



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS
DE JUAN MECATE (*Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis) Y
DETERMINACION DE SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Tesis que para optar por el grado de Maestra en Ciencias en el área de Toxicología
presenta

NOEMÍ LIDIA CONTRERAS GARCÍA

TUTOR:

M. EN C. JOSÉ LUIS MORENO HERNANDEZ DUQUE

COMITÉ TUTORAL:

DR. EN C. EDUARDO DE LA CERDA GONZALEZ

M.EN C. MARGARITA DE LA CERDA LEMUS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

**ING. NOEMÍ LIDIA CONTRERAS GARCÍA
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .**

Estimado (a) alumno (a) Contreras:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Extracción y Caracterización de Principios Activos de Juan Mecate (*Anredera cordifolia*) y Determinación de su Actividad Antioxidante"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 12 de marzo de 2013
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo
JJRG.mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

Por este conducto me permito comunicarle que la alumna de maestría NOEMI LIDIA CONTRERAS GARCIA, realizó su tesis de Maestría “EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE “JUAN MECATE (*Anredera cordifolia*) Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE” en el laboratorio de Instrumentación adscrito al Centro de Ciencias Básicas,

El trabajo de tesis se realizó de acuerdo a los objetivos, cumpliendo cada uno de ellos.

Hacemos constar que la tesis fue revisada por los asesores y un servidor, quienes brindamos nuestro voto aprobatorio para que imprima y realice los trámites correspondientes para que realice su examen de grado

Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., Marzo de 2013

Handwritten signature of Jose Luis Moreno Hernandez Duque in black ink.

M. en C JOSE LUIS MORENO HERNANDEZ DUQUE

Handwritten signature of Eduardo de la Cerda Gonzalez in black ink.

Dr en C. EDUARDO DE LA CERDA GONZALEZ

Handwritten signature of Margarita de la Cerda Lemus in black ink.

M. en C. MARGARITA DE LA CERDA LEMUS.



Agradecimientos:

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por ofrecer este programa de posgrados en el cual participé.

A CONACyT, por el apoyo que ofrece a la investigación y formación de investigadores en este programa de posgrados PNPC.

A mi comité tutorial:

Al M. en C. José Luis Moreno Hernández-Duque, por su paciencia, apoyo y guía en la realización de este trabajo.

Al Dr. en C. Eduardo de la Cerda González, por su apoyo, consejos y guía incondicional en la realización y revisión de este trabajo.

A la M. en C. Margarita de la Cerda Lemus, por su paciencia y disposición en todas las revisiones que se realizaron para llegar al final de este trabajo.

A todas las personas de quienes recibí apoyo incondicional, en especial:

Al Dr. en C. Fernando Jaramillo Juárez por su apoyo con reactivos, consejos y disposición en la opinión de este trabajo.

Al M. en C. Juan Bonifacio Martínez, jefe del Depto. de Química del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), por su apoyo en la caracterización (determinación de tamaño de partícula) por las técnicas de microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. en C. Ma. Consolación Martínez Saldaña, por su paciencia y apoyo en la revisión de los cortes histológicos que se realizaron.

Al Dr. En C. Francisco A. Posadas del Río, por los consejos que amablemente estuvo dispuesto a proporcionarme durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. en C. Fidel Guevara Lara, por ser tan amable al facilitarme reactivos.

A la T. L.Q. Ma. del Carmen Rubio, por su apoyo total en el laboratorio.

A la Lic. en C. N. Ma. Luisa Rodríguez Vázquez por los tips que amablemente me ofreció en el manejo de roedores.

Al Biól. David Santiago García, por su total disposición y apoyo en el manejo de *Loxosceles apachea*, aún cuando mucho trabajo se realizó fuera de su horario.

Al Biól. H. Manuel González Reynaga, por compartir conmigo su experiencia en la realización de cortes histológicos.

A todos los maestros que participan en este posgrado en toxicología, de quienes aprendí lo mejor que pude.

A mis compañeros de viaje, por hacer de estos dos años un espacio agradable; Fernando, Juan, Oscar y todos los demás biotecnólogos y toxicólogos de la 9ª. Generación de la UAA.



Dedicatoria:

A Oswaldo y Aimeé.

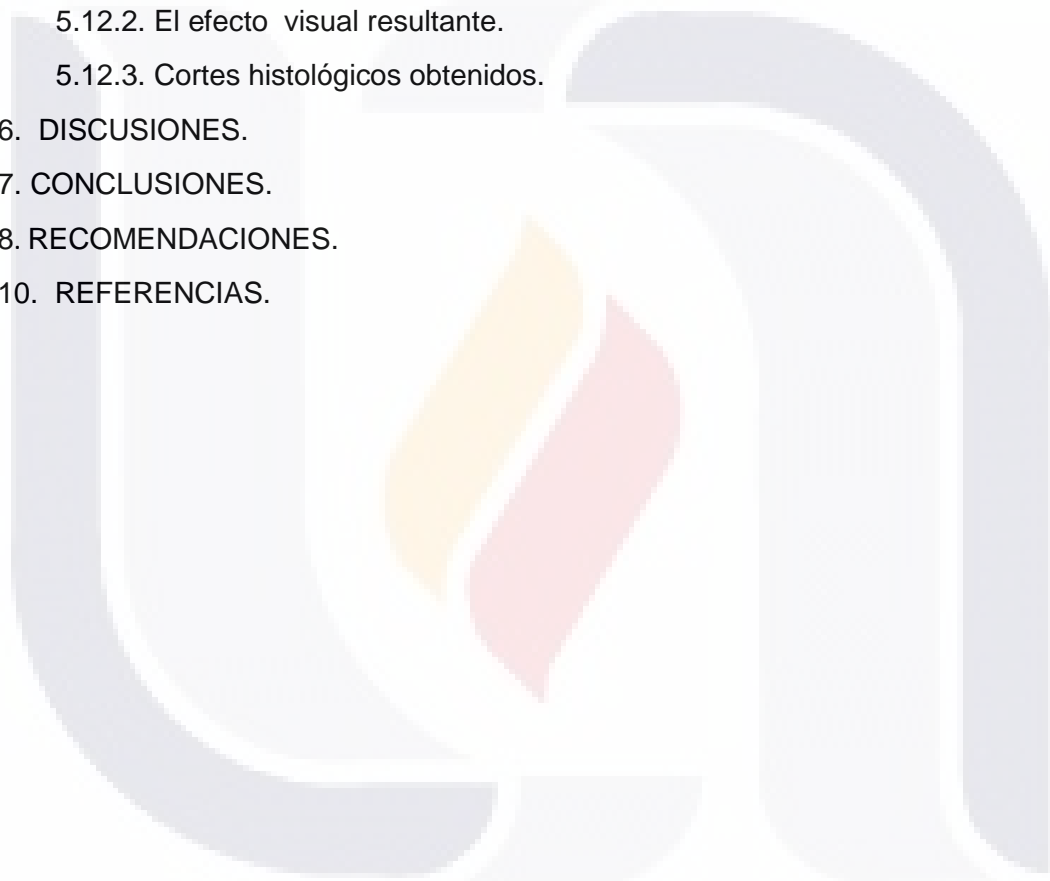


INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN.	11
1. ANTECEDENTES.	12
1.1. Las plantas medicinales en el mundo.	12
1.2. Las plantas medicinales en México.	13
1.3. Las plantas medicinales en Aguascalientes.	14
1.3.1 Juan mecate (<i>Anredera cordifolia</i>).	14
1.3.2 Propiedades que se le atribuyen al género.	15
1.3.3 Descripción botánica <i>Anredera cordifolia</i> .	16
1.4. Metabolismo de las plantas.	17
1.4.1 Principios activos del género <i>Anredera</i> .	19
1.4.2 Rutas metabólicas a partir de las cuales se producen los principios activos de <i>Anredera cordifolia</i> .	19
1.5. El estrés oxidativo.	22
1.5.1 Radicales libres.	23
1.5.2 Efecto antioxidante.	26
1.6. El proceso inflamatorio.	27
1.6.1 Mediadores de la inflamación.	29
1.6. 2. La infiltración leucocitaria y sus etapas.	30
1.7. Loxoscelismo.	33
1.7.1 Loxoscelismo cutáneo.	33
2. JUSTIFICACION.	37
3. HIPOTESIS.	37
4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.	37
4.1 Objetivo general del trabajo.	37
4.2 Objetivos particulares.	37
5. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.	38
5.1. Obtención de material vegetal.	38

5.2. Extracción preliminar de principios activos, para la determinación del solvente de extracción y la parte de la planta a utilizar.	38
5.2.1. Cromatografía en capa fina de hoja, raíz y tallo.	38
5.2.2. Determinación del solvente de extracción más eficiente.	39
5.3. Medición del contenido de humedad de las hojas.	39
5.4. Balance de masa.	40
5.5 Tamaño de partícula.	40
5.6. Obtención de principios activos.	42
5.6.1 Selección del método de extracción y la muestra a utilizar.	42
5.6.2. Extracción de principios activos para pruebas preliminares.	43
5.7. Pruebas preliminares.	43
5.7.1. Determinación de saponinas.	44
5.7.1.a. Determinación de saponinas por el método de la espuma.	44
5.7.2. Determinación de flavonoides.	44
5.7.3. Determinación de cumarinas.	45
5.7.4 Determinación de taninos.	46
5.7.5 Determinación de triterpenos (ensayo de Liebermann-Buchard).	46
5.8. Pruebas cromatográficas.	47
5.8.1. Determinación de terpenoides y fenilpropanoides por cromatografía de capa fina.	47
5.8.2. Determinación de triterpenos y flavonoides por cromatografía de capa fina.	48
5.8.3. Determinación de cumarinas por cromatografía de capa fina.	49
5.9. Pruebas cuantitativas.	50
5.9.1. Preparación de extractos:	50
5.9.2. Determinación de capacidad antirradical con DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).	51
5.9.3. Determinación de fenoles. Método de Folin y Ciocalteu.	54
5.9.4 Actividad de barrido del óxido nítrico.	55
5.9.5. Determinación del poder reductor.	56

5.9.6. Determinación de flavonoides totales.	57
5.9.7. Resumen de resultados de pruebas cuantitativas.	59
5.10. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.	59
5.10.1 Compuestos encontrados:	60
5.11. Pruebas realizadas en rata con el veneno de la araña <i>Loxosceles apachea</i> .	67
5.12.1. Procedimiento para la realización de la prueba.	68
5.12.2. El efecto visual resultante.	69
5.12.3. Cortes histológicos obtenidos.	70
6. DISCUSIONES.	77
7. CONCLUSIONES.	82
8. RECOMENDACIONES.	83
10. REFERENCIAS.	84



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Anredera cordifolia</i> .. Ejemplar de <i>Anredera cordifolia</i> , sembrado en el jardín botánico de la UAA.	16
Figura 2. Dibujo de <i>Anredera cordifolia</i> , mostrando sus característica físicas.	17
Figura 3. Origen de las rutas metabólicas que generan a los compuestos activos (metabolitos secundarios) en las plantas.	19
Figura 4. Ruta del ácido mevalónico	20
Figura 5. Ruta del ácido shikímico.	21
Figura 6. Ruta de los fenilpropanoides.	22
Figura 7. Interacción de los radicales libres con biomoléculas.	23
Figura 8. Diagrama donación de electrones en el efecto antioxidante	26
Figura 9. Araña <i>Loxosceles apachea</i> (araña violinista).	33
Figura 10. Placa liveloide.	35
Figura 11. Diferentes aspectos del efecto generado por la mordedura de la araña <i>Loxosceles apachea</i> .	36
Figura 12. Fotografía: cromatografía en capa fina de hojas, tallo y raíz.	39
Figura 13. Fotografía con microscopio electrónico para la medición de tamaño de partícula en el extracto liofilizado de <i>Anredera cordifolia</i> .	41
Figura 14. Fotografía con microscopio electrónico para la medición del tamaño de partícula del residuo liofilizado de <i>Anredera cordifolia</i> .	41
Figura 15. Fotografía con microscopio electrónico para la medición del tamaño de partícula del residuo liofilizado de <i>Anredera cordifolia</i> .	42
Figura 16. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de saponinas.	44
Figura 17. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de saponinas por el método de la espuma.	44
Figura 18. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de flavonoides.	45
Figura 19. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de cumarinas..	45
Figura 20. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de taninos.	46

