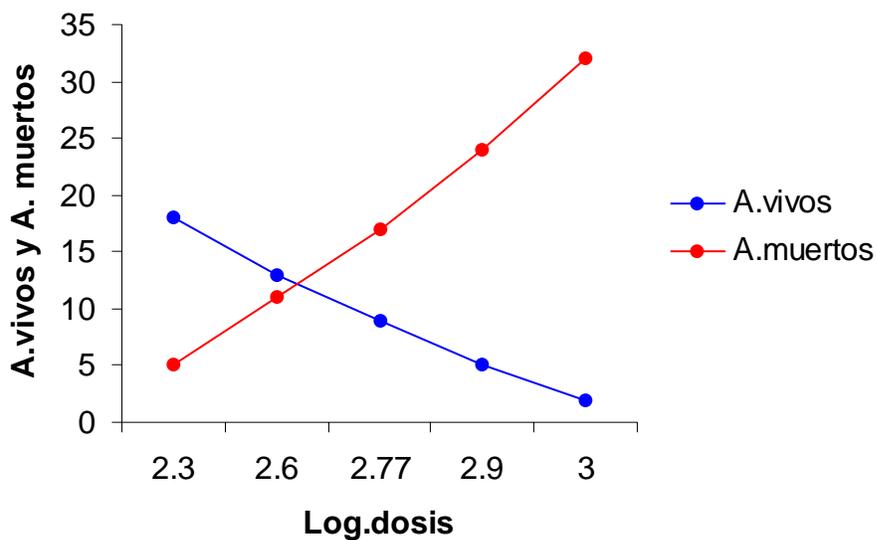




TABLA No. 36

Fracción cloroformo de la especie *Tabebuia rosea*  
Lectura: 24 Horas

ppm	log.dosis	A.vivos	A.muertos	%mortalidad
200	2.3	0	10	100.0000
400	2.6	0	20	100.0000
600	2.77	0	30	100.0000
800	2.9	0	40	100.0000
1000	3	0	50	100.0000

GRÁFICO No. 36

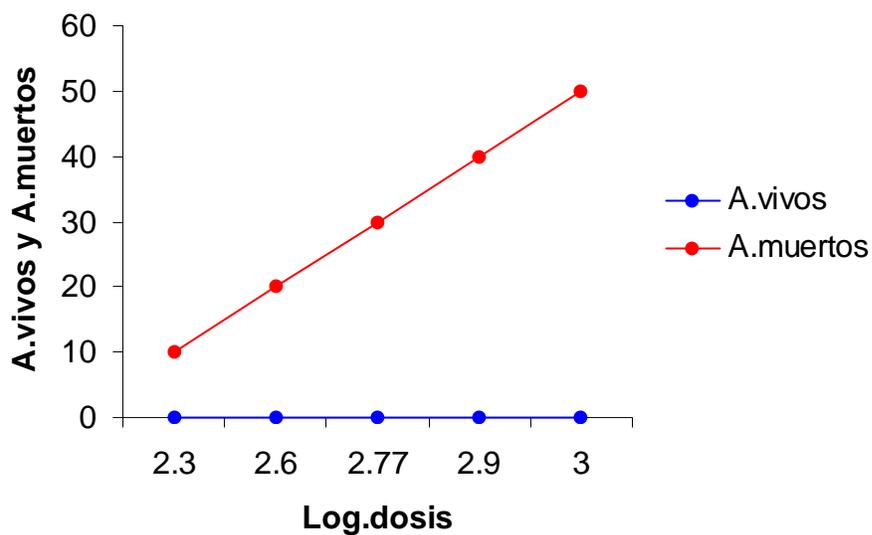




TABLA No. 37

Extracto crudo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A.vivos	A.muertos	% Mortalidad
200	2.3	45	0	0.0000
400	2.6	35	0	0.0000
600	2.77	25	1	3.8462
800	2.9	16	3	15.7895
1000	3	8	5	38.4615

GRÁFICO No. 37

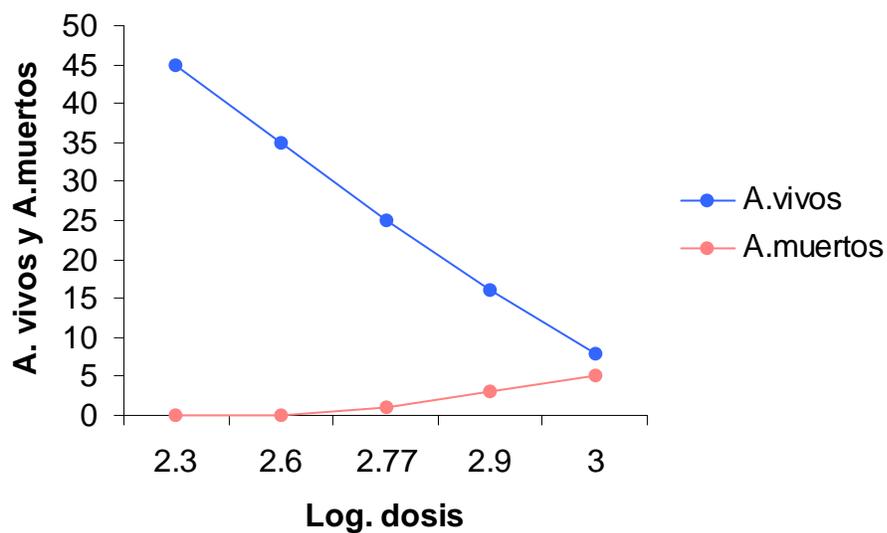




TABLA No. 38

Extracto crudo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	41	0	0.0000
400	2.6	31	1	3.1250
600	2.77	22	3	12.0000
800	2.9	14	6	30.0000
1000	3	7	9	56.2500

