

---

## CULTIVO Y AISLAMIENTO DE PRINCIPIOS ACTIVOS ANTICANCEROSOS EN TRES ESPECIES DE PLANTAS

---

JOSÉ WAIZEL BUCAY

Sección de Graduados e Investigación.  
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.

### RESUMEN

Las especies *Helenium mexicanum* H.B.K., *Viguiera buddleiaeaformis* (DC.) Benth, et Hook. ex Hemsl. y *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Vinca rosea L.) fueron propagadas sexualmente, bajo dos diferentes condiciones de crecimiento: en invernadero y al exterior, en la Ciudad de México, D.F. Las dos primeras especies nunca habían sido cultivadas y aunque la tercera sí lo había sido, en esta ocasión se le reprodujo fuera de su hábitat natural. Estos vegetales elaboran substancias citadas como anticancerígenas, dos de las cuales (la vincristina y la cincaleucoblastina), ya son empleadas en la terapia de ciertos cánceres humanos. Con el fin de detectar la presencia y variación de los principios activos de interés, se les colectó a diferentes edades; seleccionándose 27 muestras de las que se obtuvieron sus extractos; los que fueron separados en sus componentes por medio de cromatografía, lográndose aislar, helenalina, budleínas "A" y "B" y los alcaloides totales de *Catharanthus roseus*. Se lograron conocer algunos requerimientos para el crecimiento de las plantas, así como su respuesta a las condiciones a las que fueron sometidas: *Helenium* completó su ciclo vital mientras que *Viguiera* y *Catharanthus* a 23 meses de edad, no lo hicieron. La primera especie mencionada no tuvo problemas para desarrollarse, en cambio, las otras dos sí afrontaron algunos, según el sitio de crecimiento. Se demostró que las tres especies, en las dos condiciones y a las diferentes edades en que fueron colectadas, produjeron las substancias anticancerígenas antes mencionadas.

### ABSTRACT

*Helenium mexicanum* H.B.K., *Viguiera buddleiaeaformis* (DC.) Benth, et Hook. ex Hemsl. and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Vinca rosea L.) plants which elaborate substances reported as being anticancer agents, two of them (vincristine and vinblastine) actually used, were sexually spread, under different growing conditions: in greenhouse and outdoors, at Mexico city. *H. mexicanum* and *V. buddleiaeaformis*, have never been cultivated and although *C. roseus*, has been cultivated, in this occasion it was reproduced out of its natural habitat. With the purpose to find presence and variations of active interest principles a collect of different growth states of plants was performed; a selection of 27 samples which was submitted to an extractive process. A chromatographic analysis showed presence of helenalin, "A" and "B" budleins (both sesquiterpene lactones) and the total alkaloids from extracts of *C. roseus*. It was possible to obtain information about some of these plant growing at they were submitted; *H. mexicanum* and *C. roseus* completed its vital cycle, while *V. buddleiaeaformis* at 23 months of age, did not complete it. It was proved that three species, same in the both conditions, as at the different ages in which they were collected, already produced the anticancer substances before mentioned.

### INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Los tratamientos quimioterapéuticos del cáncer implican el empleo de productos capaces de localizar, identificar y destruir células y tejidos malignos sin dañar a los normales.

A la fecha son numerosas las investigaciones encaminadas a encontrar esos productos, principalmente a partir de fuentes vegetales, por lo que ya se dispone farmacéuticamente de mas de 25 agentes citostáticos y antitumorales, los que han permitido la sobrevivencia de pacientes con la enfermedad e incluso su curación (Kreig, 1970).

En este artículo se presenta el análisis de la presencia y variación de principios activos a lo largo del ciclo vital de las especies *Helenium mexicanum*, *Viguiera buddleiaeaformis* y *Catharanthus roseus*, cultivadas bajo diferentes condiciones (al medio ambiente y en invernadero), esos principios son los responsables de su actividad bloqueadora de la metafase en células animales (Waizel, 1979).

No se encontró literatura acerca del cultivo o de algún ensayo de domesticación, de ninguna de las tres especies, por lo que se desconocían sus requerimientos de manejo.

También se intentó con el cultivo de *Helenium* y *Viguiera* obtener una cantidad mayor y más homogénea en relación a principios activos que los obtenidos del recurso silvestre y con ellos permitir la continuación de los estudios farmacológicos que aún faltan, además de conocer la edad óptima para la cosecha en los tres casos.

*Catharanthus roseus* es cultivada en varias regiones cálidas húmedas del mundo, dado que de los sesenta alcaloides que produce, dos son empleados clínicamente, pero debido a la baja concentración de ellos en la planta, se requiere una gran cantidad de hojas y tallos para su aislamiento, lo que hace muy costoso su empleo en la terapéutica, por lo que, en este trabajo se le propagó sexual y asexualmente fuera de su hábitat, debido a que México podría convertirse en exportador del recurso.

Desde hace tiempo se conocen investigaciones en relación al cultivo de las plantas medicinales, por lo que ahora será referido un ejemplo, que desde luego, aunque no es concluyente para todo el reino vegetal, puede ilustrar lo antes expuesto. Rippetoe (1907 In: Kraemer, 1916), refiere que plantas cultivadas de *Atropa belladonna* L. produjeron en hojas y raíces, iguales cantidades en porcentaje de principio activo, que las de origen silvestre que había en el mercado. Estudios posteriores encontraron para la misma especie bajo cultivo, cantidades un poco mayores de alcaloide que en las plantas silvestres (Carr, 1913; Sievers, 1914; In: Kraemer, 1916).

Las plantas motivo de este estudio producen como principios activos: lactonas sesquiterpénicas (*Helenium* y *Viguiera*), mientras que *Catharanthus* elabora numerosos alcaloides. La primera planta sintetiza helenalina y varias mexicaninas (Romo de Vivar y Romo, 1959, 1961), mientras que *Viguiera* hace las buldeínas "A" y "B", sustancias que presentan propiedades citotóxicas y que han sido probadas in vitro contra células cancerosas en cultivo de tejidos (Téllez, 1973; González, 1976; Guerrero, 1979).

Lee et al. (1971) demostraron la alta citotoxicidad de la helenalina in vitro, en células HEp-2 y KB (líneas celulares cancerosas en cultivo de tejidos), y en vivo en ratas con tumor de ascitis de Ehrlich.

Petit et al. (1973), concluyeron que la helenalina mostraba actividad antileucémica in vivo en ratones, e inhibía el crecimiento de tumores malignos en ratas albinas.

*Helenium mexicanum* H.B.K., recibe los nombres comunes de: "Chapuz, hierba de las animas, rosilla de Puebla, amargosa, cabezona y manzanilla montés", entre otros; pertenece a la familia Compositae, es una hierba anual de 30-100 cm de alto, que vegeta en forma silvestre en casi toda la república, prefiriendo los suelos inundables; también es posible localizarla entre cultivares.

Se le reporta de poca utilidad etnobotánica, destacando la de servir para: "amargar el pezón y así evitar que el bebé siga alimentándose", como estornutatorio e insecticida (mata piojos), y para limpiar úlceras sucias (Mocino y Sesse, 1888 In: Martínez, 1959).