Figura 21. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de triterpenos.	47
Figura 22. Fotografía: cromatografía en capa fina de hojas y raíz .vista con UV y revelada con vainillina.	48
Figura 23. Visualización con UV para la determinación de triterpenos y flavonoides.	49
Figura 24. Cromatografía para la determinación de cumarinas	50
Figura 25. Fotografías de las etapas de preparación del extracto para su análisis.	51
Figura 26. Fotografía de las etapas de la reacción para la determinación de la capacidad antirradical con DPPH.	51
Figura 27. Reacción de la curva de calibración para la determinación de fenoles.	54
Figura 28. Reacción de la curva de calibración para la determinación de barrido de oxido nítrico.	55
Figura 29. Fotografías de aspectos de la reacción para la determinación del poder reductor.	56
Figura 30. Aspectos de la reacción para la determinación cuantitativa de flavonoides totales.	57
Figura 31. Fotografía del espectrofotómetro con el que realizó la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios de <i>Anredera cordifolia</i> .	58
Figura 32. Cromatograma obtenido del extracto etanólico de raíz en el equipo GC-MS.	61
Figura 33. Cromatograma obtenido del extracto etanólico de hojas en el equipo GC-MS.	62
Figura 34. Cromatograma obtenido a partir de raspado de bandas de Cromatografía en capa fina.	63
Figura 35. Espectros de los diferentes compuestos encontrados en las muestras de <i>Anredera cordifolia</i> .	66
Figura 36. Extracción de veneno de <i>Loxosceles apachea</i> con estimulación eléctrica a los quelíceros.	68
Figura 37. Fotografías de diferentes etapas de la reacción después de la inoculación del veneno de <i>Loxosceles apachea</i> en la rata.	69

Figura 38. Fotografías de diferentes etapas de la reacción después de la inoculación del veneno de <i>Loxosceles apachea</i> en la rata a la que se inyectó previamente extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	69
Figura 39. Corte histológico de Hígado de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> .	71
Figura 40. Corte histológico de Hígado de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> .	71
Figura 41. Corte histológico de riñón de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> .	72
Figura 42. Corte histológico de riñón de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> , previamente tratada con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	72
Figura 43. Corte histológico de riñón de rata tratada con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	73
Figura 44. Corte histológico de hígado de rata tratada con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	73
Figura 45. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> .	74
Figura 46. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> .	74
Figura 47. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de <i>Loxosceles apachea</i> , y tratada previamente con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	75
Figura 48. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de <i>loxosceles apachea</i> , tratada previamente con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	75
Figura 49. Corte histológico de piel de rata tratada con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	76
Figura 50. Corte histológico de piel (dermis profunda) de rata tratada con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> .	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa de las capacidades antirradical de los diferentes ejemplares de <i>Anredera cordifolia</i> , procesadas de diferentes formas para obtener el extracto.	52
Tabla 2. Tabla comparativa de la capacidad antirradical del extracto obtenido de la muestra originaria de colinas del río, a diferentes diluciones.	53
Tabla 3. Tabla de resultados de acuerdo a las absorbancias obtenidas y las curvas de calibración para cada prueba.	59
Tabla 4. Resumen de compuestos encontrados en Juan mecate.	67
Tabla 5. Prueba para la determinación del efecto producido en ratas inoculadas con el veneno de la araña <i>Loxosceles apachea</i> en ratas tratadas con extracto de <i>Anredera cordifolia</i> y sin tratamiento.	69

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. : Gráfica comparativa de La capacidad antirradical de diferentes antioxidantes comparados con extractos de <i>Anredera cordifolia</i> .	53
Gráfica 2. curva de calibración para la determinación de Capacidad antioxidante con DPPH	54
Gráfica 3. curva de calibración para la determinación de Fenoles por el método Folin-Ciocalteu	55
Gráfica 4. Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición de oxido nítrico	56
Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de poder reductor.	57
Gráfica 6. curva de calibración para la determinación de Flavonoides.	58

RESUMEN

Como todo México, el estado de Aguascalientes, cuenta con un importante acervo cultural, en donde podemos incluir el conocimiento y uso de plantas con fines medicinales, dentro de las cuales se encuentra la planta comúnmente conocida como “Juan mecate”.

Juan mecate (*Anredera cordifolia*), es una planta que se ha venido utilizando para fines medicinales desde hace más de 50 años en Aguascalientes, como tratamiento para los piquetes de zancudos, arañas, animales ponzoñosos, heridas y acné. Esta planta pertenece a uno de los 4 géneros que se conocen de la familia Basellaceae, de los cuales, se han extraído como compuestos activos: esteroides, triterpenos y chalconas, los cuales parece ser le dan las propiedades que se le atribuyen a este género, entre las que se destacan; *Anredera ramosa* para evitar la caída del cabello (Grijalva, P., 2005), *Anredera vesicaria* como antiinflamatorio y antimicrobiano, (Martínez-García, y Avendaño, 1996); *Anredera cordifolia* como antimicrobiano (Tshikalange, *et. al.*, 2005); *Anredera difusa* con actividad cicatrizante (Moura-Letts, *et. al.*, 2006); efecto analgésico de *Anredera leptostachys* (Tornos, *et. al.*, 1999)

En este proyecto, se obtuvo el extracto de Juan mecate (*Anredera cordifolia*) con la finalidad de medir su capacidad antioxidante y otras propiedades, encontrando que la capacidad antioxidante que muestra es bastante alta, además de mostrar capacidad de barrido de óxido nítrico, poder reductor y compuestos activos como: flavonoides, fenoles, cumarinas, saponinas esteroidales principalmente, comprobándose además una capacidad antiinflamatoria bastante importante al observar la respuesta ante el daño causado por la mordedura de la araña *Loxosceles apachea* (araña violinista o del rincón) en rata.

ABSTRACT

Like all Mexico, the State of Aguascalientes has an important cultural heritage, in this we can include the knowledge and usage of plants with medical means, among this we can find the use of the plant commonly known as “Juan mecate”.

Juan mecate (*Anredera cordifolia*) plant has been used for medical purposes since more than 50 years ago in Aguascalientes as a treatment for mosquitoes, spiders, venomous animals stings, wounds and acne. To one of the genres known of the Bascellaceae family, of which, active compounds like sterols, triterpens and chalcones has been extracted, this compounds seem to give the properties attributed to this genre, in which we can highlight their antiinflammatory, and antimicrobial activity (Martínez-García, y Avendaño, 1996); antimicrobial (Tshikalange, *et al.*, 2005); cicatrizing (Moura-Letts, *et al.*, 1997); analgesic (Tornos, *et al.*, 1999); hair losing (Grijalva, P., 2005).

In this project we obtained the extract of the Juan mecate (*Anredera cordifolia*) plant with the purpose of measuring it's antioxidant capacity and other properties, in this study we found a high antioxidant capacity, also showing nitric oxide sweeping capacity. Reducing power and active compounds as: flavonoids, phenols, cumarines, and steroidal sapogenins mainly, also proving an important antiinflammatory capacity when watching it's response before the damage inflicted for the *Loxosceles apachea* spider's (Violinist spider or of the corner) bite.

INTRODUCCIÓN:

Un análisis de las prescripciones presentadas en farmacias de Estados Unidos arrojó en 1998 que, alrededor del 25% contienen extractos de plantas o principios activos derivados de ellas; por otra parte, no menos de 119 sustancias químicas, derivadas de 90 especies pueden ser consideradas de importancia actualmente en muchos países, de ellas, el 74% fue descubierto como resultado de estudios químicos o aislamiento de los principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional (principalmente de Asia, África y América) (Laza, *et. al.*, 2003).

Es indiscutible que el vasto cúmulo de conocimientos sobre la explotación de los recursos naturales con fines medicinales, adquiridos empíricamente por el ser humano a lo largo de miles de años, ha favorecido el progreso de diversas áreas de las ciencias médicas. En el caso particular de la investigación propia de la farmacognosia, contribuyó al desarrollo de la terapéutica, la farmacéutica, la farmacología y la medicina, así como al de la industria cosmética y de los alimentos. Aunque, sin duda, su mayor impacto lo ha tenido en el campo de las ciencias médicas y farmacéuticas al identificar y desarrollar nuevos y potentes agentes medicinales. Las nuevas tendencias del pensamiento científico han vuelto la mirada a la naturaleza en busca de una vida plena, favoreciendo el que resurja el interés por los productos naturales como fuente de materia prima para mantener la salud y el bienestar del ser humano en un mundo regido por la tecnología.

Sin embargo, no se debe olvidar que lo natural no siempre es benéfico para el organismo, sino que depende de la cantidad, los controles de calidad y su procesamiento, lo cual hace necesario incrementar los estudios científicos para identificar o refutar las propiedades que pudieran ejercer en el ser humano a corto y largo plazo.

Otro aspecto a tomar en cuenta es que México es un país muy rico en conocimientos ancestrales en el área de la medicina tradicional, lo que podría considerarse una oportunidad muy importante de crecimiento económico.

1. ANTECEDENTES

1.1. Las plantas medicinales en el mundo.

Desde tiempos inmemoriales, la medicina tradicional ha desempeñado un rol muy importante en el cuidado de la salud y en la prevención de enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la medicina tradicional como "la combinación total de conocimientos y prácticas, ya sea explicables o no, que se utiliza en el diagnóstico, prevención o eliminación de enfermedades físicas, mentales o sociales y que puede basarse exclusivamente en la experiencia pasada y la observación que se entregó de generación en generación, verbalmente o por escrito" (OMS, 2001).

El importante papel de la medicina tradicional en los sistemas de salud mundial ha sido reconocido durante mucho tiempo. Prueba de ello es la Declaración de "Alma-Ata" de 1978, relativa a la Atención Primaria de la Salud (APS), que reconoce el papel de la medicina tradicional y de los profesionales de la salud. Desde entonces, una serie de resoluciones han sido adoptadas en varias reuniones de la OMS en el uso de los conocimientos de los medicamentos tradicionales, la legislación que rige la práctica de la medicina tradicional, la promoción y el desarrollo de esta y la investigación de plantas medicinales.

En diciembre de 2010, la OMS declaró que desarrollará, por primera vez, una clasificación de la medicina tradicional, allanando el camino para la evaluación objetiva de sus beneficios, este proyecto contribuirá a la creación de una base de evidencia para la medicina tradicional.

En dicha declaración, se reconoce el uso predominante de la medicina tradicional en el Pacífico occidental, Asia sudoriental, África y América Latina, y el incremento del uso de hierbas medicinales, acupuntura y otras prácticas de medicina tradicional en Europa y América del Norte. Reconociendo además, que algunos países han desarrollado normas nacionales para la clasificación de la medicina tradicional, pero no hay una plataforma internacional que permita la armonización de los datos para su uso clínico, epidemiológico y estadístico, que es necesaria para permitir a los médicos,

investigadores y responsables políticos el monitoreo para la seguridad integral, la eficacia, el uso, dosis y las tendencias en el cuidado de la salud (scidev.net 2010).

1.2. Las plantas medicinales en México.

En México, la información sobre el empleo de las plantas medicinales con fines curativos se puede encontrar desde el tiempo en que los aztecas llamaban a la medicina (Ticiotl) y a los médicos (Ticitl), y usaban las plantas para curar diversas enfermedades tal y como se muestra en el códice Badiano escrito en náhuatl a mediados de 1552 por Martín de la Cruz, un médico indígena del Colegio de Santa Cruz de Tlatelolco. El texto conocido popularmente como De la Cruz-Badiano (en latín su nombre fue *Libellus de medicinalibus indorum herbis* y el libro original de Martín de la Cruz se titulaba Amate Cehuatl Xihuitl Pitli), fué traducido al latín por un indígena xochimilca de nombre Juan Badiano (médico indígena nacido en 1484) alumno del mismo colegio.

El Libellus es una obra de 70 hojas con 89 láminas que contienen 185 dibujos de plantas que sirven para un buen número de tratamientos contra las enfermedades más comunes existentes en esa época (se encuentran remedios para heridas, curación de encías inflamadas, para quemaduras del cuerpo, fracturas de la cabeza, etc.) y para ello se hicieron descripciones de cerca de 251 plantas diferentes, sus usos terapéuticos y dibujos a la acuarela (Lozoya, 1998).

La UNAM ha hecho estudios químicos y farmacológicos en algunas especies de las nombradas en el códice Badiano, y ha comprobado las propiedades terapéuticas que se mencionan en el documento, de igual forma que los científicos de la Universidad de Utah que en 1975 comprobaron las propiedades referidas en dicho escrito de otras plantas; sin embargo, hasta hoy la identificación botánica de las plantas del Códice de la Cruz-Badiano está incompleta, al igual que su evaluación científica (Ríos, G., 2010).

El aporte más valioso de las plantas medicinales mexicanas a la industria farmacéutica a nivel mundial, sin duda alguna es el barbasco, planta silvestre de Veracruz conocida como camote silvestre, ñame o camote mexicano, cuyo nombre científico es *Dioscorea composita* y *Dioscorea mexicana*. Estas dos especies de barbasco crecen en todo el sureste mexicano tropical lluvioso, en las selvas medianas y altas; es un bejuco que desarrolla un camote bajo tierra, que sintetiza (fabrica) una

molécula llamada diosgenina la cual es muy parecida a las hormonas sexuales humanas, tanto la progesterona de las mujeres como de la testosterona de los hombres. Con esta planta comenzó la revolución sexual en el mundo, pues a partir de ella se fabricaron las píldoras anticonceptivas para las mujeres de todo el planeta. Además de la misma diosgenina del barbasco, se desarrollaron un grupo de medicamentos alópatas de tipo corticosteroides, como la cortisona.