GRÁFICO No. 38

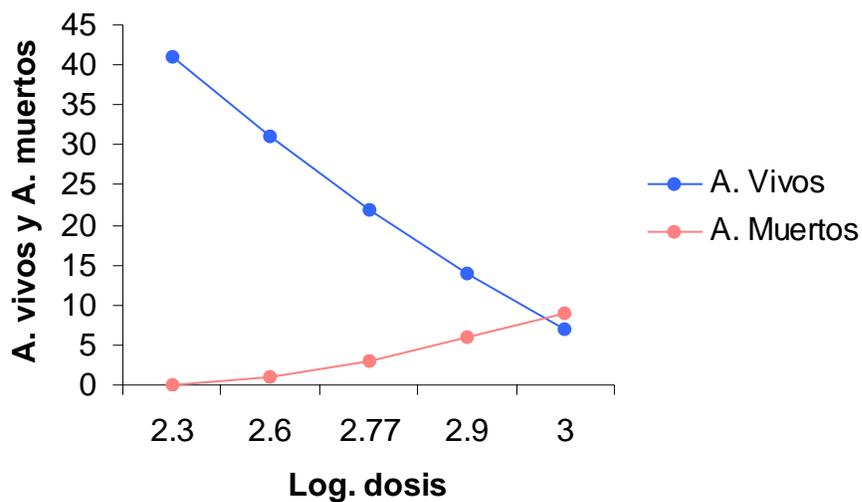




TABLA No. 39

Extracto crudo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A.muertos	% Mortalidad
200	2.3	17	2	10.5263
400	2.6	9	6	40.0000
600	2.77	3	14	82.3529
800	2.9	1	23	95.8333
1000	3	0	33	100.0000

GRÁFICO No. 39

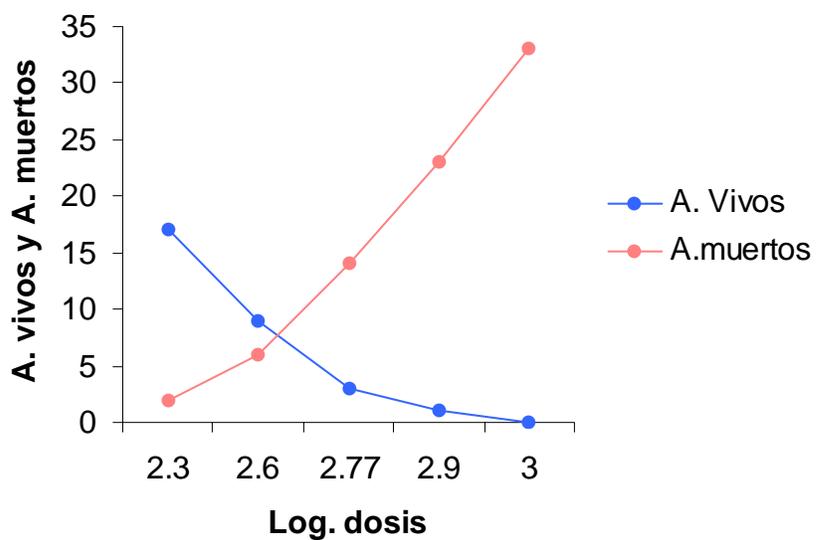




TABLA No. 40

Fracción éter de petróleo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	45	0	0.0000
400	2.6	35	0	0.0000
600	2.77	25	1	3.8462
800	2.9	16	3	15.7895
1000	3	8	5	38.4615

GRÁFICO No. 40

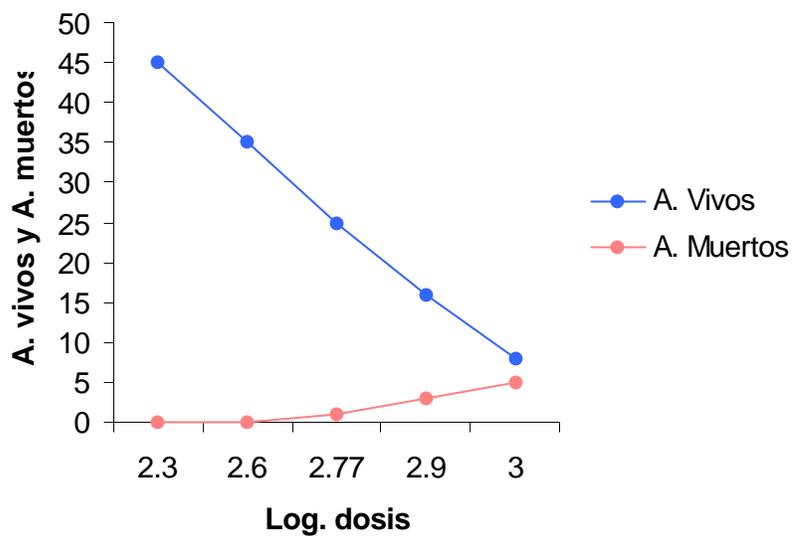




TABLA No. 41

Fracción éter de petróleo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A.vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	41	0	0.0000
400	2.6	31	1	3.1250
600	2.77	22	3	12.0000
800	2.9	14	6	30.0000
1000	3	7	9	56.2500

GRÁFICO No. 41

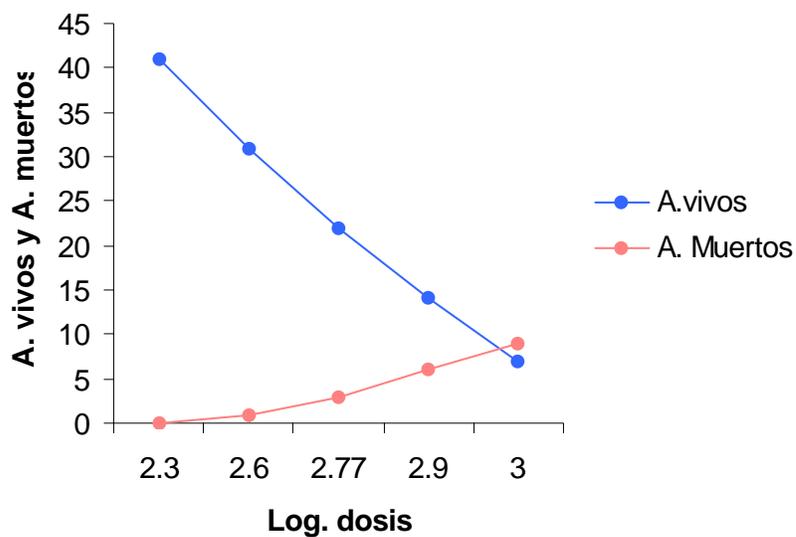




TABLA No. 42

Fracción éter de petróleo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A.vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	16	2	11.1111
400	2.6	8	8	50.0000
600	2.77	4	15	78.9474
800	2.9	1	24	96.0000
1000	3	0	34	100.0000