La helenalina que elabora esta especie, al igual que otras del mismo género *Helenium* ocasiona amargamiento de la leche, irritación de mucosas, ojos y estómago, dermatitis por contacto y además tiene propiedades insecticidas, vermífugas y venenosas para peces, perros y diferentes tipos de ganado, al que incluso puede ocasionar la muerte (Clark, 1936; Adams y Herz, 1949; Dollahiete, 1964; Mitchel, 1969; Aline y Paasch, 1973; In: Waizel, 1979).

Es conveniente recordar que la especie en cuestión ya había despertado el interés de varios investigadores mexicanos desde fines del siglo pasado y hasta principios del presente, entre los que pueden citarse: Río de la Loza Villaseñor, Armendáriz, Bulman, Prieto, algunos de los cuales fueron destacados estudiosos que laboraron en el Instituto Médico Nacional, que tanto contribuyó al conocimiento de la flora medicinal de México (Waizel, 1979).

*Viguiera buddleiaeformis* (DC.) Benth et Hook ex Hemel. es conocida popularmente en el estado de Hidalgo como "cerote", también pertenece a la familia Compositae, y es un arbusto perenne, típicamente mexicano, que llega a medir hasta tres metros de alto, prefiriendo los sitios secos, altos y soleados en bosques de pinos, encinares o matorrales, en el Valle de México y el centro y sur del país (Paray, 1958; Sánchez, 1976). No se encontró en la literatura ningún reporte de uso popular, siendo en general escasa la bibliografía para la especie.

La tercera especie estudiada, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, recibió también los nombres científicos de *Vinca rosea*, *Lochnera rosea* y *Ammocallis rosea*, siendo el válido el de *Catharanthus*, se le asignan popularmente en México los nombres de: "teresita, vicaria, maravilla, maravilla de España, ninfa", entre otros. Pertenece a la familia Apocynaceae, y es un subarbusto perenne que alcanza más de 80 cm de altura, se le cultiva como ornamental en varias regiones tropicales del planeta y, a pesar de ser una especie tóxica, tiene una remota historia de ser utilizada en Madagascar, Vietnam, Filipinas, Australia, India y Cuba como remedio contra una amplia variedad (21) de enfermedades, pero en México, aparentemente solo se le usa además de ornamental, en forma de colirio para mejorar afecciones oculares y para el prurito y sarpullido (Calderón y Standley, 1941; Farnsworth, 1961; Sayas, 1977).

Como se indicó al principio, esta planta elabora varios alcaloides, de los que dos (vincristina y vincaléucoblastina) han demostrado eficiencia contra leucemias y otros cánceres en humanos, por lo que son empleados clínicamente desde hace más de diez años.

## MATERIALES Y METODOS

### Colecta de Material

Para esta investigación se requirió de material fértil cuya procedencia exacta fuera bien delimitada, por lo que, después de varios viajes de colecta a las zonas de crecimiento de las especies, y de esperar a que las tres tuvieran frutos, se colectaron éstos, para el caso de *Helenium*, durante los meses de julio-septiembre de 1976, en un maizal abandonado por su periódica inundación localizado en el ejido San Antonio Tultitlán, cercano a San Cristóbal Ecatepec, en el Estado de México.

Los frutos maduros de *Viguiera buddleiaeformis* se colectaron durante noviembre y diciembre del mismo año, en un bosque perturbado a la orilla de la carretera México-Toluca, alrededor del km 17.

Las semillas de *Catharanthus* fueron extraídas de frutos de plantas que crecían en jardines particulares de varias casas ubicadas en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, principalmente de las colonias Rinconada, La Florida y Delicias; durante los meses de mayo, julio, octubre y diciembre de 1976, épocas de fructificación de la especie.

Los frutos de las tres especies fueron secados al sol, y las semillas extraídas y limpiadas a mano, se almacenaron en frascos de vidrio a 3° C, hasta un día antes de la siembra. Ejemplares de referencia de las tres especies fueron depositados en los herbarios: Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, UNAM y en el del Instituto de Investigaciones Forestales (INIF), ambos en la ciudad de México, siendo revisada la determinación taxonómica por Rzedowski y Madrigal en el caso de *Viguiera*; de las dos especies restantes, el autor es el responsable de la identificación botánica.

### Siembra

La superficie útil de un invernadero y su réplica al medio ambiente, fueron divididas en 9 parcelas en los dos medios; midiendo aproximadamente 2.6 m<sup>2</sup> cada una y empleadas para repetir 3 veces cada siembra. Es decir, cada especie estaba representada en tres sitios separados a la intemperie y en otros tres en el invernadero.

La cantidad de semillas puestas en cada parcela estuvo basada en los resultados obtenidos de ensayos de germinación previamente efectuados, los que se llevaron a cabo en cajas petri, con papel filtro y en una germinadora a temperatura constante (22°C). En cada parcela, se sembraron 8.9 g de semillas de *Helenium mexicanum*, 14.0 g de *Catharanthus roseus* y 6.0 g de *Viguiera buddleiaeformis*.

El suelo empleado como sustrato de crecimiento se clasifica como del tipo café de montaña y proviene de roca andesítica, soportando una vegetación mixta de coníferas (Madrigal, 1967), es rico en materia orgánica (9.5 %), pH 6.4; Textura: Franco; CICT: 42.7; sólo algo pobre en fósforo de acuerdo a niveles aplicables a suelos agrícolas.

Este suelo fue extraído del Parque Nacional Zoquiapan, ubicado en Río Frío, Estado de México, a una altitud de 300 m, Latitud 19° 20', Longitud 98° 30'.

La tierra se fumigó con bromuro de metilo. La profundidad del suelo fue de aproximadamente 16 cm y las semillas se sembraron repartiéndolas uniformemente en surcos; dejándose una distancia de 4 cm entre cada surco. El riego fue por aspersión en el invernadero y con regadera de mano en el exterior, en donde por las tardes las plantas eran cubiertas con mallas mosquitero plásticas para evitar su desecación.

### Ensayo de Propagación Asexual

Simultáneamente a la investigación principal, se hicieron ensayos de propagación asexual con estacas de *Viguiera* y *Catharanthus*, enterrándolas en tierra y en arena sílica mezclada con vermiculita.

Se aplicó a las estacas hormonas de enraizamiento ya preparadas comercialmente (Rootone) y fueron mantenidas en un cuarto cerrado a 20°C constantes, 80 % de humedad ambiental y 12 horas diarias de luz fluorescente.

### Cosecha y Procesamiento del Material

Periódicamente se llevaron a cabo recolecciones de las especies bajo estudio, tomando plantas de las tres parcelas de cada especie y mezclándolas entre sí, separando las procedentes del invernadero de las del exterior (Cuadro 1).

Todas fueron arrancadas del suelo, enjuagadas con agua, escurridas, pesadas en fresco y puestas a secar mediante corrientes de aire frío. Una vez secas, eran nuevamente pesadas y envasadas en bolsas de papel.