Otra de las plantas es el toloache, la *Datura stramonium*, esta planta es tóxica si se preparan sus hojas en té para tomar; pero uno de sus alcaloides, la hiosciamina, es uno de los componentes de la buscapina, medicamento analgésico, antiinflamatorio y anticolinérgico (utilizado en el tratamiento de la colitis a base de bromuro de butilhioscina) para los cólicos menstruales y otros (Muñeton., 2009)

El Consejo Asesor Para la Medicina Tradicional de la Secretaría de Salud de México, a través de una red de investigadores conformada por investigadores de varias universidades del país, entre ellas la UNAM, está seleccionando un grupo de plantas medicinales que integrarán el cuadro básico para el sector salud. Hasta este momento se cuenta ya con un total de 80 formulas herbolarias y están en proceso 17, según el director de Medicina Tradicional, perteneciente a la Secretaría de Salud de nuestro país, el Dr. Alejandro Almaguer González.

1.3. Las plantas medicinales en Aguascalientes.

Aguascalientes cuenta como todo el país con una variedad de plantas que se han venido utilizando por la población como plantas medicinales, una de estas plantas es la denominada comúnmente “Juan Mecate”, cuyo uso se remonta según testimonios a más de 50 años en la población aguascalentense.

1.3.1 Juan mecate (*Anredera cordifolia*).

La planta “Juan mecate”, cuyo nombre científico es “*Anredera cordifolia*”, pertenece a la familia *Basellaceae*, esta familia comprende cuatro géneros, en su mayoría de zonas tropicales y subtropicales de América, sobre todo de su parte sur, aunque *Basella* es nativa del Viejo Mundo.

Las especies de *Anredera* se reconocen por ser plantas perennes, trepadoras, de raíces tuberosas, hojas alternas algo carnosas y flores pequeñas, blancas y fragantes.

Varios de sus representantes se cultivan en otros países por ser de interés económico desde el punto de vista alimenticio. Este es el caso de *Ullucus tuberosus* Cald. ("papa lisa", "ullucu"), apreciado por sus tubérculos comestibles en la región andina, y de *Basella alba* L. ("espinaca de China"), que se consume como verdura en muchos países de Asia y de África.

El género *Anredera*, cuenta con alrededor de 25 especies documentadas, de las cuales sobresalen, *Anredera scandens*, *Anredera ramosa*, *Anredera cordifolia*, *Anredera vesicaria* y *Anredera leptostachys*. Algunas especies se estiman así mismo como ornamentales o medicinales (Calderón de Rzedowski G., 1997).

1.3.2 Propiedades que se le atribuyen al género.

En general, las especies del género *Anredera*, muestran propiedades curativas, tales como la *Anredera vesicaria*, cuyo nombre común es suelda con suelda, muy utilizada en el tratamiento para evitar la caída del cabello (Grijalva, 2005), fracturas de huesos (Rodríguez, *et. al.*, 2005),), como antiinflamatorio y antimicrobial, (Martínez-García, y Avendaño, 1996), *Anredera cordifolia* utilizada como tratamiento después del parto en el baño y como alimento (Panyaphu, *et. al.*, 2011), efecto antimicrobial (Tshikalange, *et. al.*, 2005), *Anredera difusa* utilizada con efectos cicatrizantes (Moura-Letts, *et. al.*, 2006), *Anredera leptostachys* muestra características antiinflamatorias y analgésicas (Tornos, *et. al.*, 1999).

1.3.3 Descripción botánica *Anredera cordifolia*.

Figura 1 *Anredera cordifolia*. (Ten.) v. Steenis, Fl. Males. ser. 1, 5: 303. 1957. *Boussingaultia cordifolia* Ten., Ann. Sci. Nat. ser. 3, 19: 355. 1853. Ejemplar de *Anredera cordifolia* colectado en la Cd. de Aguascalientes y sembrado en el jardín botánico de la UAA. (incluye acercamiento de hoja, flores y tubérculos caulinares). Identificada por la Bióloga Margarita de la Cerda L., de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.



División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida (Angiospermae)

Orden: Caryophyllales

Familia: Basellaceae.

Género: *Anredera*

Especie: *cordifolia*

Nombre común: Juan mecate

El género se distribuye desde Florida y Texas hasta Sudamérica y las Antillas.

Al parecer nativa de Sudamérica, hoy ampliamente extendida a todos los continentes (el tipo corresponde a un individuo cultivado en Europa de procedencia desconocida) como planta adventicia, de fácil reproducción vegetativa, no pocas veces como maleza. De nuestro país se registra como silvestre de: Sonora, Tamaulipas, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, México, Puebla, Veracruz, Chiapas. (Calderón de Rzedowski G., 1997).

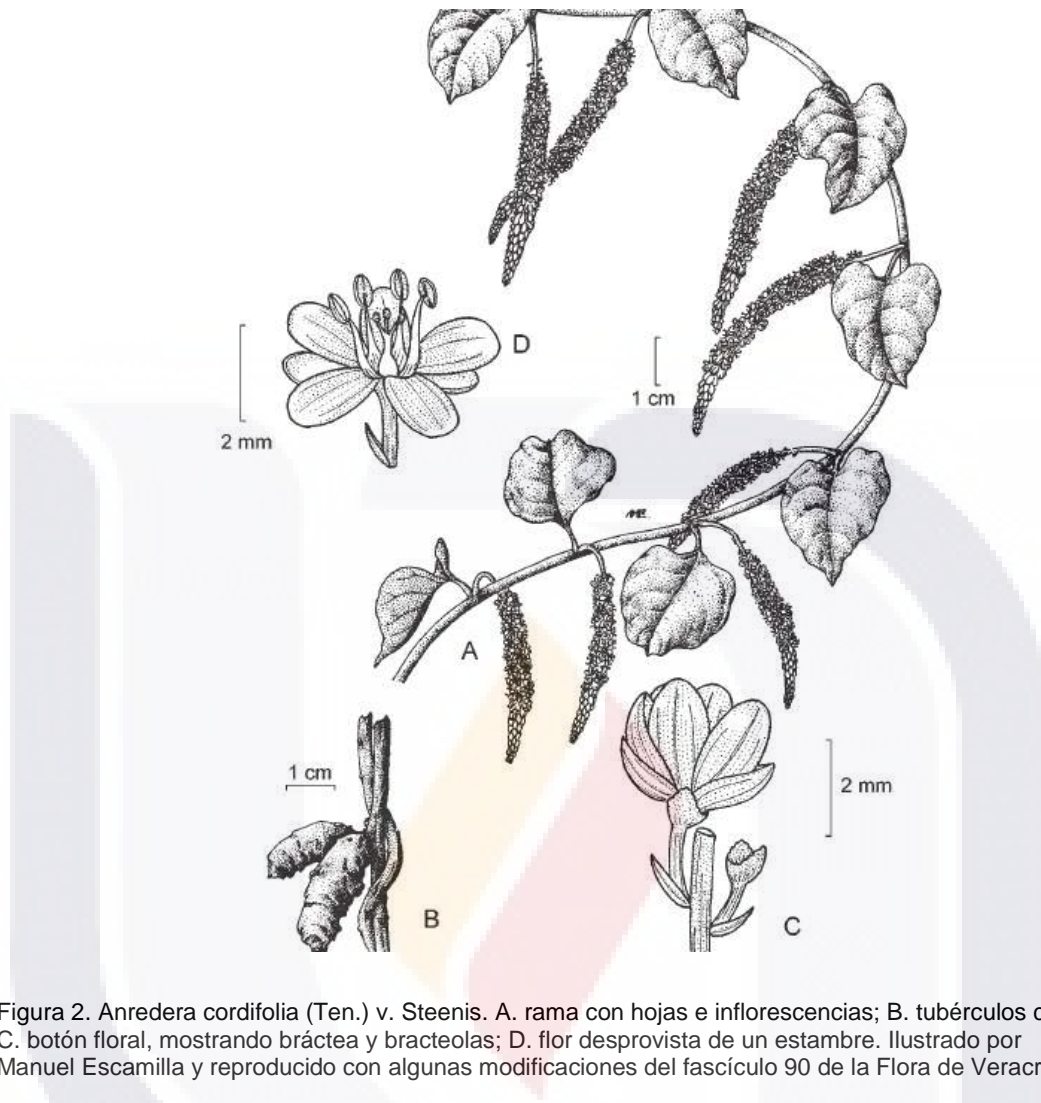


Figura 2. *Anredera cordifolia* (Ten.) v. Steenis. A. rama con hojas e inflorescencias; B. tubérculos caulinares; C. botón floral, mostrando bráctea y bracteolas; D. flor desprovista de un estambre. Ilustrado por Manuel Escamilla y reproducido con algunas modificaciones del fascículo 90 de la Flora de Veracruz.

1.4. Metabolismo de las plantas.

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía, termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones, estos se denominan metabolitos primarios.

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía, a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que, no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas,

carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios. Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono.

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas, o intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Algunos metabolitos secundarios, tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.

Los metabolitos secundarios, se agrupan en cuatro clases principales.

Terpenos. Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.

Compuestos fenólicos. Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.

Glicósidos. Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.

Alcaloides. (Avalos y Pérez-Urria, 2009).

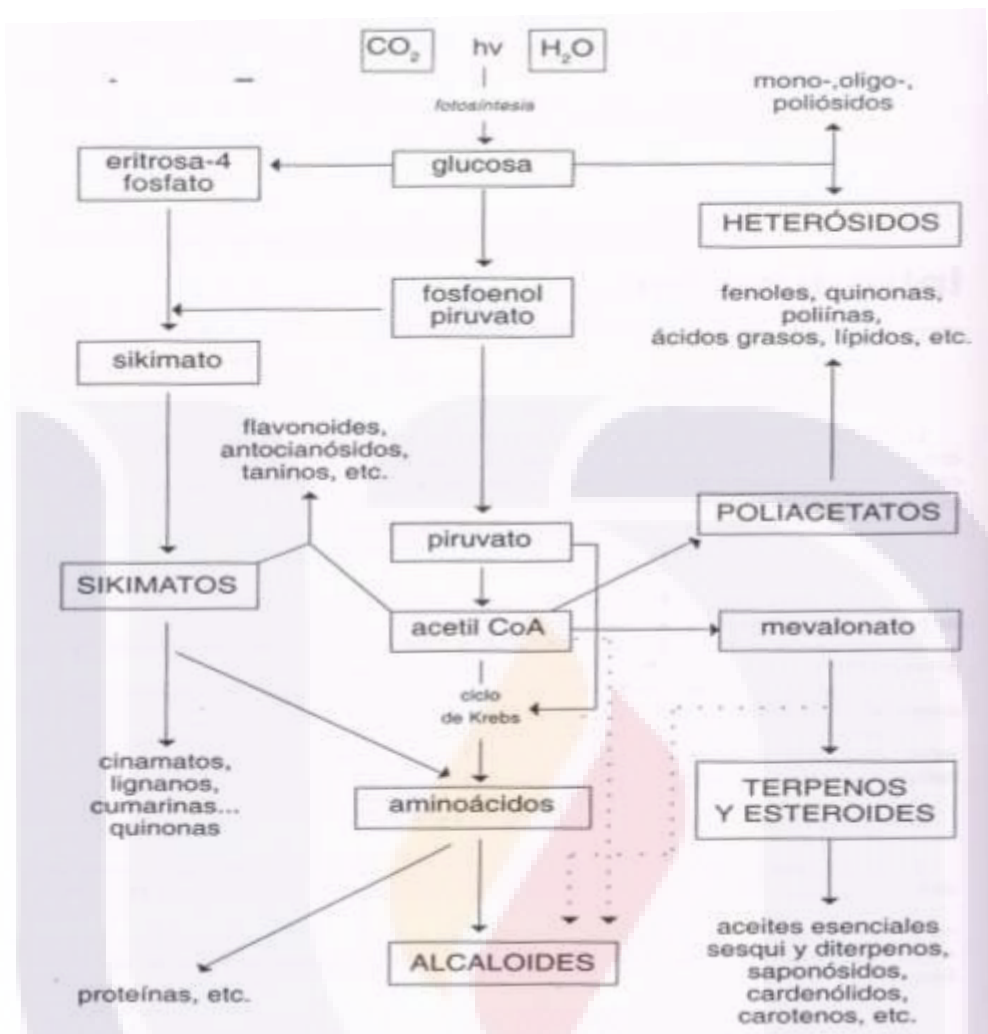


Figura 3. Origen de las rutas metabólicas que generan a los compuestos activos (metabolitos secundarios) en las plantas (Bruneton, J., 2001).

1.4.1 Principios activos del género *Anredera*.

De acuerdo a estudios, algunos de los compuestos activos que se han aislado de especímenes de este género son; esteroides y triterpenos (Sáenz, *et. al.*, 2002), chalconas (Calzada, *et. al.*, 1998), ácido oleanólico (Moura-Lets, *et. al.*, 2006)

1.4.2 Rutas metabólicas a partir de las cuales se producen los principios activos de *Anredera cordifolia*.

Ruta del ácido mevalónico.

A partir del el ácido mevalónico se forman unidades de isopreno que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides). Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas.

Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc. (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

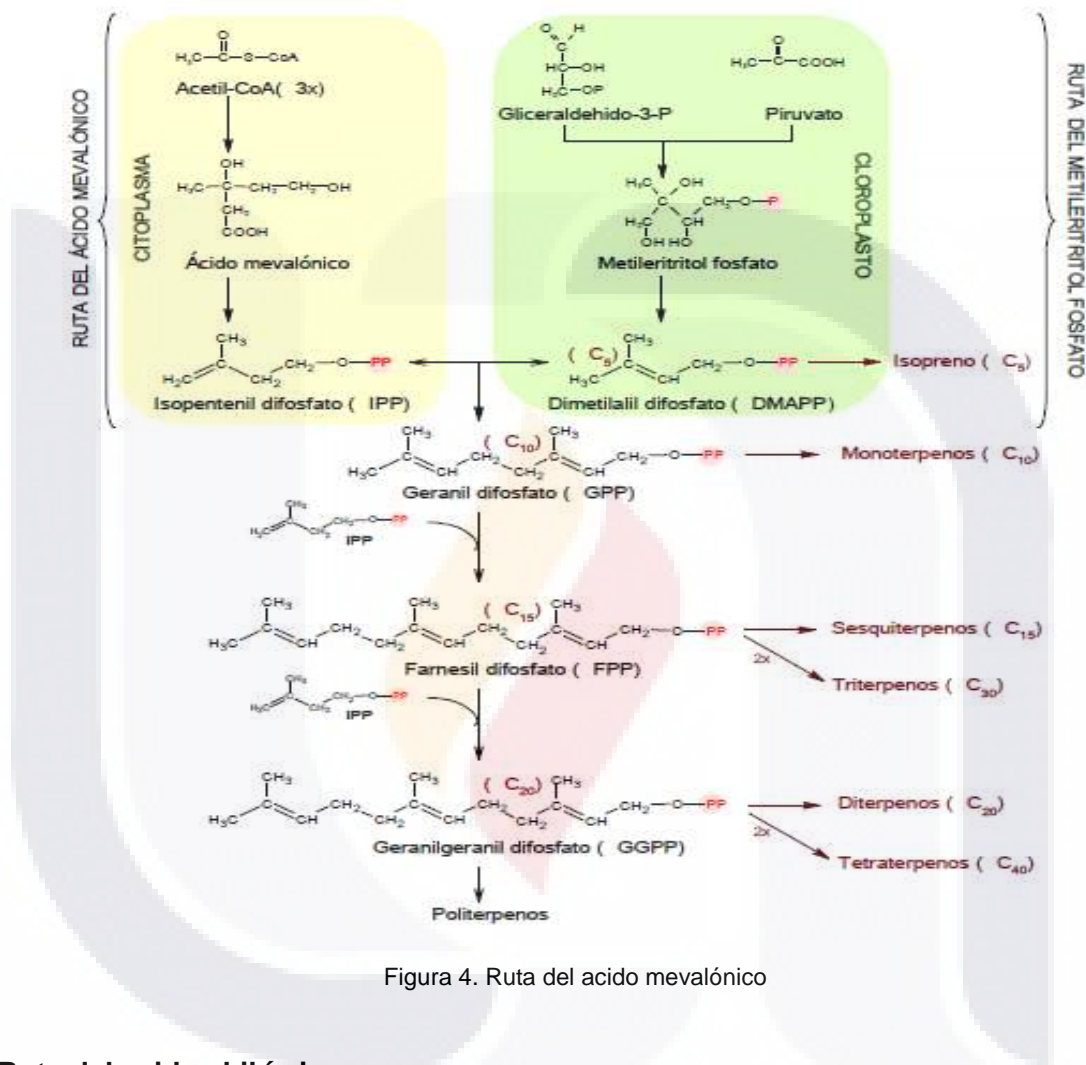


Figura 4. Ruta del ácido mevalónico

Ruta del ácido shikímico.

El ácido shikímico se aisló inicialmente en 1885 de la planta asiática "SHIKIMI-NOKI" *Illicium sp.* (Fam. Illiciaceae) y es reconocido como el compuesto punto de partida para un vasto número de sustancias naturales. Su existencia como un discreto constituyente vegetal, ha sido observado en años recientes, pero no hay duda de que es el metabolito universal de las plantas superiores y de muchas clases de organismos no mamíferos. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas (Arango, 2010).

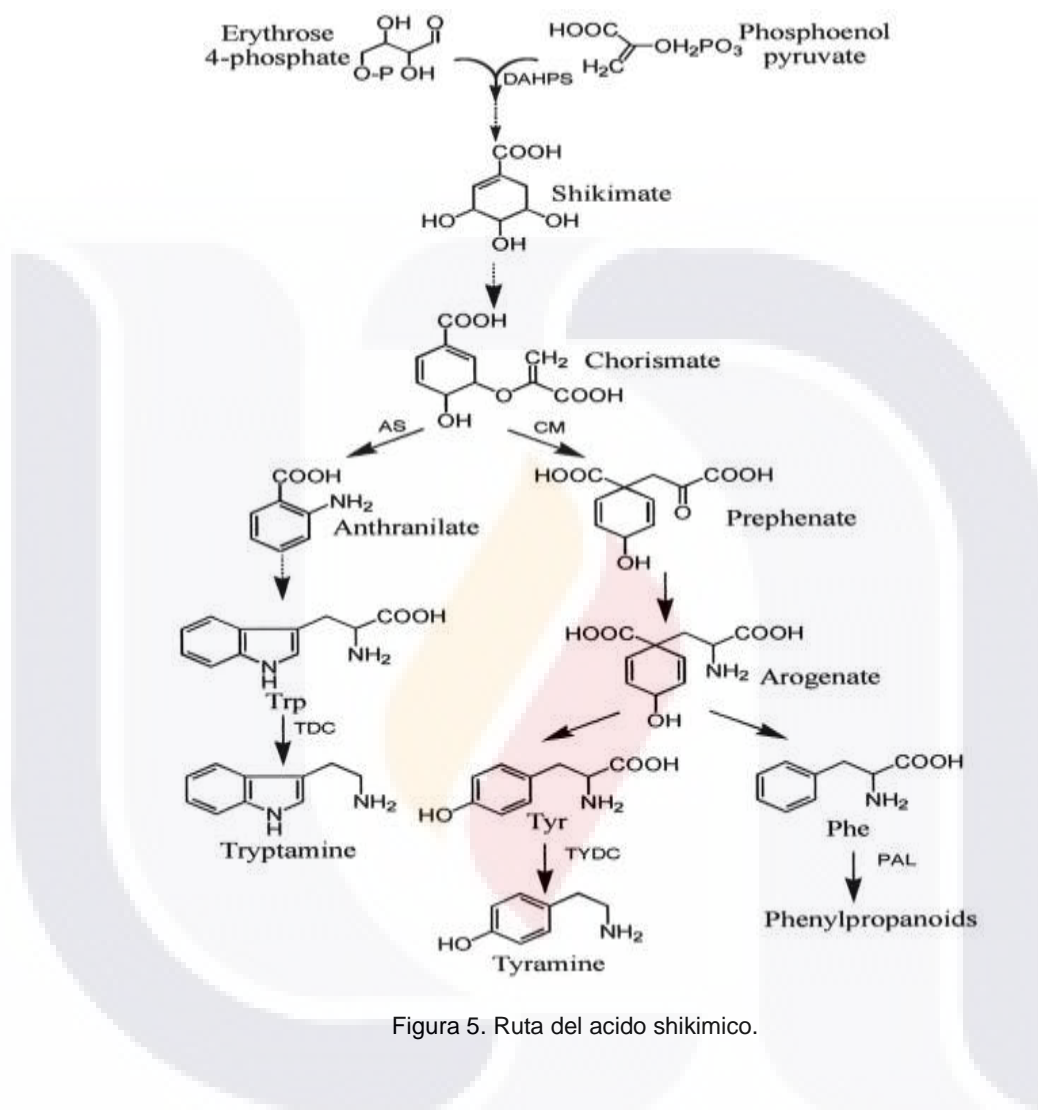


Figura 5. Ruta del ácido shikímico.

Ruta fenilpropanoides.

A partir de los fenilpropanoides, se obtiene las chalconas y los flavonoides. La chalcona es una cetona aromática que forma la base central para una variedad de compuestos biológicos importantes, que se conocen colectivamente como chalconas. Estos compuestos, poseen una gran variedad de funciones citoprotectivas y moduladoras, algunas chalconas han demostrado ser modulador negativo del estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, así como la angiogénesis tumoral (Hijova, 2006).

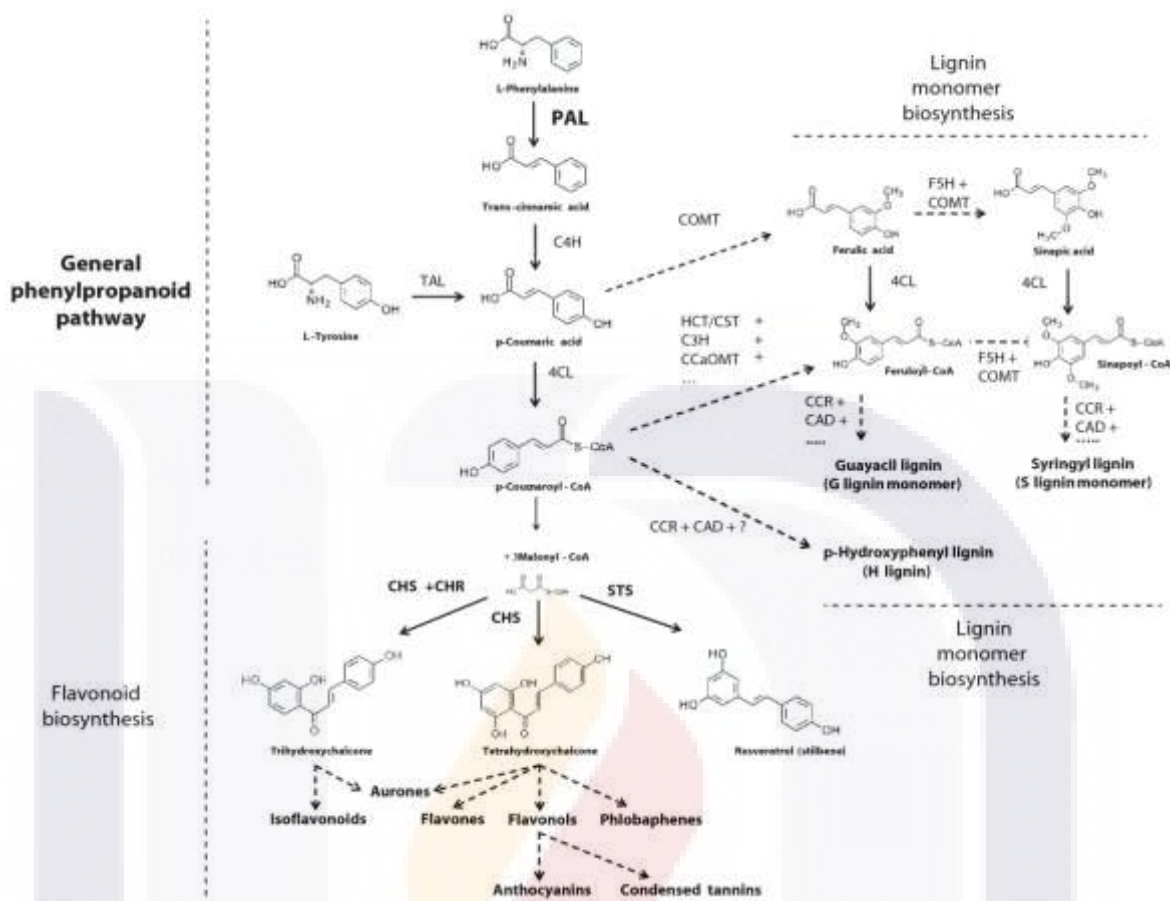


Figura 6. Ruta de los fenilpropanoides.

1.5. El estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. El daño celular que producen las ER y los RL, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Lo que puede llevar al desencadenamiento de varias enfermedades (Ramos, *et. al.*, 2006).

1.5.1 Radicales libres.

Los RL son moléculas que contienen un electrón (e^-) no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas, lo que a su vez las convierte en moléculas muy reactivas, capaces de provocar una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos.

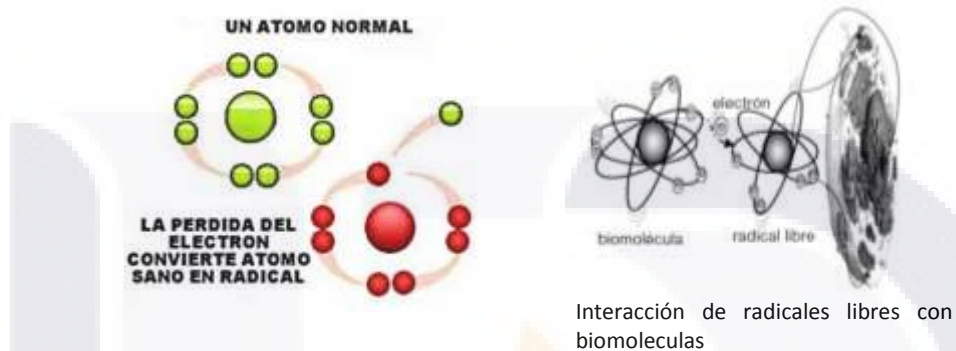


Figura 7. Interacción de los radicales libres con biomoléculas.