GRÁFICO No. 42

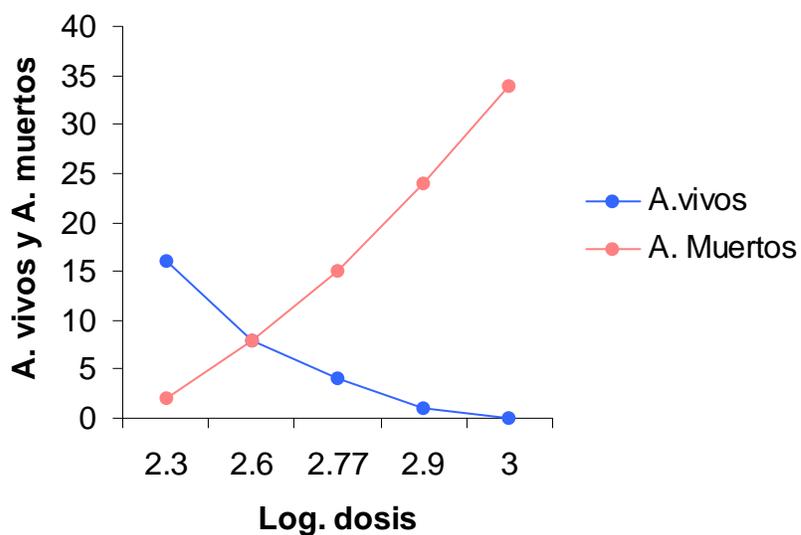




TABLA No. 43

Fracción acetato de etilo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 6 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	44	0	0.0000
400	2.6	34	1	2.8571
600	2.77	25	2	7.4074
800	2.9	16	4	20.0000
1000	3	8	6	42.8571

GRÁFICO No. 43

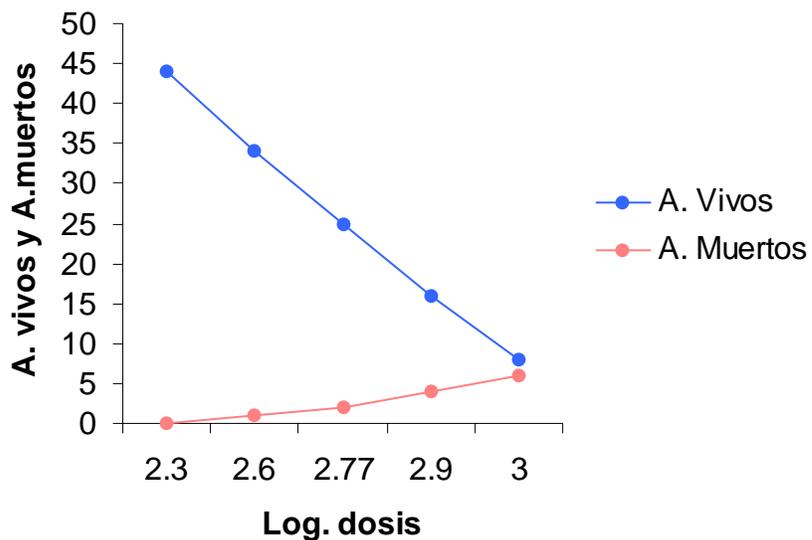




TABLA No. 44

Fracción acetato de etilo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	39	1	2.5
400	2.6	30	3	9.0909
600	2.77	22	5	18.5185
800	2.9	14	8	36.3636
1000	3	7	11	61.1111

GRÁFICO No.44

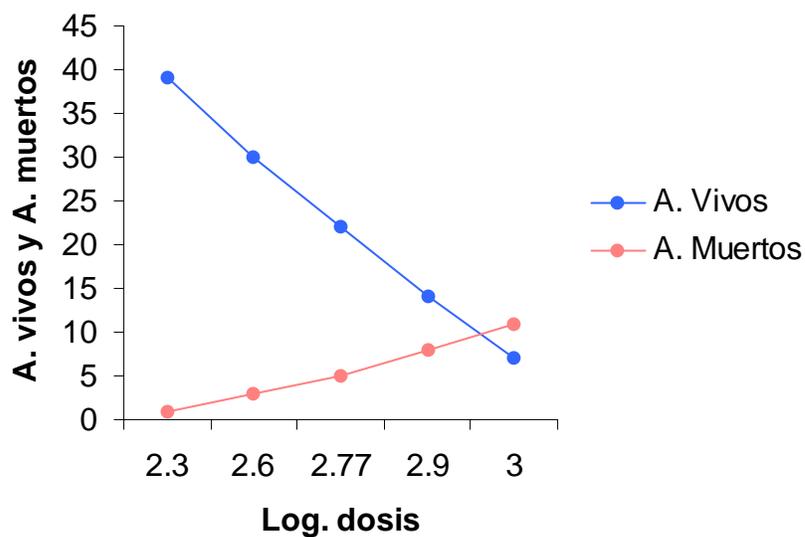




TABLA No. 45

Fracción acetato de etilo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura: 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	17	2	10.5263
400	2.6	9	6	40.0000
600	2.77	3	14	82.3529
800	2.9	1	23	95.8333
1000	3	0	33	100.0000