Mensualmente se tomaron al azar 20 plantas de cada especie, a las que se les midió y pesó, registrándose su crecimiento (Fig. 1).

## Aislamiento de los Principios Activos

### Lactonas Sesquiterpénicas

Las muestras secas de *Viguiera* y *Helenium*, se pulverizaron en mortero de hierro y extrajeron con etanol caliente a reflujo, durante 3 horas, agregando nuevo disolvente cada hora. Se reunieron los extractos y concentraron al vacío hasta un tercio del volumen original, al que se trató con solución acuosa saturada de acetato de plomo, dejándose reposar durante dos horas, se eliminó el precipitado mediante la filtración al vacío con ayuda de celita. La solución transparente se recogió y extrajo varias veces con cloroformo, lavándose con agua; la porción clorofórmica fue secada con sulfato sódico anhidro, filtrada y concentrada al vacío casi a sequedad. A los extractos así obtenidos, se les cromatografió en placas delgadas de sílice G usando como testigo muestras auténticas de helenalina y de budleínas, en la Tabla 1 se muestran los datos procesados hasta este paso.

Las placas fueron corridas empleando como eluyentes al benceno y acetato de etilo (4:1), y se revelaron con sulfato cérico disuelto en ácido sulfúrico.

Siete de estos extractos fueron cromatografiados en alúmina ALCOA F-20, con diferentes eluyentes (benceno puro hasta obtener lenalina y cloroformo acetona (85:15), para separar las budleínas "A" y "B"); las fracciones que cristalizaron fueron recristalizadas con acetona y éter isopropílico, para determinarles puntos de fusión y análisis espectroscópico con rayos infrarojos para confirmar su identidad.

### Separación de Alcaloides de *Catharanthus*

Se siguió la técnica recomendada por Farnsworth (1961), obteniéndose extractos totales de alcaloides, los que fueron cromatografiados unidireccional y bidireccionalmente en placas delgadas de sílice G, empleando como eluyente una mezcla de acetato de etilo-etanol (4:1), revelándose con sulfato cérico amónico disuelto en ácido fosfórico (Cone et al., 1963), y siendo comparadas con muestras auténticas de vincristina y vinblastina, donadas por laboratorios Eli Lilly de México. Las fracciones obtenidas de la separación en columna de un extracto de estos alcaloides, fueron también cromatografiadas en placa delgada y comparadas con muestras auténticas.

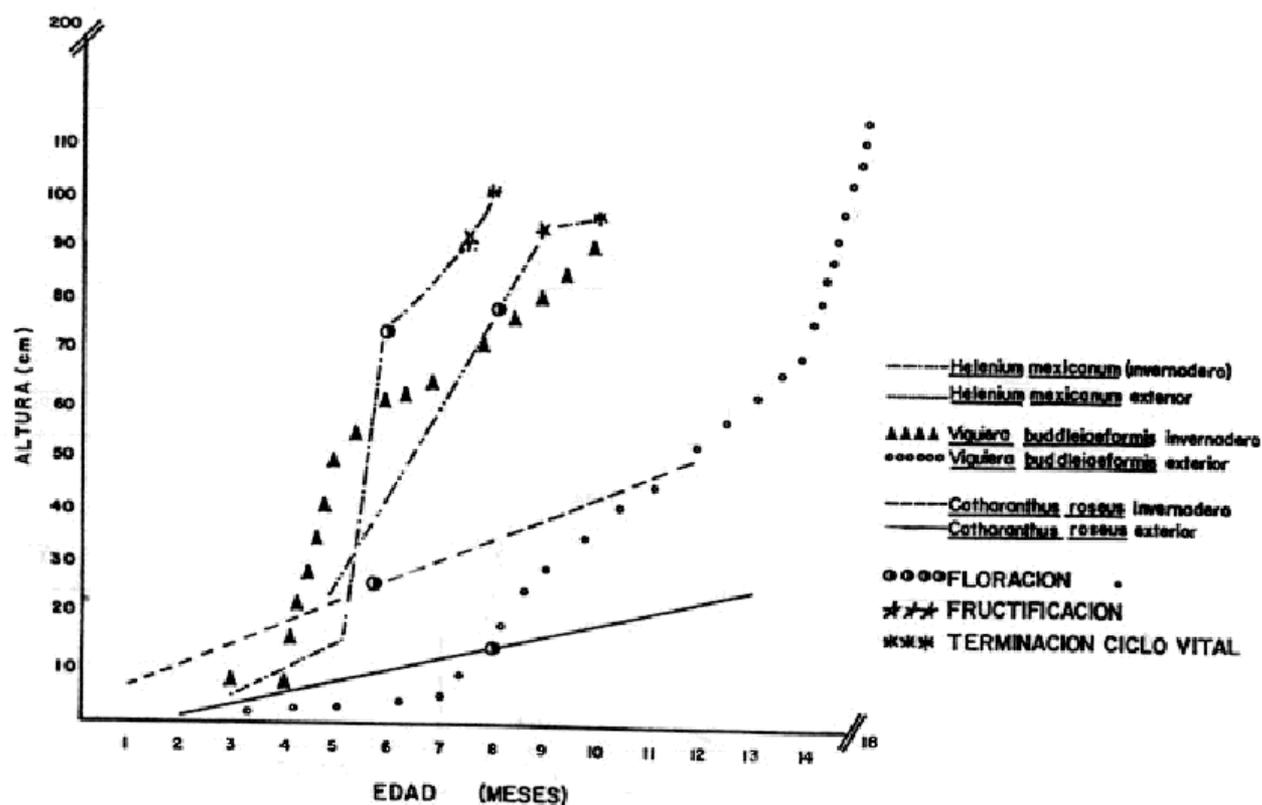


Fig. 1. Crecimiento y floración de las 3 especies en ambos medios.

ESPECIE	EN EL EXTERIOR		EN INVERNADERO			
	SIEMBRA/ BROTACION	COSECHAS MES/ MUESTRA No.*	SIEMBRA/ BROTACION	COSECHA MES/ MUESTRA No.*		
<i>H. mexicanum</i>	14 Dic. 27 Dic.	May. Jun. Jul. Dic. <u>3a/</u> <u>4a/</u> <u>2b/</u> <u>1a/</u> Febrero <u>5a/</u>	3 Dic. 13 Dic.	Feb. Mar. Abr. Jul. <u>7a/</u> <u>8a/</u> <u>9a/</u> <u>10b/</u> Sept. Nov. <u>11b/</u> <u>12a/</u>		
<i>V. buddleiaeformis</i>	28 Dic. 8 Feb.	Agosto Dic. Marzo <u>18a/</u> <u>19b/</u> <u>20b/</u>	28 Dic. 10 Ene.	Mar. May. Jun. Jul. <u>13a/</u> <u>14a/</u> <u>15a/</u> Agto. Oct. Dic. <u>16a/</u> <u>17b/</u>		
<i>C. roseus</i>	4 Ene 1º. Feb.	Mar. May. Jun. Jul. Sept. Oct. Dic. Ene. <u>25b/</u> <u>24a/</u> <u>22a/</u>	8 Dic. 15 Dic.	Ene. Abr. May. Jun. Jul. Agto. Sept. <u>23a/</u> Oct. Nov. Ene. <u>26a/</u> <u>21a/</u>		

TABLA 1

Colectas realizadas. \* a= Muestra procesada hasta extracto crudo total, con número aparecerá en los cuadros de resultados. b= muestra cromatografiada hasta separación de los principios activos buscados.