Las ER incluyen a las de oxígeno (ROS), hierro (RIS), cobre (RCS), así como a las de nitrógeno (RNS). Estas especies se forman como productos del metabolismo de los RL y aunque no todas son de esta clase, son moléculas oxidantes que se transforman rápidamente en RL, lo que los convierte en compuestos muy dañinos para las células.

La mitocondria es la fuente principal de RL, los cuales se producen a nivel de la cadena de transporte de e^- y fosforilación oxidativa, a través de la membrana interna mitocondrial en donde se genera un gradiente electroquímico de protones que aporta la energía necesaria para producir adenosin trifosfato (ATP). En este proceso, el oxígeno actúa como aceptor final de e^- . Una consecuencia de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 e^- al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL. Otra fuente son los peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasa y que generan peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas CAT) y transformado en agua (Ramos., *et. al.*, 2006).

Los leucocitos polimorfonucleares, en procesos inflamatorios, al activarse por diversas proteínas (complemento, interleucinas, etc.) producen también RL. Éstos poseen en la membrana la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa

(NADPH oxidasa), generadora de oxígeno, que en presencia de hierro se transforma en un potente tóxico ión oxidril (OH^-). La xantina deshidrogenasa presente en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca^+ , etc.) y genera el anión superóxido (O_2^-). Los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos de defensa, sin embargo, en situaciones patológicas, esta producción se incrementa y provoca el estado de estrés oxidativo.

Las células de los seres vivos están expuestas constantemente a las reacciones de oxido reducción. Durante el proceso de respiración celular se consume oxígeno y se genera ATP, lo que origina productos tales como bióxido de carbono y agua y, durante esta transformación normal, se producen ER y RL. En la producción de ATP a partir de la oxidación de glucosa, se producen RL y ROS.

Los sistemas de defensa antioxidantes intra y extra celulares, tanto enzimáticos (las enzimas más importantes son catalasa CAT, la superóxido dismutasa SOD y la glutatión peroxidasa GPx) como no enzimáticos (elementos principalmente exógenos, como las vitaminas E, C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides, oligoelementos, glutatión GSH, urato ubiquinol y proteínas plasmáticas) son utilizados para mantener el equilibrio redox de las células (Ramos, *et al.*, 2006).

Los RL al colisionar con una macromolécula, la oxidan al quitarle un (e^-) provocando que pierda su función específica en la célula. Este daño, puede causar la oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos, lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, exitotoxicidad y apoptosis. Los lípidos son los más susceptibles al daño por los RL, específicamente los poli-insaturados ya que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es la peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipo-peróxidos (LPO). Las membranas son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, por lo que este proceso daña directamente la estructura de la membrana celular e indirectamente a otros componentes celulares por la producción de aldehídos reactivos (Ramos, *et al.*, 2006).

El daño que causan los RL a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto se debe a que todos los residuos de aminoácidos están sujetos al ataque por OH^- , sin embargo, los aminoácidos que se oxidan con más frecuencia son la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina. Dicha oxidación forma proteínas carboniladas, que favorece el entrecruzamiento entre proteínas o con otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación). Todos estos cambios, pueden hacer a las proteínas más susceptibles de proteólisis, desnaturalización o producir pérdida de su actividad biológica (Ramos, *et. al.*, 2006).

La oxidación de ADN dependiente de ROS, ocurre de forma parecida a la oxidación de proteínas y es sitio-específica. Involucra una reacción entre ADN, metales de transición y H_2O_2 . El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo. La evidencia disponible indica que el escape de (e^-), que conduce a la formación de O_2 y H_2O_2 , ocurre en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria por la auto-oxidación de algunos componentes. Esta oxidación al ADN produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por otra parte, o la pérdida de expresión por el daño al gen específico, que puede provocar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátides hermanas, alteración a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas. La oxidación de la desoxirribosa puede inducir liberación de bases y rompimiento de cadena sencilla en las hebras de ADN, lo que puede producir la formación de micronúcleos (MN, conocidos en hematología como cuerpos de Howel Jolly). La reactividad del OH hacia la desoxirribosa varía considerablemente y los carbonos 4 y 5 son los más susceptibles. Por lo que la lesión que se observa con más frecuencia es el rompimiento de la cadena de ADN, mediado por el hierro y H_2O_2 .

El daño ocasionado por el estrés oxidativo a la célula puede ocurrir por muchas rutas, pero independientemente de cuál sea la vía, es evidente que el exceso de RL y ER provocan desequilibrio en la homeostasis de la célula. Esto puede llevar al desarrollo de patologías crónico-degenerativas (Ramos, *et. al.*, 2006).

Para equilibrar la respuesta antioxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones y en comparación con el oxidante retarda

o previene la oxidación de un sustrato, el cual incluye a lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN. De los antioxidantes disponibles se destacan SOD (Superóxido dismutasa), GPx (glutación peroxidasa) y CAT (catalasa), así como diversos componentes plasmáticos, como GSH(glutación) oxidado y reducido, bilirrubina, ácido úrico y albúmina, además de los minerales Se y Zn, las hormonas dehidroepiandrosterona, estrógenos y melatonina. Además las vitaminas antioxidantes A, C y E, así como el ácido fólico, el cual también, disminuye el número de micronúcleos (MN) y es recomendado a mujeres embarazadas (por ser el más inocuo) para prevenir entre otros problemas los del cierre del tubo neural (Ramos, *et. al.*, 2006).

1.5.2 Efecto antioxidante.

Un antioxidante, al colisionar con el RL le cede un (e^-) oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede generarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Los antioxidantes enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL.

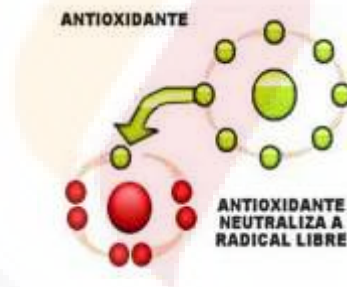


Figura 8. Diagrama donación de electrones en el efecto antioxidante

Cada antioxidante posee una afinidad por un determinado RL o hacia varios. Por ejemplo, la vitamina E, el betacaroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos; también neutraliza y captura el O_2^- , captura RL hidroxilos y neutraliza peróxidos. La vitamina C neutraliza el O_2^- , captura radicales hidroxilos anión hiperóxidos y regenera la forma oxidada de la vitamina E. el betacaroteno neutraliza O_2^- , debe tomarse en cuenta que es necesaria la incorporación al organismo de oligoelementos como el Cu, Fe, Mg, Zn y Se, ya que forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes.

Entre otros antioxidantes no enzimáticos (llamados barredores o scavengers de RL), se encuentran algunos aminoácidos como glicina, taurina y el tripéptido glutatión. En condiciones fisiológicas, estos mantienen baja concentración de RL en la célula, a la vez que mantienen una actividad muy precisa y regulada, por lo que el equilibrio entre la producción de ER y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo.

Los antioxidantes tomando en cuenta lo anterior, pueden actuar de las formas siguientes:

- Disminuyendo la concentración de oxidantes.
- Evitando la iniciación de la reacción en cadena al secuestrar (cubrir o detener una reactividad química elevada) a los primeros RL que se forman.
- Uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de ER.
- Transformando los peróxidos en productos menos reactivos.
- Deteniendo la propagación y el aumento de RL.

Podemos clasificar a los antioxidantes en endógenos, los que son sintetizados por la célula y exógenos o que ingresan a través de los alimentos.

En la naturaleza contamos con una gran variedad de plantas que pueden ser la fuente natural de antioxidantes, lo que nos puede permitir sustituir la falta de estos compuestos, que se han convertido en necesarios para el equilibrio bioquímico del organismo humano.

1.6. El proceso inflamatorio.

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares como una respuesta de defensa ante agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes (Bordés, *et. al.*, 1994).

La reacción inflamatoria da protección temprana después de infecciones o lesiones tisulares, así como efectos de toxinas y enzimas de venenos de animales al restringir el daño de los tejidos al sitio afectado.

Las piedras angulares de la reacción inflamatoria localizada, fueron descritas por primera vez hace casi 2000 años, son tumefacción (tumor), enrojecimiento (rubor), calor, dolor y pérdida de la función. Minutos después de la lesión tisular, el diámetro de los vasos sanguíneos aumenta (vasodilatación), lo que da como consecuencia el aumento de volumen de sangre en la zona afectada y reducción de su velocidad de flujo. Este aumento del volumen sanguíneo aumenta la temperatura en el tejido afectado y lo torna rojo (hiperemia). También la permeabilidad vascular aumenta, lo que ocasiona fuga de líquido desde estos vasos sanguíneos, en particular de las vénulas poscapilares, lo que da como resultado la acumulación de líquido (edema) en el tejido y en algunos casos extravasación de leucocitos (Polimorfonucleares PMN, linfocitos y monocitos), que contribuyen a la tumefacción y enrojecimiento del área afectada. El reclutamiento de los PMN, está condicionado por las señales quimiotácticas emanadas del foco inflamatorio en el lugar de la lesión (Kindt, *et. al.*, 2007). Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio a partir del pul circulante. Sin embargo, una rápida respuesta requiere células centinelas estacionadas en los tejidos. Los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función. Los mastocitos perivasculares responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas liberando histamina, triptasa, otras proteasas, TNF- α preformados, y eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), citoquinas y quimioquinas neoformadas. La histamina, eicosanoides y triptasas causan vasodilatación responsable del calor y rubor inflamatorios y extravasación responsable del tumor o edema inflamatorio (García, 2008).

En condiciones normales el agente agresor es destruido, se inhiben los mediadores pro-inflamatorios y se regenera el tejido dañado, recuperando sus funciones fisiológicas. En algunas circunstancias, es posible que la inflamación no cumpla adecuadamente su función de defensa o, que los mecanismos reguladores se alteren, dando lugar a una respuesta inflamatoria exagerada que agrava el daño tisular.

Según la persistencia del daño, la sintomatología clínica y la naturaleza de la reacción inflamatoria (está relacionada con la clase de leucocito que predomina), se hace una distinción entre inflamación aguda e inflamación crónica.

La inflamación aguda es más violenta, se caracteriza por acumulación de plasma en el tejido afectado, estimulación intravascular de plaquetas y factores pro-coagulantes así como presencia de neutrófilos (reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares, PMNs). (Company, 2010)

La inflamación crónica supone un equilibrio entre los mecanismos de agresión y de defensa. Puede aparecer desde el comienzo de la enfermedad, o ser una secuela de la inflamación aguda cuando la respuesta inflamatoria es incapaz de eliminar el agente causal. Se distingue por el predominio de células mononucleares (sobre todo macrófagos) y también linfocitos, células plasmáticas y otras.

1.6.1 Mediadores de la inflamación.

Los fenómenos básicos de la inflamación son regulados por mediadores de la inflamación, que son solubles o moleculares. Estos mediadores químicos, son de naturaleza diversa:

Plasmático: el sistema del complemento, las cininas, el sistema de la coagulación y el fibrinolítico. Estos mediadores son los que desencadenan la reacción inflamatoria al reconocer toxinas y células dañadas y también contribuyen a amplificar la respuesta inflamatoria.

Celular (*mediadores preformados y almacenados en gránulos citoplásmicos o rápidamente sintetizados ante un estímulo inflamatorio*): los péptidos y las aminas (histamina y neuropéptidos), el óxido nítrico (NO), citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α), mediadores lipídicos como las prostaglandinas (PGs), los leucotrienos (LTs), el factor activador de plaquetas (PAF) o las quimiocinas, entre otros. Son, en parte, responsables de la amplificación de la respuesta inflamatoria.

Derivados de los microorganismos invasores: péptidos formilados quimiotácticos y endotoxinas. Entre ellos encontramos a las moléculas vasoactivas, que actúan directamente en el músculo liso para aumentar el flujo sanguíneo e incremento de la permeabilidad capilar y los factores quimiotácticos, que promueven la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo hasta el foco inflamatorio.

Además, en el proceso inflamatorio participan diversos componentes o mediadores celulares como:

Leucocitos (*neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, monocitos/macrófagos*): estas células además de liberar mediadores inflamatorios, son capaces de adherirse al endotelio, de migrar a su través y, en general, de fagocitar y destruir a los agentes patógenos.

Plaquetas: liberan mediadores inflamatorios, activan a los leucocitos y participan en la resolución de la inflamación.

Células endoteliales: sintetizan y liberan numerosos mediadores inflamatorios e interactúan con los leucocitos en la infiltración leucocitaria.

Una característica común a leucocitos, plaquetas y células endoteliales, además de su capacidad para liberar mediadores inflamatorios, es que presentan en su superficie las llamadas moléculas de adhesión celular (MAC), que facilitan las interacciones entre estos tres tipos celulares (Ley, *et. al.*, 2007 Company, 2010,).