GRÁFICO No. 45

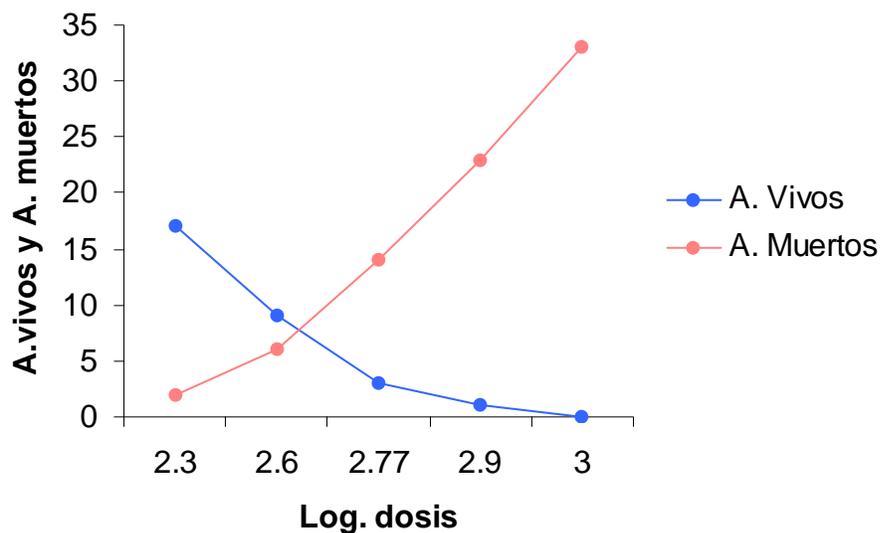




TABLA No. 46

Fracción cloroformo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura : 6 Horas

ppm	Log.dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	48	0	0.0000
400	2.6	38	0	0.0000
600	2.77	28	0	0.0000
800	2.9	18	1	5.2632
1000	3	9	2	18.1818

GRÁFICO No. 46

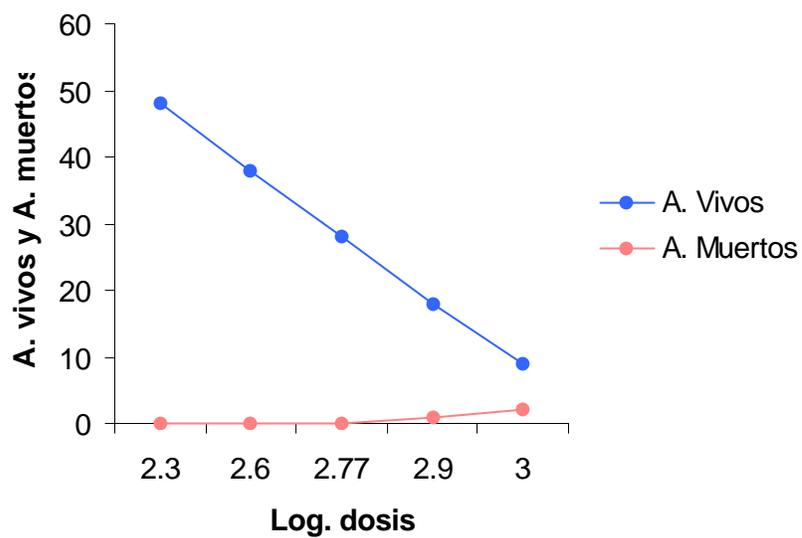




TABLA No. 47

Fracción cloroformo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura : 12 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	% Mortalidad
200	2.3	39	1	2.5000
400	2.6	30	3	9.0909
600	2.77	22	5	18.5185
800	2.9	14	8	36.3636
1000	3	7	11	61.1111

GRÁFICO No. 47

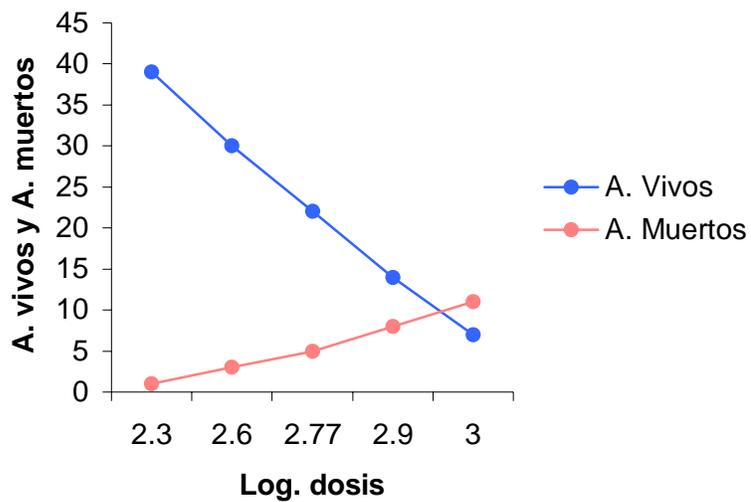




TABLA No. 48

Fracción cloroformo de la especie *Pouteria sapota*  
Lectura : 24 Horas

ppm	Log. Dosis	A. Vivos	A. Muertos	%Mortalidad
200	2.3	12	4	25.0000
400	2.6	6	12	66.6667
600	2.77	4	20	83.3333
800	2.9	2	29	93.5484
1000	3	1	38	97.4359

GRÁFICO No. 48

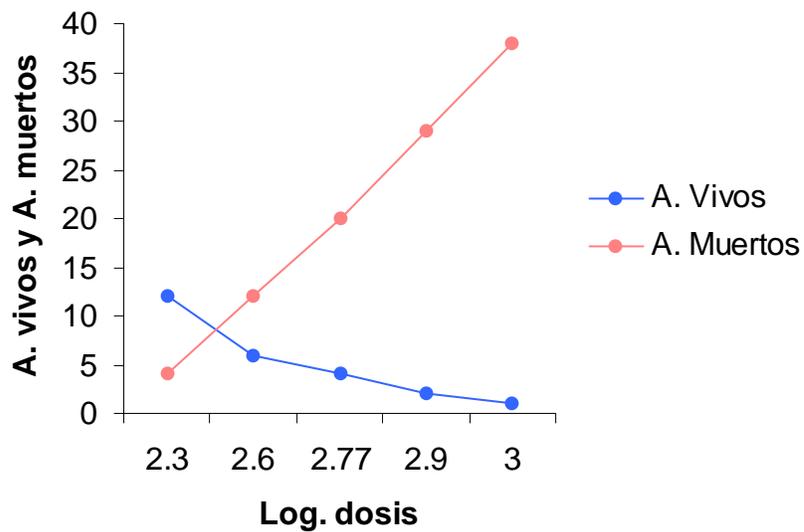




Tabla No. 49

LOG DL<sub>50</sub> e intervalo de confianza y error estándar del bioensayo de *Artemia salina* en 4 especies vegetales a las 6 horas de exposición.