## RESULTADOS

### Crecimiento, Floración y Fructificación

#### *Helenium mexicanum*

Las plantas cultivadas en invernadero completaron su ciclo vital dos meses antes que las que crecieron al exterior. También en el invernadero, la brotación de plántulas fue mayor en 55% y necesitaron 3 días menos que al exterior. En los dos sitios se obtuvo semilla fértil.

#### *Viguiera buddleiaeformis*

Presentó una brotación superior en un 60 % en invernadero, aunque hubo considerable mortalidad debida a "damping off" o "mal del semillero" (enfermedad causada principalmente por hongos), durante los dos primeros meses de edad. Pasada esta etapa, las sobrevivientes crecieron raquílicas, cloróticas y acamándose.

Esta especie al exterior, presentó un crecimiento muy lento, lo que retrasó la primera recolección hasta el sexto mes de edad; pero, en esta condición hubo menor mortalidad y crecieron mucho más vigorosas que en el invernadero, sin clorosis y las plantas de los 14 a los 18 meses ya alcanzaban 2.10 m de altura. A 23 meses de edad, no presentó flores en el invernadero y apenas lo estaba haciendo al exterior.

#### *Catharanthus roseus*

Su óptima germinación ocurrió en el invernadero en 10-12 días mientras que al exterior requirió 30. Creció muy lentamente en este medio, lo que postergó la primera cosecha hasta el quinto mes en vez del primero o segundo como estaba planeado para las tres especies.

Las plántulas de esta especie son muy sensibles al "damping-off", lo que ocasionó gran pérdida de plantas en el invernadero al segundo mes de vida. También las flores se caen a los pocos días sin madurar, sólo pocos individuos produjeron frutos en ambos sitios de crecimiento. La escasa semilla obtenida fue fértil.

### Propagación Asexual

En los ensayos de propagación vegetativa, se obtuvieron los siguientes resultados:

En todos los casos las estacas de *V. buddleiaeformis* únicamente emitieron talluelos que murieron a los pocos días, a pesar de que la parte cortada y enterrada formó callosidad, no aparecieron raicillas y las estacas no subsistieron. Resultados positivos en el caso de *C. roseus*, en los diferentes intentos con estacas de varios grosores, a pesar de que sólo 20 % de ellas formaron raicillas, a los 2 meses de estacado, sin la aplicación de hormonas, empleando como sustrato arena sílica-vermiculita (75:25).

### Aislamiento de los Principios Activos

#### *H. mexicanum*

Un cromatograma en capa delgada de los extractos totales de las 12 muestras de esta especie, reveló en todos los casos la presencia de helenalina al ser comparados con muestras auténticas; tanto en material del medio ambiente como del invernadero, así como de la muestra de planta que se cosechó en Ecatepec (edo. de México) y que crecía en forma silvestre (Fig. 2).

En el esquema que se muestra en la figura 3, se aprecia una comparación de la cromatoplaqueta de las diferentes fracciones obtenidas al hacer las respectivas cromatografías en columna de las muestras 2, 10 y 11. Como se puede observar, se obtuvo helenalina, que se purificó por sucesivas cristalizaciones hasta que su escasez lo permitió, identificándose plenamente espectroscópicamente con rayos infrarrojos en un espectrofotómetro

Perkin-Elmer (377) y corridos en películas de cloroformo.

También fueron determinados los puntos de fusión obteniéndose 165-167°C los cristales obtenidos en las fracciones 6-12 de la muestra 2 (los puntos de fusión no están corregidos y se determinaron en un aparato Fisher-Jones). La helenalina auténtica funde a 168-171°C (Romo de Vivar, 1961).

Como se puede concluir de los datos presentados, fue plenamente identificada la presencia de helenalina en las muestras analizadas.

#### *V. buddleiaeformis*

Esta planta también elaboró bajo cultivo los principios activos buscados, en las dos condiciones en que fue propagada y a las diferentes edades en que fue cosechada (Tabla 1, Figs. 4 y 5).

La figura 4 muestra comparativamente los dos medios y las distintas edades y se observa que corresponden las manchas de la budleína "A" auténtica con las de los extractos, así como con el de la planta silvestre.

La figura 5 ilustra los resultados de la cromatografía en columna de dos muestras que crecieron al exterior (19 y 20) y de una de invernadero (17), apreciándose en ella que se produjeron las budleínas "A" y "B". Esto fue confirmado al comparar los espectros al infrarrojo de dichas fracciones con los de muestras auténticas.

No fue posible purificar las budleínas, razón por la que sus puntos de fusión no son coincidentes con los testigos.

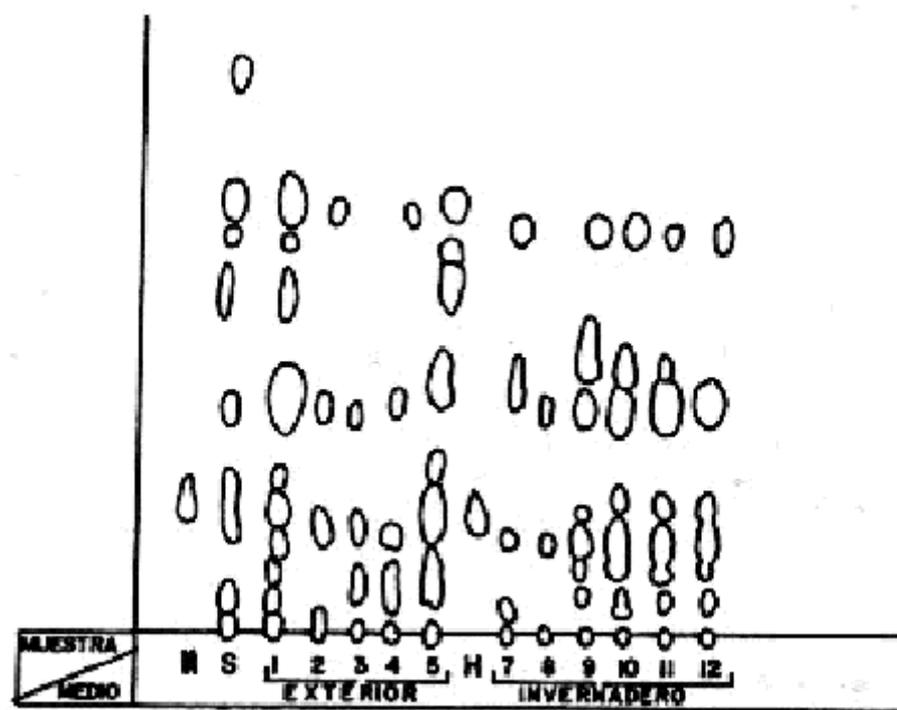


Fig. 2. Cromatografía de muestras de *Helenium mexicanum*. H= Helenalina auténtica. S= extracto de planta silvestre.