Las células endoteliales normales en estado inactivo mantienen la homeostasis, regulando el equilibrio entre factores procoagulantes y anticoagulantes: por ejemplo elaborando trombomodulina e inhibiendo la formación de Factor Tisular (FT) para evitar la formación inadvertida de trombo; además inhiben la inflamación al liberar prostaciclina (PGI₂) y evitar la adherencia de leucocitos. Pero cuando son activadas expresan FT y PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) y moléculas que intervienen en la inflamación como la E-selectina y la interleucina-1 (IL-1) (De la Serna, 2012).

1.6. 2. La infiltración leucocitaria y sus etapas.

En el proceso inflamatorio, y también en condiciones fisiológicas como parte de su función de vigilancia, los leucocitos deben abandonar el torrente circulatorio, mediante un proceso que se denomina infiltración leucocitaria. Los leucocitos deben atravesar la monocapa de células endoteliales que recubre la pared interna de los vasos capilares, para pasar al espacio extravascular, donde realizarán sus funciones biológicas.

Las MAC y los factores quimiotácticos son los principales mediadores en el proceso de infiltración leucocitaria, ya que, actuando directamente sobre los leucocitos, provocan la interacción de éstos con el endotelio vascular:

MAC: son glicoproteínas que se expresan en la superficie de las células. Promueven la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales o entre los leucocitos y la matriz extracelular.

Factores quimiotácticos: son mediadores químicos solubles generados localmente en los sitios de daño tisular. Actúan como señales que atraen más leucocitos circulantes al foco inflamado y controlan la expresión de algunas MAC.

Los factores quimiotácticos se pueden clasificar como:

Agentes quimiotácticos clásicos o inespecíficos, que atraen a todos los leucocitos en general: fragmentos C5a y C3a del complemento, moléculas lipídicas (LTB₄, PAF), péptidos bacterianos formilados (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina o (fMLP), etc.

Quimiocinas, que atraen determinados subtipos de leucocitos de forma selectiva: por ejemplo, la interleucina-8 (IL-8), la *monocyte chemoattractant/chemotactic protein-1* (MCP-1), la eotaxina, etc.

Otros mediadores solubles que intervienen en la infiltración leucocitaria son las citocinas. Entre ellas destacan las citocinas proinflamatorias como el TNF α o la IL-1, que promueven la migración leucocitaria sin ser propiamente quimiotácticas, es decir, no actúan directamente sobre los leucocitos sino que hacen a las células endoteliales más adhesivas para éstos o inducen en diversos tipos celulares la liberación de otros mediadores (Company, 2010).

Etapas de la infiltración leucocitaria

El proceso de infiltración leucocitaria, que abarca, desde el contacto inicial de los leucocitos con el endotelio hasta que alcanzan el espacio extracelular, se ha simplificado en un modelo que predice tres etapas sucesivas y coordinadas: rodamiento, adhesión y migración. Se define como una cascada puesto que la interrupción de la etapa inicial impide las siguientes etapas del proceso (Ley, *et. al.*, 2007; Springer, 1995).

a). Adhesión primaria y rodamiento. En primer lugar, las células endoteliales activadas aumentan su adherencia a los leucocitos (“los reconocen”). Este contacto inicial no es aleatorio, sino que constituye la adhesión primaria o laxa que enlentece el tránsito leucocitario y, aumenta la posibilidad de una interacción más estrecha de los

leucocitos con el endotelio. Esta fase se denomina rodamiento leucocitario y es el paso limitante para las siguientes fases.

El proceso se inicia con la liberación de mediadores generados por el tejido dañado (histamina, trombina, TNF α , IL-1, etc.) que producen una rápida activación de las células endoteliales. En consecuencia, (1) se producen sustancias quimiotácticas, y (2) aumenta la expresión de determinadas MAC; principalmente las selectinas, que determinan la interacción inicial leucocito-endotelio y el rodamiento leucocitario. Dicha interacción es reversible. Si no se desencadenan los mecanismos de adhesión firme, los leucocitos volverán al torrente circulatorio (Company, 2010).

b). Activación y adhesión firme. Si el estímulo persiste, se produce la activación de los leucocitos en rodamiento, fenómeno aparentemente muy rápido que da lugar a la detención de los mismos de manera estable, produciéndose su adhesión firme al endotelio vascular.

Median en esta etapa: Las sustancias originadas en el foco inflamatorio que, por la menor velocidad de los leucocitos en rodamiento, pueden interaccionar con ellos y activarlos: pueden ser exógenas (fMLP) o endógenas (C5a, PAF, LTB4 y otros agentes quimiotácticos como las quimiocinas).

MAC: integrinas de la membrana leucocitaria (como algunas β 2) cuya expresión aumenta como consecuencia de la activación, o sufren un cambio conformacional a estado activo (como integrinas α 4 o α L) y sus ligandos, las inmunoglobulinas (Igs) (Ley, *et. al.*, 2007; Springer, 1994; Sullivan, *et al.*, 2004).

c). Migración y quimiotaxis.

Finalmente, se inicia la migración a través del endotelio capilar y la quimiotaxis, que es el movimiento unidireccional de los leucocitos a través del tejido hacia el foco de inflamación, atraídos por concentraciones crecientes de agentes quimiotácticos originados en el foco.

Este proceso lo regulan:

MAC, tanto integrinas como Igs, como otras descritas recientemente que hacen posible la diapédesis.

Los agentes quimiotácticos y determinadas quimiocinas, que forman un gradiente quimiotáctico que dirige la diapédesis y la migración a través del tejido. (Ley, *et. al.*, 2007) (Company, 2010).

1.7. Loxoscelismo.



Figura 9. Araña *Loxosceles apachea* (araña violinista). Fotografías tomadas de criadero de arañas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

1.7.1 Loxoscelismo cutáneo.

La mordedura de la araña de rincón o violinista, puede ir desde una irritación insignificante hasta importante ulceración y necrosis con síntomas sistémicos. La talla del paciente y la reactividad del mismo, el tamaño de la araña y la cantidad de veneno probablemente contribuyen a la variabilidad de la lesión producida por la mordedura de la *Loxosceles spp.*

El veneno de las arañas *Loxosceles* es una mezcla compleja de proteínas y toxinas peptídicas con una masa molecular de 1 a 40 kda. Han sido descritas varias moléculas en el veneno crudo, incluyendo esfingomielinaza tipo D, fosfatasa alcalina, 5-ribonucleotido fosfohidratasa, nucleosidos sulfatados, hyaluronidasa, fosfolipasas-d, metaloproteinasas, serin proteasas y toxinas insecticidas (Meiri, *et. al.*, 2011).

Se ha demostrado que el veneno produce una reacción inflamatoria con la expresión de E-Selectinas (receptores de adhesión celular) además estimula la liberación de IL-8 y de GM-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) (De Roodt, *et. al.*, 2002). Así también, activación del complemento, agregación plaquetaria y abundante reclutamiento de neutrófilos (Polimorfonucleares PMN) en los tejidos, con producción de zonas de obstrucción (isquemia), hemorrágicas (esquimosis) e inflamatorias y necróticas que le confieren aspecto marmóreo a la lesión (placa liveloide) (Meiri, *et. al.*, 2011).

Se considera que el componente causante del envenenamiento (tanto cutáneo como sistémico) son las esfingomielinasas, que en todas las especies son parecidas. Esta enzima en particular, induce la liberación de ceramidas (moléculas clave para mantener la hidratación y la barrera cutánea, se encuentran más abundantes en la capa córnea de la piel, compuestas de esfingosina y ácidos grasos) éstas moléculas tienen múltiples funciones, también participan en la adhesión plaquetaria y formación de trombos, que son responsables de la isquemia y necrosis del tejido afectado por el veneno. La participación de los demás componentes no está todavía del todo clara, las hialuronidasas se han relacionado con la difusibilidad del veneno.

Acompañando el cuadro cutáneo, puede existir compromiso sistémico que se manifiesta por hemólisis, lo que se debería a la activación de proteasas endógenas de la membrana eritrocitaria, por las esfingomielinasas del veneno, que clivan las glucoforinas que protegen al eritrocito del complemento y provocan la hemólisis mediada por complemento, lo que induciría a la insuficiencia renal. (Cabrerizo, *et. al.*, 2009).

En los cortes histológicos de las lesiones inducidas por la mordedura de *Loxosceles*, se observan infiltrados leucocitarios predominando los neutrófilos perivasculares, que seguramente participan en el establecimiento de la necrosis tisular., el mecanismo debe ser muy parecido al observado en los fenómenos del tipo Arthus. Es un proceso de activación del complemento, formando moléculas C3a, C5a y C5b, que atraen una gran cantidad de Polimorfonucleares que fagocitan los complejos formados, con una gran liberación de productos que inducen daño tisular. La inflamación y la vasculitis severa dan lugar a la formación de trombos responsables de la necrosis tisular, favoreciendo el desarrollo de CID (coagulación intravascular diseminada) y de múltiples zonas isquémicas y hemorrágicas intercaladas que son las causantes de la placa marmórea o liveloide que caracteriza a las lesiones cutáneas producidas por las mordeduras de *Loxosceles*. (De Roodt, *et. al.*, 2002). (ver fig. 9a) .



Figura 10. Placa liveloide. Signo "rojo, blanco y azul" (eritema, isquemia y necrosis). Fotografía tomada de <http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/21/21v16n07a13017681pdf001.pdf>

Los mecanismos de necrosis relacionados con la liberación de mediadores tisulares recibieron confirmación indirecta en experiencias in vitro ya que el veneno induce la liberación TNF- α , a partir de queratinocitos. Además, el veneno estimula la liberación de IL-8 y de GM-CSF, de ceramidas a partir de células endoteliales, e induce la expresión de IL-8, MCP-1 y otras. La producción de citoquinas (IL-1 β , IL-8 y TNF- α), estaría relacionada con la hiperalgesia y el edema observado en las lesiones dérmicas. Las metaloproteinasas descritas por algunos autores en el veneno de *Loxosceles* podrían estar relacionadas también con estos eventos (De Roodt, *et. al.*, 2002).

La mordedura puede ser relativamente dolorosa o bien pasar inadvertida. El dolor secundario a la isquemia se presenta usualmente entre las 2 a 18 horas después, dolor que se describe como quemadura de cigarrillo. La necrosis puede desarrollarse rápidamente en cuestión de horas o bien tardar varios días. En la mayor parte de los casos el diagnóstico se puede realizar antes de 6-8 horas. Clásicamente, hay eritema, edema y sensibilidad que progresa a un halo vasoconstrictivo azul-grisáceo que se extiende alrededor del sitio de la mordedura. Después, aparece una mácula sanguinolenta o gris oscura rodeado de una zona de eritema y edema. El eritema es reemplazado por una decoloración violácea característica de la piel (Placa liveloide o marmórea). El dolor puede ser intenso y los síntomas generales pueden incluir fiebre y eritema generalizado. Gradualmente esta lesión necrótica se va ensanchando y los bordes se van haciendo irregulares. El centro de la lesión usualmente está por debajo de la superficie de la piel, lo que junto a la coloración violácea ayudan a diferenciar esta

mordedura de las de otros artrópodos. La lesión isquémica puede evolucionar a necrosis antes de 3-4 días y formar la escara antes de 4-7 días. Siete días después aparece una costra y bajo ésta hay un área de ulceración la cual puede persistir, la ulceración cura lentamente en 4-6 semanas, aunque ocasionalmente puede demorar hasta 4 meses. La mionecrosis también ha sido reportada. La hiperplasia pseudoepiteliomatosa y el pioderma gangrenoso, pueden presentarse como complicación, la herida, según su extensión y profundidad puede requerir de cirugía reconstructiva. Se ha visto que las lesiones más severas son en áreas de tejido graso, como los muslos y glúteos. La magnitud de la lesión necrótica puede llevar a la amputación del miembro afectado (De la Cerda, *et al.*, 2012).



Figura 11. Diferentes aspectos del efecto generado por la mordedura de la araña *Loxosceles apachea*.. fotografías tomadas de la página de la Universidad de Concepción ,Chile. <http://www2.udec.cl/~lpalma/aranas.html>.

2. JUSTIFICACION.

“Juan mecate” (*Anredera cordifolia*), es una planta a la que se le confieren propiedades para el tratamiento de piquetes de zancudos y animales ponzoñosos, heridas y acné. Durante el proceso de inflamación se producen radicales libres, por lo que es de gran interés determinar la actividad antioxidante y la capacidad secuestrante de oxido nítrico de los extractos esta planta, con el fin establecer una base para futuros estudios de su utilización en el tratamiento de algunas afecciones, de acuerdo a las propiedades que se le atribuyen en la medicina tradicional.

3. HIPOTESIS.

La planta Juan mecate (*Anredera cordifolia*), contiene, compuestos activos que son antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos y pro-cicatrizantes que, utilizados en picaduras y mordeduras de arácnidos ponzoñosos y lesiones tisulares de otra naturaleza, mejoran los signos y síntomas presentes.

4. OBJETIVOS DEL TRABAJO.

4.1 Objetivo general del trabajo.

Extracción y caracterización de los principios activos de la planta “Juan mecate” (*Anredera cordifolia*) y evaluación de sus efectos antioxidantes, determinando su capacidad de barrido de oxido nítrico y su poder reductor, además el efecto que pueda causar en el proceso inflamatorio resultante de la mordedura de la araña *Loxosceles apachea*, utilizando para esto ratas Wistar.