Nombre científico y familia	Fracciones	LOG DL <sub>50</sub> (95% I. C )	E. E.
<i>Citrus aurantifolia</i> ( Rutaceae )	Extracto Crudo	2.85(3.35-2.342)	0.250
	Éter de Petróleo	2.85(3.32-2.278)	0.236
	Acetato de etilo	2.937(3.481-2.393)	0.272
	Cloroformo	2.938(3.423-2.451)	0.216
<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	Extracto Crudo	2.97(3.43-2.50)	0.234
	Éter de Petróleo	2.97(3.43-2.50)	0.234
	Acetato de etilo	3(3.30-2.69)	0.153
	Cloroformo	3.4(N. S. D. )	N. S. D.
<i>Tabebuia rosea</i> (Bignoniaceae)	Extracto Crudo	2.98(3.43-2.53)	0.225
	Éter de Petróleo	2.97(3.439-2.5)	0.2348
	Acetato de etilo	2.97(3.688-2.112)	0.244
	Cloroformo	2.925(3.493-2.356)	0.2841
<i>Pouteria sapota</i> ( Sapotaceae)	Extracto Crudo	3.075(N. S. D. )	N. S. D.
	Éter de Petróleo	3.075(N. S. D. )	N. S. D.
	Acetato de etilo	3.025( N. S. D. )	N. S. D.
	Cloroformo	3.045( N. S. D. )	N. S. D.

LOG DL<sub>50</sub> ( 95% I. C )= LOG DL<sub>50</sub> ± 2 SE DL<sub>50</sub>

E. E. = Error Estándar

SE DL<sub>50</sub>= 0.79xhxR/n

N. S. D. = No se determinó.



Tabla No. 50

LOG DL<sub>50</sub> e intervalo de confianza y error estándar del bioensayo de *Artemia salina* en 4 especies vegetales a las 12 horas de exposición.

Nombre científico y familia	Fracciones	LOG DL <sub>50</sub> (95% I. C )	E. E.
<i>Citrus aurantifolia</i> ( Rutaceae )	Extracto Crudo	2.675(3.314-2.034)	0.321
	Éter de Petróleo	2.66(3.292-2.028)	0.316
	Acetato de etilo	2.725(3.289-2.161)	0.282
	Cloroformo	2.937(3.423-2.451)	0.329
<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	Extracto Crudo	2.85(3.41-2.28)	0.282
	Éter de Petróleo	2.84(3.37-2.30)	0.266
	Acetato de etilo	2.91(3.31-2.50)	0.202
	Cloroformo	2.9(3.44-2.35)	0.274
<i>Tabebuia rosea</i> (Bignoniaceae)	Extracto Crudo	2.91(3.41-2.41)	0.250
	Éter de Petróleo	2.84(3.322-2.077)	0.3114
	Acetato de etilo	2.84(3.34-2.34)	0.250
	Cloroformo	2.65(3.273-2.026)	0.3116
<i>Pouteria sapota</i> ( Sapotaceae)	Extracto Crudo	2.96(3.435-2.535)	0.2250
	Éter de Petróleo	2.96(3.463-2.456)	0.2519
	Acetato de etilo	2.955(3.425-2.525)	0.2250
	Cloroformo	2.955(3.440-2.469)	0.2428

LOG DL<sub>50</sub> ( 95% I. C )= LOG DL<sub>50</sub> ± 2 SE DL<sub>50</sub>

E. E. = Error Estándar

SE DL<sub>50</sub>= 0.79xhxR/n

N. S. D. = No se determinó.



Tabla No. 51

LOG DL<sub>50</sub> e intervalo de confianza y error estándar del bioensayo de *Artemia salina* en 4 especies vegetales a las 24 horas de exposición.

Nombre científico y familia	Fracciones	LOG DL <sub>50</sub> (95% I. C )	E. E.
<i>Citrus aurantifolia</i> ( Rutaceae )	Extracto Crudo	2( N. S. D. )	N. S. D.
	Éter de Petróleo	2( N. S. D. )	N. S. D.
	Acetato de etilo	2.1( N. S. D. )	N. S. D.
	Cloroformo	2.2( N. S. D. )	N. S. D.
<i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae)	Extracto Crudo	2.2( N. S. D. )	N. S. D.
	Éter de Petróleo	2.3( N. S. D. )	N. S. D.
	Acetato de etilo	2.48(3.31-1.64)	0.416
	Cloroformo	2.51(3.38-1.63)	0.438
<i>Tabebuia rosea</i> (Bignoniaceae)	Extracto Crudo	2.23( N. S. D. )	N. S. D.
	Éter de Petróleo	2.0875( N. S. D. )	N. S. D.
	Acetato de etilo	2.0875( N. S. D. )	N. S. D.
	Cloroformo	2( N. S. D. )	N. S. D.
<i>Pouteria sapota</i> ( Sapotaceae)	Extracto Crudo	2.648(3.135-2.160)	0.2438
	Éter de Petróleo	2.6(3.119-2.081)	0.2595
	Acetato de etilo	2.648(3.148-2.141)	0.2516
	Cloroformo	2.465(3.026-1.903)	0.2806