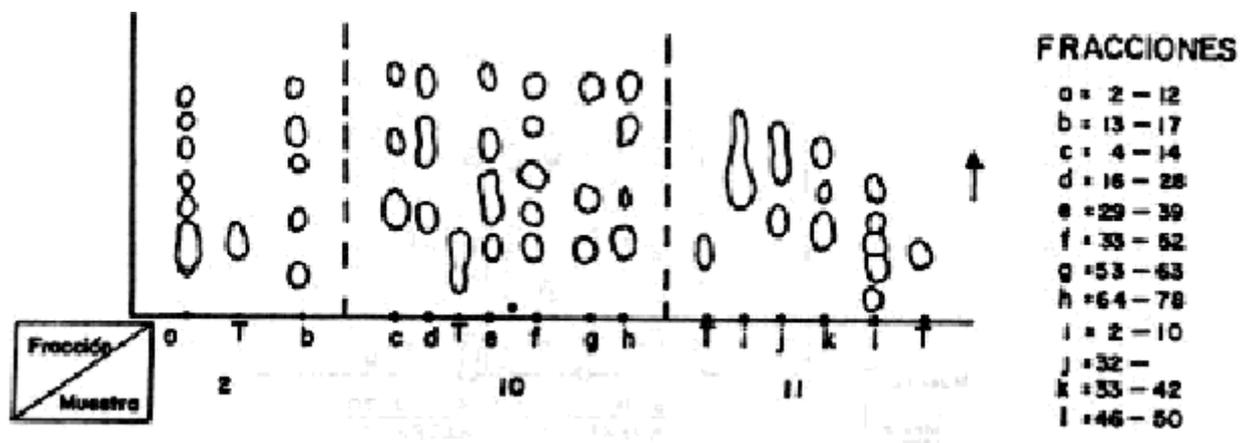


Fig. 3. Cromatoplas de varias fracciones de muestras 2, 10 y 11 (*Helenium mexicanum*) T= Helenalina auténtica.

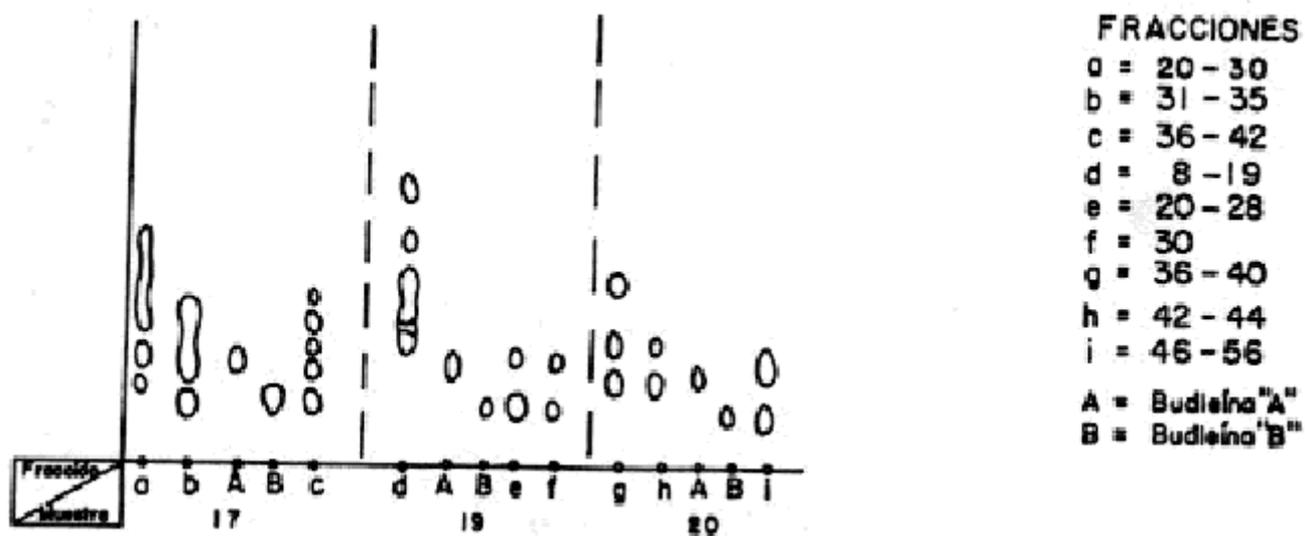


Fig. 4. Cromatografía de varias fracciones de las muestras 17, 19 y 20 (*Viguiera buddleiaeformis*).

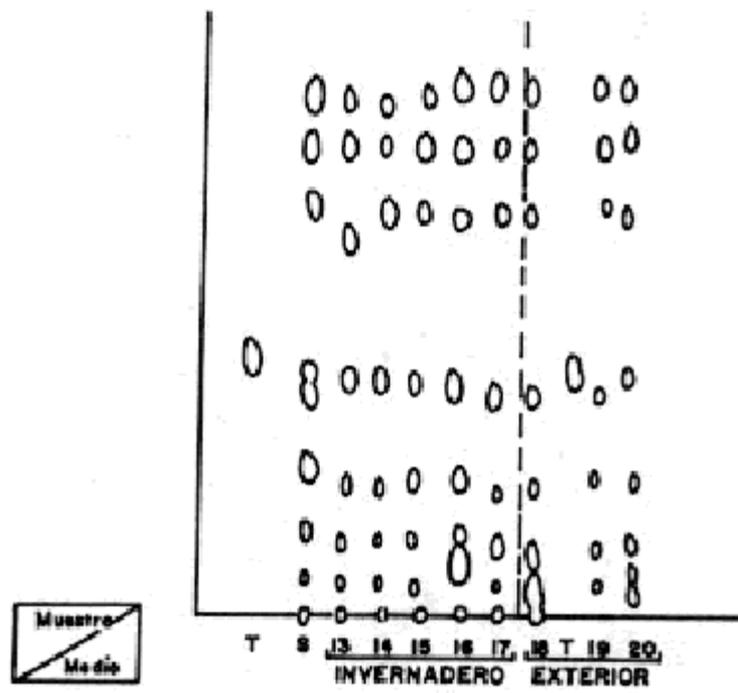


Fig. 5. Cromatografía de muestras de *Vigiera buddleiaeformis*. T= Budleina "A". S= Planta silvestre.