4.2 Objetivos particulares.

1. Extracción de los principios activos de la planta (de hojas tallos y raíces) y análisis cualitativo de los mismos por técnicas cromatográficas
2. Caracterización de los principios activos de la planta por técnicas espectrofotométricas y cromatografía de gases acoplado a masas.
3. Evaluación de la actividad antioxidante, actividad secuestrante de oxido nítrico y determinación del poder reductor de extractos de la planta.
4. Evaluación del efecto que puede producir en la respuesta (proceso inflamatorio) de la mordedura de la araña *Loxosceles apachea* en rata.

5. METODOLOGÍA Y RESULTADOS.

5.1. Obtención de material vegetal.

El material vegetal utilizado se colectó de las diferentes plantas de Juan mecate (*Anredera cordifolia*.) cultivadas en el Jardín Botánico de la UAA, las cuales fueron recolectadas de diferentes partes del estado a saber: municipio de Jesús María, municipio de El Llano, municipio de Aguascalientes.

5.2. Extracción preliminar de principios activos, para la determinación del solvente de extracción y la parte de la planta a utilizar.

Para el establecimiento del solvente de extracción, así como la parte de la planta a utilizar para la caracterización de la misma, se colectaron diferentes partes de la planta (raíz, tallo y hojas), se secó cada parte en estufa a 37°C, se molió con mortero y se realizó la extracción de los principios activos con etanol y hexano.

Los extractos obtenidos se evaluaron de la siguiente forma:

5.2.1. Cromatografía en capa fina de hoja, raíz y tallo.

Para el análisis cualitativo de los extractos obtenidos se utilizó Cromatografía en capa fina, utilizando como fase estacionaria silicagel G60 con indicador de fluorescencia y como fase móvil solventes con diferentes polaridades. Para visualizar los compuestos se utilizó el transiluminador de luz ultravioleta y la adición de cromógenos.

Los resultados obtenidos por Cromatografía se muestran en las siguientes figuras:

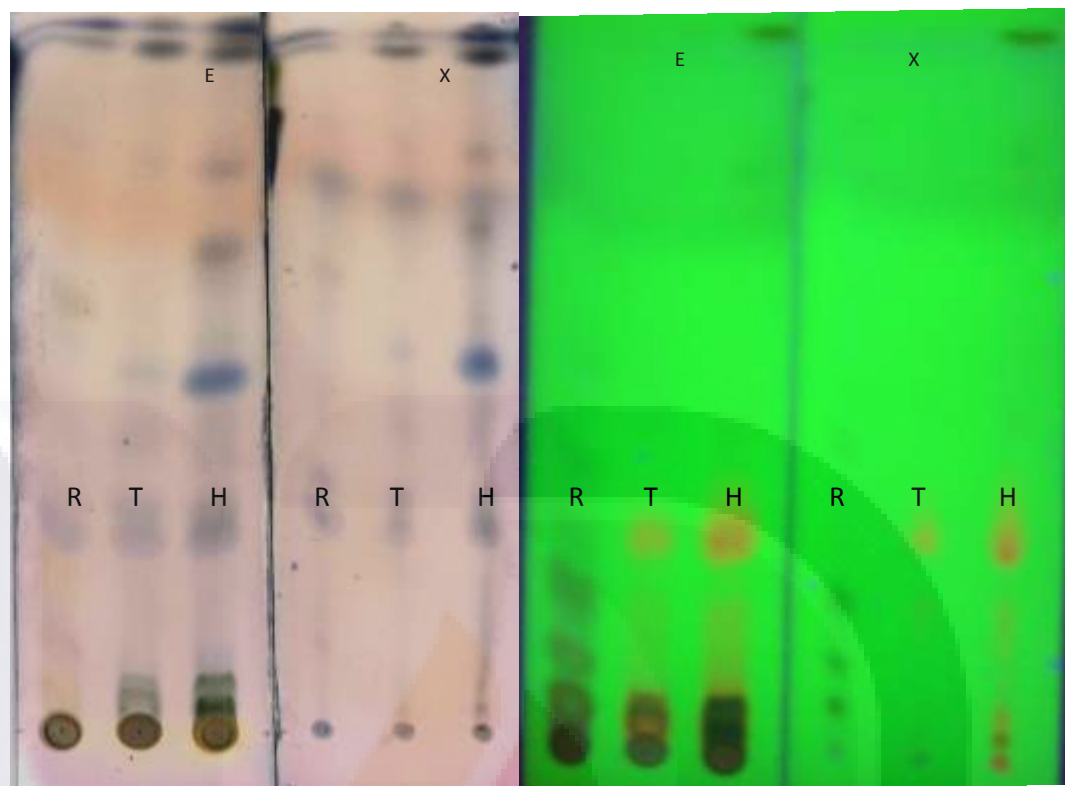


Figura 12. Fotografía: cromatografía en capa fina de hojas, tallo y raíz (izq. y der. De cada barra respectivamente) desarrollada con éter etílico: éter de petróleo (2:1) y vista con uv der, y revelada con vainillina izq. Extractos obtenidos con etanol (E) y hexano(X). raíz (R), tallo(T) y hoja(H).

5.2.2. Determinación del solvente de extracción más eficiente.

Se realizó la extracción de principios activos utilizando etanol y metanol como solventes de extracción, a los extractos resultantes se les realizó una cromatografía de capa fina, la que nos permitió determinar que el extracto hecho con etanol muestra más metabolitos y mayor cantidad de ellos, decidiéndose utilizar etanol como solvente de extracción, además de que se observó que es la hoja la que presenta una mayor cantidad de metabolitos (ver figura 11).

5.3. Medición del contenido de humedad de las hojas.

Se realizó la deshidratación de varias muestras de hojas, pesándose antes y después, estableciendo que:

750 mg de hoja fresca equivalen a 60mg de hoja liofilizada o deshidratada, esto es, el 92% de la hoja es agua.

5.4. Balance de masa.

Por cada 100g de hoja fresca, 8 grs., de material son sólidos, de los cuales se extrajo los compuestos activos. Al realizar la molienda con mortero, se obtuvo el extracto etanólico que corresponde al 11% del total de la muestra, esto es:

Por cada 100gr de hoja fresca, en la molienda obtenida con mortero:

0.88gr. corresponden a extracto etanólico.

7.12gr. corresponden al residuo del extracto.

92.00gr corresponden a humedad.

5.5 Tamaño de partícula.

Se determinó el tamaño de partícula para establecer la eficiencia en la obtención del extracto que se obtuvo para la caracterización de la planta, así como para conocer la biodisponibilidad al utilizarse en las pruebas con el veneno de la araña *Loxosceles apachea*.

La molienda se realizó con mortero para la obtención de los extractos evaluados, obteniendo un extracto que corresponde al 11% del peso total de la muestra (Peso de extracto etanólico, centrifugado durante 5 min a 5000rpm y liofilizado).

- El tamaño de partícula obtenido en el extracto etanólico liofilizado, obtenido con molienda en mortero, muestra un tamaño de partícula menor a 5 micras.
- El tamaño de partícula encontrado en el residuo liofilizado fue de aproximadamente de entre 4 y 40 micras.

El equipo utilizado fue un microscopio electrónico Microscopio Electrónico de Barrido de Alto-Bajo Vacío. JSM 6610LV, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ).

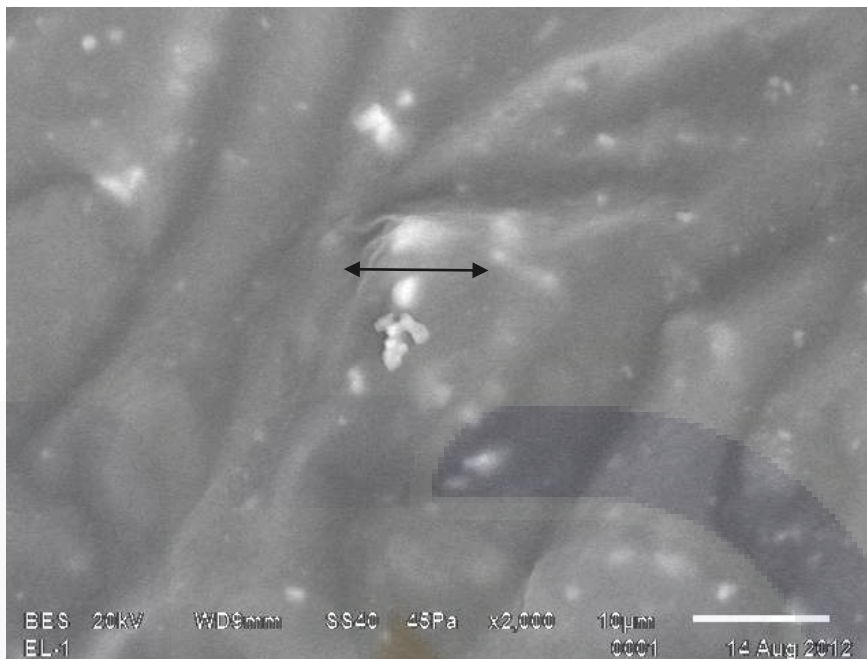


Figura 13. Fotografía con microscopio electrónico para la medición de tamaño de partícula en el extracto liofilizado de *Anredera cordifolia* (la muestra fue previamente recubierta con oro para obtener una mejor definición). Puede observarse también la formación de una película en la que se encuentra inmersas las partículas.

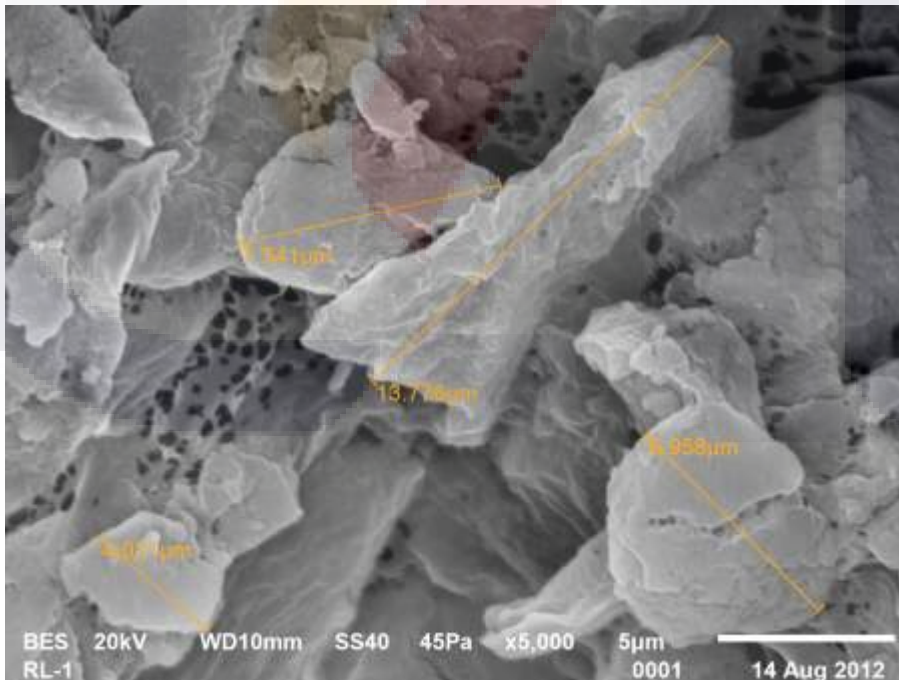


Figura 14. Fotografía con microscopio electrónico para la medición del tamaño de partícula del residuo liofilizado de *Anredera cordifolia*. (La muestra fue previamente recubierta con oro para obtener una mejor definición) Referencia 5micras.

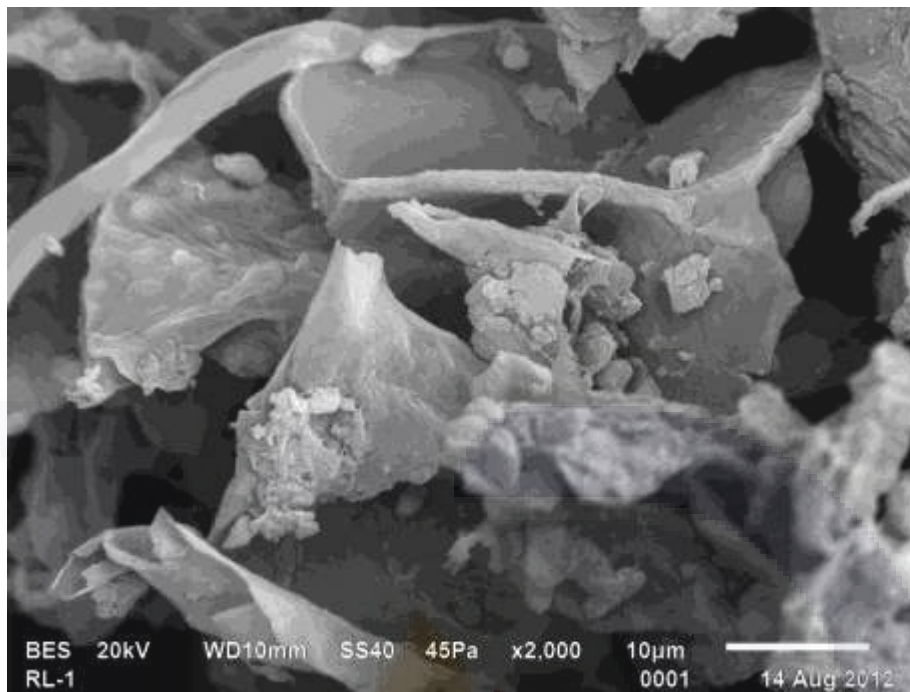


Figura 15. Fotografía con microscopio electrónico para la medición del tamaño de partícula del residuo liofilizado de *Anredera cordifolia*. (La muestra fue previamente recubierta con oro para obtener una mejor definición). Referencia 10 micras.