LOG DL<sub>50</sub> ( 95% I. C )= LOG DL<sub>50</sub> ± 2 SE DL<sub>50</sub>

E. E. = Error Estándar

SE DL<sub>50</sub>= 0.79xhxR/n

N. S. D. = No se determinó.



**TABLA 52**

**REACCIONES DE COLORACIÓN**

Pruebas generales de alcaloides

Método	Procedimiento	Especie V.	Fracción	C.E	C. D	R
Dragendorff	a: 8g Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O / 20 ml HNO <sub>3</sub> b: 27.2 g KI / 50 ml H <sub>2</sub> O  Mezclar, reposar, decantar, diluir a 100 ml.	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Rojo	rojo	+
			éter de P.		rojo	+
			Acetato E.		rojo	+
			Cloroformo		verde	-
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.	a	rojo	+
			éter de P.		rojo	+
			Acetato E.		rojo	+
			Cloroformo		verde	-
		<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.	Naranja	rojo	+
			éter de P.		rojo	+
			Acetato E.		rojo	+
			Cloroformo		café	-
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		amarillo	-
			éter de P.		amarillo	-
			Acetato E.		amarillo	-
			Cloroformo		amarillo	-
Mayer	a: 1.36 g HgCl <sub>2</sub> / 60 ml H <sub>2</sub> O b: 5 g KI / 10 ml H <sub>2</sub> O Mezclar. Diluir a 100 ml	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Blanco	Crema	+
			éter de P.		Crema	+
			Acetato E.		Crema	+
			Cloroformo		verde	-
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.	a	Crema	+
			éter de P.		Crema	+
			Acetato E.		Crema	+
			Cloroformo		verde	-
		<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.	Crema	Crema	+
			éter de P.		Crema	+
			Acetato E.		Crema	+
			Cloroformo		café	-
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		rojo	-
			éter de P.		rojo	-
			Acetato E.		rojo	-
			Cloroformo		rojo	-



CONTINUACIÓN (TABLA No. 52)

Método	Procedimiento	Especie V.	Fracción	C.E	C. D	R
Wagner	1.27 g I <sub>2</sub> + 2g KI / 5ml H <sub>2</sub> O. Diluir a 100 ml	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Marrón	Marrón	+
			éter de P.		Marrón	+
			Acetato E.		Marrón	+
			Cloroformo		Marrón	+
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.		Marrón	+
			éter de P		Marrón	+
			Acetato E		Marrón	+
			Cloroformo		Marrón	+
		<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.		Marrón	+
			éter de P		Marrón	+
			Acetato E		Marrón	+
			Cloroformo		Marrón	+
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		Marrón	+
			éter de P		Marrón	+
			Acetato E		Marrón	+
			Cloroformo		Marrón	+

Especie V. = Especie Vegetal

C. E. = Color Esperado

C. D. = Color Dado

R = Resultado



TABLA No. 53

REACCIONES DE COLORACIÓN

Pruebas específicas de alcaloides

Método	Procedimiento	Especie V.	Fracción	C.E	C. D	R	
Ehrlich	Disolver 1g de p-dimetilamino benzaldehído en una mezcla de 25 ml de HCl (36%) y 75 ml de metanol	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Violeta	verde oscuro	+	
			éter de P.		verde tierno	+	
			Acetato E.		verde	+	
			Cloroformo		café	-	
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.	Verde Rojo	éter de P.	verde	+
			Acetato E.		verde	+	
			Cloroformo		crema	-	
			<i>Tabebuia rosea</i>		Ext. C.	rojo	+
		éter de P.		verde	+		
		Acetato E.		verde	+		
		Cloroformo		café	-		
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.	rojo	+		
			éter de P.	incoloro	-		
			Acetato E.	incoloro	-		
			Cloroformo	incoloro	-		
		Mandelin	Muestra + 10 mg de vanadato de amonio en 2 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Violeta Azul Rojo	verde oscuro
éter de P.	naranja				-		
Acetato E.	amarillo verdoso				-		
Cloroformo	amarillo verdoso				-		
<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.			rojo	+		
	éter de P.			verde	-		
	Acetato E.			rojo	+		
	Cloroformo			verde	-		
<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.			no cambia	-		
	éter de P.			rojo	+		
	Acetato E.			rojo	+		
	Cloroformo			café oscuro	-		
<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.			rojo	+		
	éter de P.			verde	-		
	Acetato E.			verde	-		
	Cloroformo			no cambia	-		

Especie V. = Especie Vegetal

C. E. = Color Esperado

C. D. = Color Dado

R= Resultado



CONTINUACIÓN ( TABLA No. 53)

Método	Procedimiento	Especie V.	Fracción	C.E	C. D	R
Yodo - HCl	sol a: 1g de yoduro de potasio 1g de yodo se disuelve en 100 ml de etanol  sol b: 25 ml de ácido clorhídrico al 25% se mezcla con 25 ml de etanol al 95% Aspersar primero con a,luego con b.	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Marrón	marrón	+
			éter de P		marrón	+
			Acetato E		marrón	+
			Cloroformo		verde	-
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.		marrón	+
			éter de P		marrón	+
			Acetato E		marrón	+
			Cloroformo		crema	-
		<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.		marrón	+
			éter de P		marrón	+
			Acetato E		marrón	+
			Cloroformo		crema	-
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		marrón	+
			éter de P		marrón	+
			Acetato E		marrón	+
			Cloroformo		café	-
Erdmann	a: 6 gts HNO <sub>3</sub> /100ml H <sub>2</sub> O b: 10 gts a 20 gts H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 - 2 mg Ms. + 8 -10 gts R	<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Rojo otros colores	verde tierno	+
			éter de P		verde tierno	+
			Acetato E		verde tierno	+
			Cloroformo		verde tierno	+
		<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.		no cambia	-
			éter de P		no cambia	-
			Acetato E		no cambia	-
			Cloroformo		no cambia	-
		<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.		rojo	+
			éter de P		amarillo	+
			Acetato E		amarillo	+
			Cloroformo		no cambia	-
		<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		no cambia	-
			éter de P		no cambia	-
			Acetato E		no cambia	-
			Cloroformo		no cambia	-