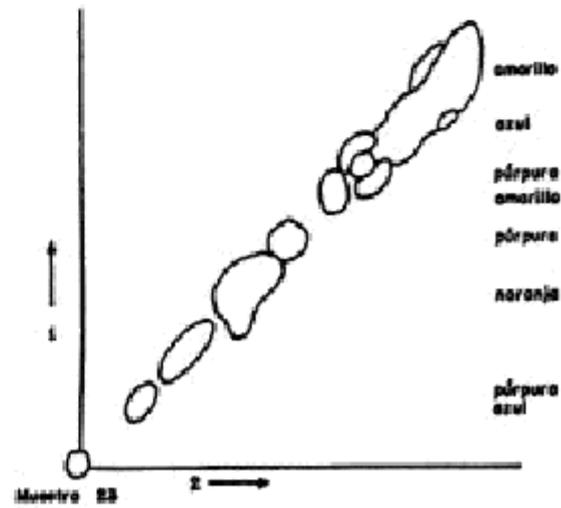
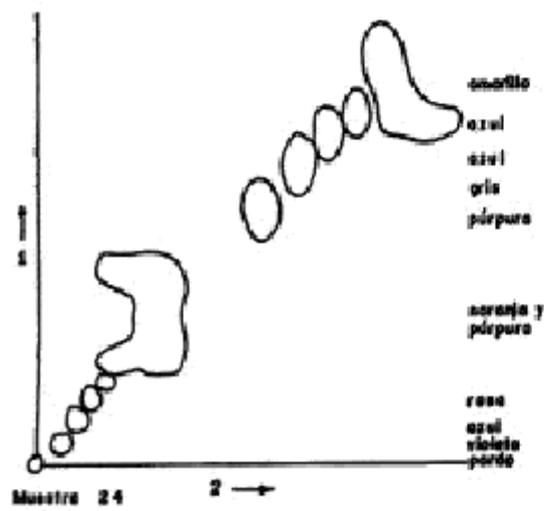
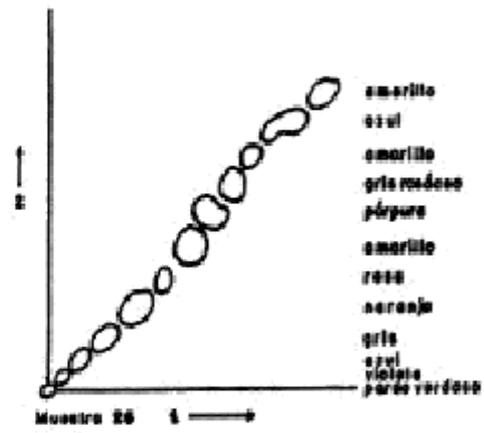
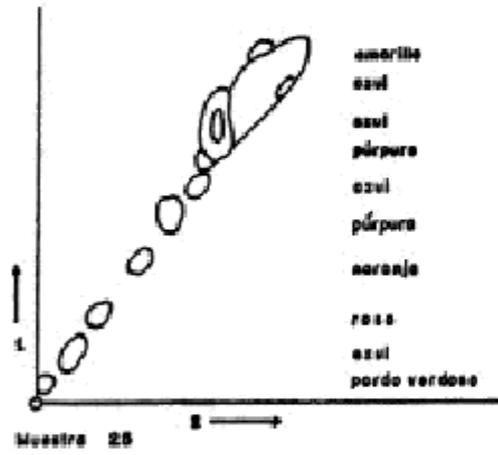
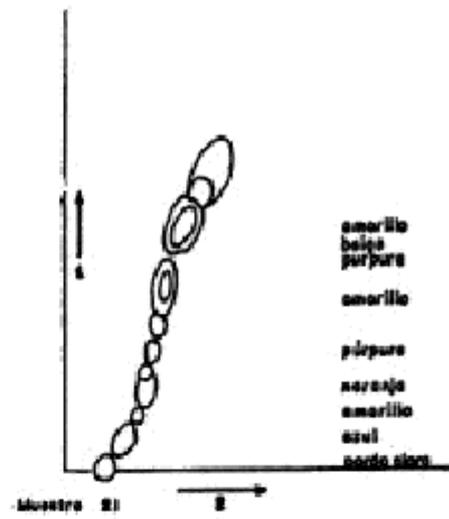
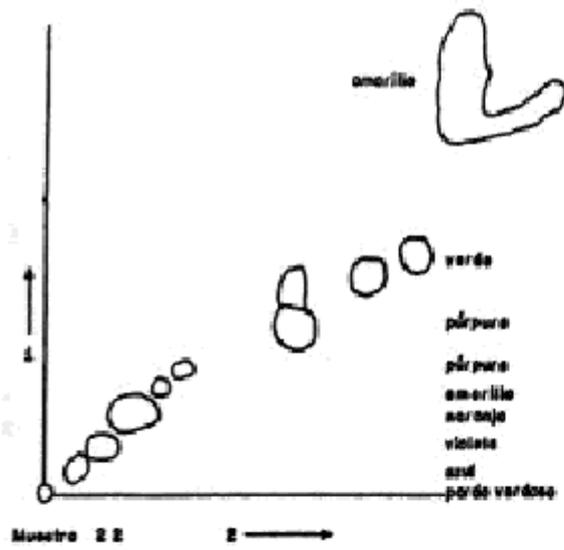


Fig. 6. Cromatografías bidireccionales de extractos de *Catharanthus roseus* (L) G. Don y su coloración al revelar con sulfato cérico amoniacal.

### *C. roseus*

Como se observa en la figura 6, las muestras de los alcaloides totales de los extractos de la planta cromatografiados bidireccionalmente revelaron varias manchas, cada una de las cuales representa un grupo de alcaloides; así, la del color azul más cercana al sitio de aplicación de la muestra, puede incluir a la vincristina y dentro de la mancha naranja se puede hallar la vincalécoblastina (Cone et al., 1963).

O sea, que de las seis muestras (donde las 22, 24 y 25 corresponden a las plantas que crecieron en el exterior y las restantes en invernadero), se aprecian manchas azules y naranjas, lo que indica que muy posiblemente en ambas condiciones y a pesar de las diferentes edades de recolección, se produjeron los dos alcaloides de interés, además de otros de los 60 que la especie produce.

En la figura 7, se muestra un esquema de la cromatoplaqueta de las fracciones obtenidas al cromatografiar en columna el extracto 25. Con líneas cortadas lo visible con luz ultravioleta de onda larga, y con líneas continuas, las manchas al revelar con sulfato cérico amoniacal. Se pueden observar manchas que corresponden a las formadas por las sustancias auténticas, utilizadas como referencia.