Especie V. = Especie Vegetal

C. E. = Color Esperado

C. D. = Color Dado

R = Resultado



TABLA No. 54

## CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

Caracterización de alcaloides Generales

Fase Móvil	Especie V.	Fracción	Rf	Revelador
n-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH: CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H 45:15:0.5	<i>Citrus aurantifolia</i>	Extracto C	Rf = 0.9615	Dragendorff
		Éter de P	Rf = 0.965	
		Acetato E	Rf = 0.9615	
		Cloroformo	-	
	<i>Catharanthus roseus</i>	Extracto C	Rf1 = 0.23 Rf2 = 0.8648	Dragendorff
		Éter de P	Rf1 = 0.1824 Rf2 = 0.8851	
		Acetato E	Rf = 0.8783	
		Cloroformo	-	
	<i>Tabebuia rosea</i>	Extracto C	Rf = 0.8344	Dragendorff
		Éter de P	Rf = 0.8513	
		Acetato E	Rf = 0.8275	
		Cloroformo	-	
	<i>Pouteria sapota</i>	Extracto C	-	Dragendorff
		Éter de P	-	
		Acetato E	-	
		Cloroformo	-	

Rf =  $\frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$

Especie V. = Especie Vegetal



TABLA No. 55

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA  
Caracterización de Núcleos de alcaloides

Especie V.	Fracción	Núcleo y F. M.	R. F.	Núcleo y F. M.	R. F.
<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Indólicos	0.7191	Oxindólicos	0.75
	éter de P.	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH	0.7534	CHCl <sub>3</sub> : EtOH	0.74
	Acetato E.	45;2;0.1	-	19;1	0.69
	Cloroformo		-		-
<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.		0.7		0.78
	éter de P.		0.7		-
	Acetato E.		-		-
	Cloroformo		-		-
<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.		-		-
	éter de P.		-		-
	Acetato E.		-		-
	Cloroformo		-		-
<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		-		-
	éter de P.		-		-
	Acetato E.		-		-
	Cloroformo		-		-



## CONTINUACIÓN (TABLA 55)

Especie V.	Fracción	Núcleo y F. M.	R. F.	Núcleo y F. M.	R. F.	Núcleo y F. M.	R. F.
<i>Citrus aurantifolia</i>	Ext. C.	Purina CHCl <sub>3</sub> : EtOH 9;1	0.82	Tropano Me <sub>2</sub> CO:H <sub>2</sub> O: NH <sub>3</sub> 80;15;2	0.77	Isoquinóleico  CHCl <sub>3</sub> :MeOH 85;15	0.65
	éter de P		0.82		-		0.64
	Acetato E		-		0.77		-
	Cloroformo		-		-		-
<i>Catharanthus roseus</i>	Ext. C.		0.26-0.76		0.65		0.68
	éter de P		0.76		0.66		0.68
	Acetato E		0.3		0.65		-
	Cloroformo		-		-		-
<i>Tabebuia rosea</i>	Ext. C.		0.58		0.78		0.63
	éter de P		0.56		0.78		-
	Acetato E		-		-		0.61
	Cloroformo		-		-		-
<i>Pouteria sapota</i>	Ext. C.		-		-		-
	éter de P		-		-		-
	Acetato E		-		-		-
	Cloroformo		-		-		-

Rf =  $\frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$

F.M. = Fase Móvil



## ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para analizar los resultados y determinar que tan activa es una planta se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

En base a la concentración se clasifican en:

- Muy activa: concentraciones menores o iguales a 100 ppm.
- Moderadamente activas: 101 a 200 ppm.
- Ligeramente activas: 201 a 300 ppm.
- Poco activas: 301 a 400 ppm.

En base al periodo de exposición:

- Toxicidad aguda: a las 6 horas de exposición.
- Toxicidad subaguda: a la 12 horas de exposición.
- Toxicidad crónica: a las 24 horas de exposición.

Basándose en la clasificación anteriormente mencionada podemos decir que los valores obtenidos a las 6 y 12 horas de exposición y a las diferentes concentraciones empleadas en el extracto crudo y fracciones de las especies vegetales utilizadas, no se tomaron en cuenta para el análisis de los resultados por presentar un  $DL_{50}$  mayor de 400 ppm.

En la evaluación de la citotoxicidad a 4 especies vegetales a través del bioensayo de *Artemia salina* a las 24 horas de exposición, se tomaron en cuenta las fracciones más activas obteniéndose que *Citrus aurantifolia* presentó una alta actividad en las fracciones y en la fracciones extracto crudo, éter de petróleo y acetato de etilo con un  $DL_{50} = 100$  ppm, observándose un desplazamiento de las gráficas hacia la izquierda, esta actividad se corrobora con las reacciones de coloración generales y específicas de alcaloides, las que dieron positivas y con la presencia de los núcleos de alcaloides; indólicos, oxindólicos, purínicos, del tropano e isoquinolínico en el extracto crudo; en la fracción éter de petróleo todos estos excepto del tropano, en la fracción acetato de etilo solo están presente oxindólicos y del tropano y en la fracción cloroformo no se encontró ninguno de estos núcleos.



*Catharanthus roseus*, presentó una moderada actividad en el extracto crudo con un  $DL_{50} = 158.489$  ppm y en la fracción éter de petróleo un  $DL_{50} = 199.526$  ppm, observándose un desplazamiento de la gráfica hacia la izquierda, esta actividad se corrobora con la presencia de alcaloides a través de las reacciones de coloración y en la caracterización de los núcleos de alcaloides: indólicos, oxindólicos, purínicos, del tropano, e isoquinolínicos en el extracto crudo, en la fracción éter de petróleo encontramos todos los anteriores excepto oxindólicos, en acetato de etilo encontramos purínicos y del tropano, en cambio en fracción cloroformica no se encontraron ninguno de los anteriores por lo que esta actividad se le puede atribuir a otros compuestos.

En *Tabebuia rosea* se encontró una alta en la fracción de cloroformo con un  $DL_{50} = 100$  ppm, observando un desplazamiento de la gráfica hacia la izquierda. En la caracterización de alcaloides encontramos los núcleos: purínicos, del tropano e isoquinolínicos en el extracto crudo, en la fracción éter de petróleo encontramos todos estos excepto isoquinolínicos, en acetato de etilo solamente purínicos y en la fracción clorofórmica no se encontró ninguno de los anteriores por lo que dicha actividad se le atribuye a otros compuestos presentes en la planta.

*Pouteria sapota*, presentó una ligera actividad en la fracción clorofórmica  $DL_{50} = 291.74$  ppm, con un desplazamiento de la gráfica hacia el centro, dicha actividad es dada por otros compuestos presente en esta especie, ya que no se encontró alcaloides a través de los métodos utilizados.



## CONCLUSIÓN

En el presente estudio monográfico en el cual se evalúa la actividad citotóxica y la caracterización de alcaloides en 4 especies vegetales: *Citrus aurantifolia* ( Limón ácido ), *Catharanthus roseus* ( Mariposa ) *Tabebuia rosea* ( Roble ) y *Pouteria sapota* ( Sapote ), encontramos, que el fraccionamiento realizado a las mismas especies con diferentes solventes a distintas concentraciones se obtuvo:

- Muy activa: *Citrus aurantifolia* en extracto crudo, éter de petróleo y acetato de etilo, y *tabebuia rosea* en cloroformo.
- Moderadamente activa: *Catharanthus roseus* en extracto crudo.
- Ligeramente activa: *Pouteria sapota* en cloroformo.

Presentando todas estas especies una citotoxicidad crónica.

En la caracterización de alcaloides a través de las reacciones de coloración y cromatografía de capa fina (TLC ), encontramos los núcleos:

- Indólicos, oxindólicos, purínicos, del tropano e isoquinolínicos en las especies *Citrus aurantifolia* y *Catharanthus roseus* en extracto crudo.
- Purínicos, del tropano e isoquinolínicos en *Tabebuia rosea* en extracto crudo.
- No encontrándose presencia de alcaloides en *Pouteria sapota*.



## RECOMENDACIONES

1. Recolectar las especies vegetales en el tiempo indicado en la bibliografía.
2. En el bioensayo de Artemia salina se deben tomar en cuenta los siguientes factores:
  - Preparación del agua de mar
  - Temperatura (28 a 30 °C )
  - Presencia de oxígeno y luz ( bombillo )
  - Tiempo de incubación ( 72 horas )
  - Lugar libre de contaminación
  - pH del medio ( ligeramente básico entre 8 y 8.2 )
  - Influencia de la salinidad
  - No adicionar una cantidad mayor ni menor (10-15) náuplios.
3. Efectuar el aislamiento y cuantificación de los núcleos de alcaloides encontrados.
4. Realizar posteriores estudios para determinar otros compuestos presentes en las plantas utilizadas.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Evaluación de la toxicidad de 59 especies de plantas colectadas bajo el concepto de biodiversidad en la estación biológica, Bartola, Río Sn. Juan, a través de Bioensayo de Artemia Salina.

Autores: Br. Fernando Emilio Baca Escoto. Pág. 1, 2, 3, 4 y 5.

Br. Eduardo Alexander Morales Munguía.

Br. Johanna del Carmen Sampson Anduray.

(Monografía) León, Agosto, 1999.

2. Tratado de Farmacognosia.

San Martín Casaamada

Páginas: 605 y 606

Editorial Científico – México. 1977

3. Farmacopea Vegetal Caribeña

Tramil

Edición Universitaria 1998

L. Germosén-Robineau

Páginas: 267 y 268

4. Monografía:

Evaluación exhaustiva de 25 plantas medicinales utilizadas en el occidente del país a través del Bioensayo de la Artemia Salina.

Autores: Enilda Renata Espinoza Valle.

Judit Elizabeth Figueroa Rivera.

Marha ILeana Gutiérrez López.

Páginas: 12 y 13

5. Investigación Fitoquímica

Método en el estudio de productos naturales

Autor: Olga Look de Ugaz

Año: 1994

Páginas: 211 – 238.



6. Extracción e identificación de los alcaloides precursores en la semisíntesis de vincristina y vinblastina a partir del *Catharanthus roseus*

Vinca rosea, que crece en Nicaragua

(monografía)

Autores: M<sup>ca</sup> Felix Mercado Morales.

Mirna Concepción Brand Sandoval.

1991

Páginas: 8, 11, 12, 13, 14, 15

7. Monografía:

Uso de plantas medicinales en el manejo de las enfermedades respiratorias en el Reparto Emir Cabeza, territorio Perla Maria Norori de la ciudad de León, en el primer trimestre del 2000

Autor: Br. Ada Kenia Reyes Ruiz

León, octubre del 2000

Páginas: 12 y 13

8. El poder medicinal de las plantas

Reinaldo Sosa Gómez

Páginas: 269 a 272 y 286

9. 270 plantas medicinales

Edición 1<sup>ra</sup>

Año: Agosto de 1995

Autor: Mahabir P. Gupta, ph. D.

Páginas: 191 a 193

10. Farmacognosia, 13<sup>a</sup> edición 1989

Trease, George Edward

Páginas: 590 al 597

692 al 699

707 al 709



11. Monografía:

Marcha fitoquímica y actividades citotóxica con Artemia salina del árbol Tecomastans ( sardinillo ) ( estudio preliminar ).

Autores: Br. William R. Tellez Zapata.  
Br. Juan Manuel López V.

Páginas: 50-70

12. Guía practica ilustrada de las Plantas Medicinales

William A. R. Thomson, O. M.

Páginas: 7, 8, 9

Año: 1980

13. Fundamento de tecnología de producto fitoterapeuticos.

Autor: Nikola Sharapin

Editor: Roberto Pinzón S.

Año: 2000

Paginas: 71, 159 – 176

14. Monografía:

Estudio comparativo de uncaria tomentosa ( Willd.)

Nicaragüense tomando como referencia uncaria tomentosa (Willd.) peruana.

Autores: Diana Araúz Torrez.  
Edwin Moisés Castillo Martinez  
Cesar Benito Martinez Huete

Pag. : 25 – 27 ; 44 – 46

15. Evaluación de la citotoxicidad de Cecropia obtusifolia B, Calendula officinalis L, y Polypodium aureum L, a través del bioensayo de Artemia salina.

Autores: Elizabeth Pérez D.  
Yuraymi Ponce H.  
Silvio Riveras S.

Pag: 35 – 50