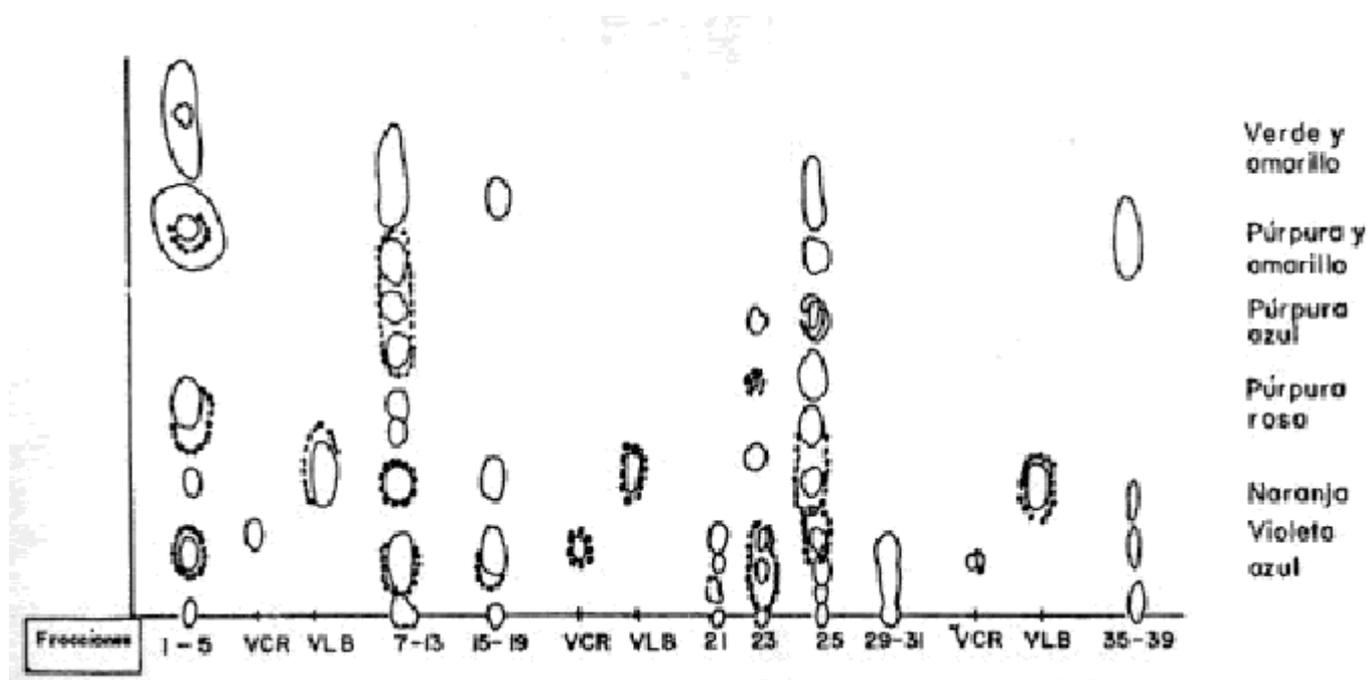


Fig. 7. Cromatografía de las fracciones de la muestra 25. La línea punteada representa lo visible con luz ultravioleta. VCR= Vincristina, VLB= Vincalécoblastina.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### De la Necesidad del Cultivo

Al analizar químicamente plantas de la misma especie procedentes de diferentes regiones se encontró que su composición no era la misma, tanto cuanti como cualitativamente (Claus, 1965; Romo de Vivar, 1966; Guerrero, 1979; entre otros) lo que nos indica que para obtener una producción más o menos homogénea de principios activos, son necesarios ensayos de domesticación y posteriormente el cultivo de plantas seleccionadas bajo un manejo apropiado. En el caso de las especies estudiadas se ignoraban (por no existir información publicada) sus requerimientos de crecimiento y cultivo por lo que se realizaron desde ensayos de germinación hasta propagación asexual.

También es recomendable cultivar especies que están sometidas a sobreaprovechamiento para no dañar al recurso y así garantizar su

permanencia en su hábitat natural.

En conclusión, nuestro país podría convertirse en exportador de materia prima, e incluso de los alcaloides totales de *Catharanthus*, al tener a los laboratorios que la procesan comercialmente en Estados Unidos, recomendando que se ensaye la propagación de diferentes ecotipos, dado a que esa especie crece en numerosos Estados de la República, es presumible que debe haber variación en la producción de alcaloides, por lo que se puede considerar este trabajo como un ensayo preliminar para el conocimiento previo a la domesticación y cultivo.

También se requiere ampliar los conocimientos acerca de la autoecología de las especies, aquí comenzadas a estudiar, mismos que harían posible que se les pueda propagar con mayor margen de seguridad.

#### Resultados del Crecimiento y Floración

La propagación de las tres especies aquí tratadas representa diferentes problemas, las dos primeras (*Helenium* y *Viguiera*) nunca han sido cultivadas y se conoce poco acerca de ellas, ignorándose sus hábitos de crecimiento. En relación a la tercera especie *C. roseus*, aunque cultivada en varias partes tropicales cálidas húmedas del mundo, se intentó cultivarla en condiciones templadas y a la altura del Valle de México (2,240 m). Los resultados obtenidos sobre el crecimiento de las tres especies en cuanto a sus hábitos, parecen ser alentadores, para hacer factibles sus posibilidades de cultivo y subsecuente domesticación.

Asimismo, pudieron ser conocidas en parte, algunas de las respuestas o actitudes, como germinación, densidad de siembra, método de extracción de semillas, cosecha y procesamiento de material vegetal. Algunos requerimientos del cultivo tales como aclareo, podas, problemas sanitarios y procesos de floración y fructificación en el caso de *Helenium*, que completó su ciclo vital, no encontrándose problemas serios para su cultivo.

También fueron conocidos los casos de *Viguiera*, que a 23 meses de edad aún no tenían flores, y de *Catharanthus* que a pesar de presentarlas, la mayoría no maduran y se caen, lo que pudo deberse a problemas fisiológicos ocasionados probablemente por el fotoperíodo u otro factor fisicoambiental.

*Catharanthus*, soportó diferentes grados de poda, dato que podría ser útil en el caso de que se cultivase, ya que no sería necesario arrancarla totalmente y así se dispondría de propágulos que serían útiles por muchos años. En el mismo caso esta *V. buddleiaeformis*, pues cosechando únicamente los renuevos con hojas y dejando los tallos, pueden efectuarse varios cortes al año, sin causar gran daño a la planta.

El porqué ésta última no creció bien en el invernadero, formando un tallo tan largo y delgado, que no se podía sostener erecto, es algo que puede tener muchas causas; tal vez la combinación, alta temperatura-humedad, la hizo desarrollarse muy aceleradamente, descompensando su metabolismo normal, lo que se puede corroborar al ver las plantas que estaban creciendo al mismo tiempo en el exterior las que lo hicieron a un ritmo mucho menor, pero con gran vigor y después al decimocuarto mes dieron un espectacular incremento, en altura (Fig. 1).

Algo similar, pero en sentido inverso, se observa en los resultados del crecimiento de *Catharanthus*, la que se comportó de manera muy diferente en el medio ambiente con respecto a las plantas de invernadero, en este último, la planta (tropical) fue favorecida por las altas temperaturas y al medio ambiente empezó a crecer sólo hasta que pasaron los días fríos de enero-febrero, creciendo muy lentamente los siguientes meses hasta marzo del año siguiente en que se concluyó la parte de cultivo y se inició la parte de análisis químico de las plantas.

Cabe aclarar aquí, que a pesar de la lentitud de su crecimiento ésta puede ser compensada por la presencia de los alcaloides de interés.

#### De los Principios Activos y sus Resultados

La cantidad de la helenalina, según la etapa del ciclo vital en la que es determinada, va desde 0.05 a 0.228 % de planta seca (Romo de Vivar, 1961). Como se puede apreciar en las cifras anteriores, su presencia en la planta no es muy abundante, y para lograr esas determinaciones fue necesario usar 7 y 25 kg de planta seca respectivamente, que haciendo la conversión a planta verde significan 70 y 250 kg.

En este trabajo, se analizaron muestras de la planta de varios pesos, en promedio 50 gr, los que dieron una cantidad de extracto de 0.6 gr. Lo interesante es que a pesar de la baja cantidad de planta analizada, fue posible detectar que elaboraron las lectonas, tanto en condiciones de invernadero, como en las del medio ambiente y en las diferentes edades en las que fueron cosechadas (Fig. 1), apareciendo desde las muestras más grandes.

Los resultados obtenidos al tratar de separar los alcaloides de *Catharanthus* no son concluyentes en cuanto a que no se logró separar de los varios que elabora los dos de interés farmacológico, así en cambio son positivos; ya que el proceso para separarlos es en extremo laborioso y complicado, que aunado a las bajas concentraciones en que se presenta en la planta (0.00025 % de vincaleucoblastina), puesto que se trabajó también con muestras de planta pequeña (100 g), se obtuvieron extractos crudos totales de alcaloides en cantidades tan pequeñas como 0.476 g en

promedio, lo que dificulta su separación total.

Aunque se estudiaron diferentes métodos de extracción y separación, ninguno se consideró mas adecuado que el recomendado por Farnsworth (1964), que agrupa los 63 diferentes alcaloides descubiertos hasta ese año en 8 categorías o clases de acuerdo principalmente a sus reacciones cromogénicas, al ser revelado el extracto con sulfato cérico amoniacal, como se aprecia en las figuras 6 y 7, donde se notan las manchas obtenidas y a la derecha los colores que dieron. Asimismo, de entre varios métodos, se siguió para tratar de separar mejor los alcaloides, el sugerido por Cone et al. (1963), empleando la mezcla de eluyentes que ellos recomendaban para la cromatografía en capa delgada.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en los Institutos Nacional de Investigaciones Forestales (SARH) y de Química (UNAM). Se agradece las facilidades brindadas a A.V. Villa Salas, R. Villareal, F. Patiño, L. González Leija, C. González y R. Zetina. A Alfonso Romo de Vivar, Rodolfo Salinas, E. Sánchez Saloma y D. Martínez Calderón la revisión crítica del manuscrito. A J. Soto Soria por el análisis fisicoquímico del suelo y a R. Toscano las determinaciones en espectrofotómetro. El apoyo económico para iniciar esta investigación fue proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y por Productos Químicos Vegetales Mexicanos.

#### LITERATURA CITADA

- ALINE, S. M. y L. PAASCH, 1973. Intoxicación de borregos con *Helenium integrifolium*. *Veterinaria*, 4: 214-222.
- CALDERON, S. y C. P. STANDLEY, 1941. Flora Salvadoreña. "2da. Ed. Imprenta Nacional, El Salvador, Rep. del Salvador. 221 p.
- CLAUS, E. P. y V. E. TYLER, Jr., 1965. *Pharmacognosy*. Lea & Fabiger (Eds.) Philadelphia, USA: 315-317.
- CONE, J. N. et al., 1963. Alkaloids of *Vinca roseus* L. (*Catharanthus roseus* G. Don) XV. *Jour. Pharm. Sci.*, 52: 688.
- DOLLALLITE, J.W., W.T. HARDY y J.B. HENSON, 1964. Toxicity of *Helenium microcephalum* (small-head sneezweed). *Journ. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 145: 694-696.
- FARNSWORTH, R. N., 1961. The pharmacognosy of the Periwinkles: *Vinca* & *Catharanthus*. *Lloydia*, 24: 105-138.
- FARNSWORTH, R. N. et al., 1964. Studies on *Catharanthus* alkaloids. *Lloydia*, 27: 302-314.
- GONZALEZ, D. M. et al., 1976. Estudio preclínico de lactonas sesquitérpicas como agentes anticancerosos. In: Mem. Jornada Conmemorativa del Aniversario de la Investigación Científica del IMSS, México, D.F., 22-26 Nov. 1976.
- GUERRERO, C. et al., 1979. Algunos derivados de las budleínas "A" y "B" y actividad citotóxica de dos líneas celulares de la substancia A. *Rev. Latinamer. Química*, 10: 145-149.
- JIMENEZ, R. L., 1975. Determinación de las estructuras de las budleínas "A" y "B". Tesis Maestría en Ciencias Químicas. Fac. Química, Univ. Nal. Autón. México.
- KRAEMER, H., 1916. *Applied and Economy Botany*. John Wiley & Son Inc., London: 727-748.
- KREIG, B. M., 1970. *Medicina Verde*. CECSA (Ed.) México, D. F. 297 p.
- LEE, K. H., H. FURUKAMA y E. S. HUANG, 1971. Antitumor agents: 3, Synthesis and citotoxic activity of helenalin amine adducts and relate derivaties. *J. Med. Chem.*, 15: 609-611.
- MADRIGAL, S. X., 1967. Contribución al conocimiento de la ecología de los bosques de oyamel (*Abies religiosa* (H.B.K.) Schl. et Cham), en el Valle de México. *Bol. Tec. Inst. Nal. Invest. Forest. SAG. México*, 18
- MARTINEZ, M., 1959. *Las Plantas Medicinales de México*. Botas (Ed.): 107-108.
- PANIAGUA, C.M., 1973. *Las plantas tóxicas de México*. Tesis Profesional, Biología. Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México.
- PARAY, L., 1958. Las compuestas del Valle de México. *Bol. Soc. not. Mex.*, 22: 41-67.
- PETIT, C. R. y G.M. CRAGG, 1973. Antineoplastic agents. 32. The pseudoguaianolide helenalin. *Experientia*, 29: 781.

- ROMO de VIVAR, R. A. y J. ROMO, 1959. Constituents of *Helenium mexicanum* H. B. K. Chem. Ind., 27: 882.
- ROMO de VIVAR, R. A. y J. ROMO, 1961. Las lactonas de *Helenium mexicanum* H. B. K. Ciencia, 21: 33-35.
- ROMO de VIVAR, R.A., J. ROMO, E. A. BRATOEFF y T. RIOS, 1966. Structure of hysteine, a new sesquiterpenelactone. J. Org. Chem., 31:673-677.
- SANCHEZ, S. O., 1976. La Flora del Valle de México Herrero (Ed.) México.
- SAYAS, A., 1977. Comunicación personal.
- TELLEZ, M. J. et al., 1973. Citotoxicidad de diferentes sesquiterpenelactonas sobre células de mamíferos *in vitro* en cultivo de tejidos. In: VI Congr. Nal. Cienc. Farmacéuticas. México, D. F.
- WAIZEL, B. J., 1979. Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de 3 especies de plantas con propiedades anticancerígenas. Tesis Doctoral (Biología), Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México, 90 p.