5.6. Obtención de principios activos.

5.6.1 Selección del método de extracción y la muestra a utilizar.

Para seleccionar la planta a utilizar, se procesaron muestras de los diferentes lugares de donde se encontraron ejemplares de Juan mecate (*Anredera cordifolia*), obteniendo sus extractos de diferentes formas y evaluando la capacidad antirradical de cada uno de ellos, de la siguiente forma:

a) Deshidratación en estufa a 40 °c.

Se deshidrataron hojas en el horno a 40 °C, se molió la muestra en mortero y se extrajeron los principios activos con etanol de 96%, se agitó la mezcla durante 5 min. , se centrifugó para separar los sólidos utilizándose el sobrenadante para la determinación de las características de la muestra.

b) Extracción por calentamiento en agua durante 2 hrs a 90 °c.

Se puso la muestra de hojas (750mg de hojas frescas) a calentar a una temperatura de 90°C durante 2 hrs, se molió, se centrifugó, separándose la fase líquida y haciendo las mediciones a ésta.

c) Extracción a partir de hojas frescas.

Se molió una porción de hojas frescas utilizando etanol 96% como solvente de extracción, se centrifugó la mezcla resultante para separar la fase líquida que se utilizó para hacer las determinaciones.

d) Por liofilización.

Una muestra de hojas frescas se congeló a -52°C , ya congeladas, se pusieron en el liofilizador. Ya liofilizadas, las hojas se molieron en mortero, se agregó etanol de 96%, se agitó durante 5 min, se centrifugó separándose la fase líquida a la que se le hicieron las determinaciones.

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos por los diferentes métodos y de las diferentes muestras para establecer el método más eficiente de extracción y la muestra a utilizar (Ver tabla 1).

El método de extracción a utilizar seleccionado, es por liofilización y la muestra a utilizar es la que se obtuvo en la colonia Colinas del río del municipio de Aguascalientes la dilución a utilizar 10%, ya que esta no interfiere tanto el color y muestra una muy buena capacidad antioxidante.

5.6.2. Extracción de principios activos para pruebas preliminares.

Se realizó la extracción de principios activos a hojas liofilizadas, por adición de etanol al 96%, estos extractos se utilizaron para realizar algunas pruebas preliminares, análisis de su capacidad antioxidante utilizando diferentes métodos y para realizar los análisis por cromatografía en capa fina y cromatografía de gases acoplada a masas.

5.7. Pruebas preliminares.

Se realizaron una serie de pruebas preliminares cualitativas que nos permitieron establecer de forma general el contenido de algunos compuestos activos de *Anredera cordifolia*, información que nos servirá en la siguiente etapa del proyecto como base para la caracterización más completa de esta planta.

Así encontramos que *Anredera cordifolia*, contiene; saponinas, flavonoides, triterpenos, cumarinas, taninos.

5.7.1. Determinación de saponinas.

Por la reacción del reactivo de Rosenthaler (1g de vainillina en 100ml de etanol) y ácido sulfúrico, las saponinas de triterpenos pentacíclicos (glucósidos de triterpenos pentacíclicos) dan color violeta (Barba, 1997).



Extracto

Reacción para determinación de saponinas

Figura 16. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de saponinas.

5.7.1.a. Determinación de saponinas por el método de la espuma.

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Se puede asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas (kuklinski, 2003).



Figura 17. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de saponinas por el método de la espuma.

5.7.2. Determinación de flavonoides.

En la exposición de una tira de papel filtro, sumergida en extracto etanólico, secado a temperatura ambiente y expuesta a los vapores de amoníaco, el cambio de color a amarillo ocre, nos confirma la presencia de flavonoides (Barba, 1997).

Figura 18. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de flavonoides.



Papel sumergido en el extracto etanólico

Comparacion del color que presenta el extracto antes y después de exponerse a los vapores de amoniaco

5.7.3. Determinación de cumarinas.

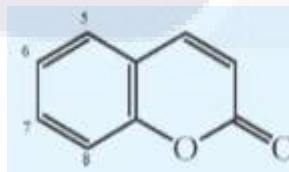
A la exposición de luz uv, los vapores de extracto etanólico capturados en un papel humedecido con un álcali, las cumarinas sublimables se muestran fluorescentes (Domínguez, 1979).



Extracto etanólico

Vapores del Extracto etanolico capturados por un papel embebido en un álcali

Las cumarinas capturadas en el papel embebido en alcali observadas bajo luz uv se presentan fluorescentes.



..Estructura de una cumarina

Figura 19. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de cumarinas.

5.7.4 Determinación de taninos.

Los taninos condensados (polímeros del flavonoide antocianidina), aparecen de color pardo al reaccionar con sales de hierro.

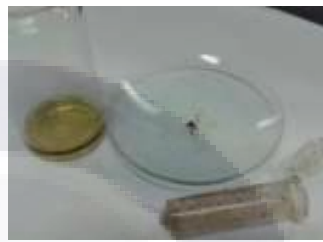
Se disolvió en agua una porción de residuo etanólico, se filtró y se tomo una alícuota de 1 ml que se hizo reaccionar con la solución de cloruro férrico (250mg de cloruro férrico en 5 ml de agua y aforar a 10 ml con alcohol etílico) (Barba, 1997).



Extracto etanólico.



Reaccion del extracto etanolico



Separacion de los taninos obtenidos al reaccionar el extracto con sales de hierro.

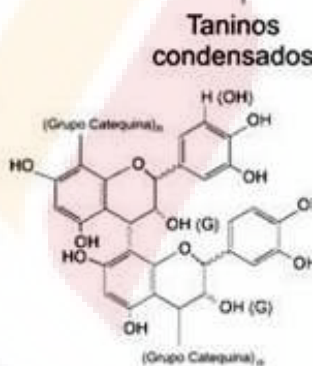


Figura 20. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de taninos.

5.7.5 Determinación de triterpenos (ensayo de Liebermann-Buchard).

Los triterpenos son terpenos de 30 carbonos, por lo general generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola.

Se disolvió residuo etanólico en 1 ml de cloroformo, agregando por las paredes del tubo 1 ml de anhídrido acético, dejándose reposar en frío, al agregar 1 ó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado la aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase, se considera positivo para triterpenos (Domínguez, 1979, Barba, 1997). Este ensayo puede confirmar también la presencia de saponinas esteroidales, por lo

que el color verde específicamente, puede considerarse como muestra de la probable presencia de estos compuestos.



Extracto etanólico



Reaccion del extracto etanólico

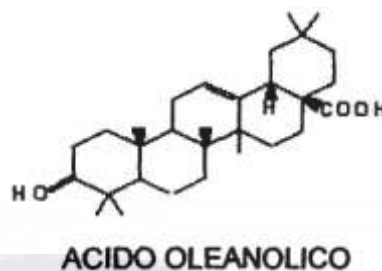


Figura 21. Fotografías de la reacción para la determinación preliminar de triterpenos.

5.8. Pruebas cromatográficas.

5.8.1. Determinación de terpenoides y fenilpropanoides por cromatografía de capa fina.

El revelado con vainillina, nos permite detectar, terpenoides y fenilpropanoides, que incluye compuestos con un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). De acuerdo a lo observado podemos concluir que hay una gran variedad de compuestos de este tipo. La visualización con luz UV nos da bandas fluorescentes amarillas, azules, verdes y naranjas que podrían indicarnos la presencia de flavonoides y cumarinas (fig.18) (Wagner y Bladt, 1996).

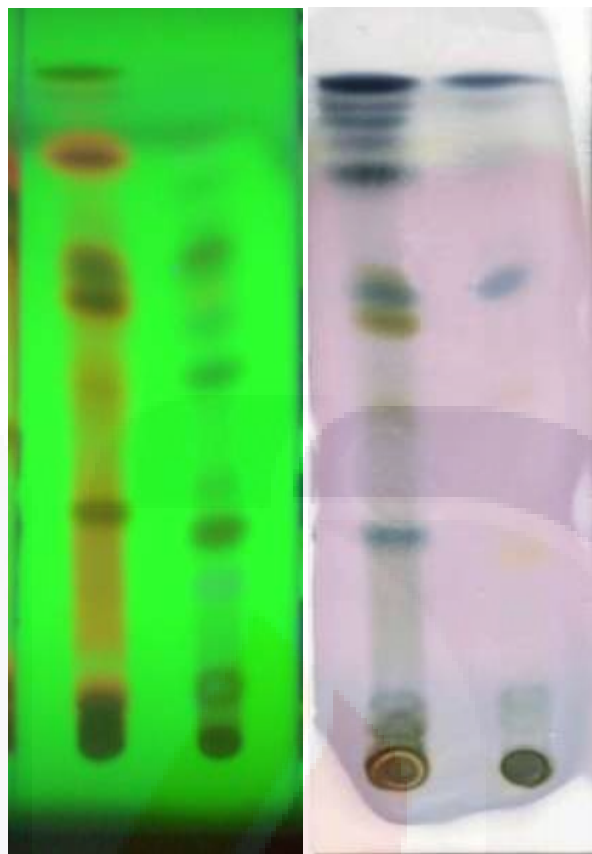


Figura 22. Fotografía: cromatografía en capa fina de hojas y raíz (izq. Y der. De cada barra respectivamente) desarrollada con éter etílico: éter de petróleo (2:1) y vista con uv izq., y revelada con vainillina der. extractos obtenidos con etanol.

5.8.2. Determinación de triterpenos y flavonoides por cromatografía de capa fina.

La mezcla vainillina-acido sulfúrico nos permite detectar flavonoides y fenilpropanoides. La mezcla para revelado de anisaldehído-acido sulfúrico, nos permite detectar terpenoides, propilpropanoides, así como saponinas. De acuerdo al RF se puede establecer que encontramos ácido oleanólico en el carril derecho (el ácido oleanólico es un triterpeno) (fig. .17.1) (Wagner y Bladt, 1996)

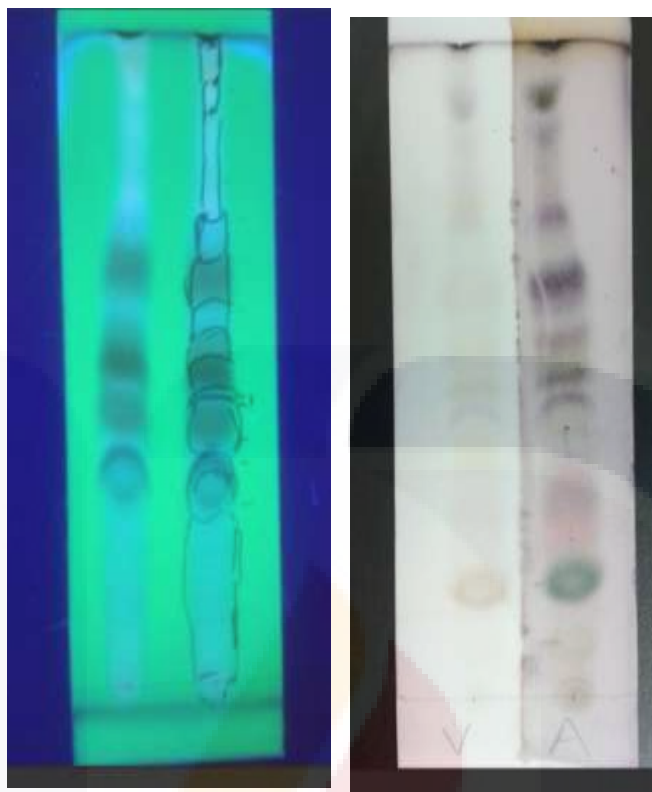


Figura 23. Der. Visualización con UV para la determinación de triterpenos y flavonoides. Fig. izq. carril izquierdo revelado con vainillina-acido sulfúrico, carril derecha revelado con anisaldehído-acido sulfúrico. Para la determinación de triterpenos y flavonoides.

5.8.3. Determinación de cumarinas por cromatografía de capa fina.

La propiedad física más usual para reconocer una cumarina es la fluorescencia que ellas desarrollan a la luz UV (365nm), la que es ampliamente utilizada para su detección en cromatografía de capa fina. Las manchas de color celeste confirman la presencia de este metabolito (Wagner y Bladt, 1996)

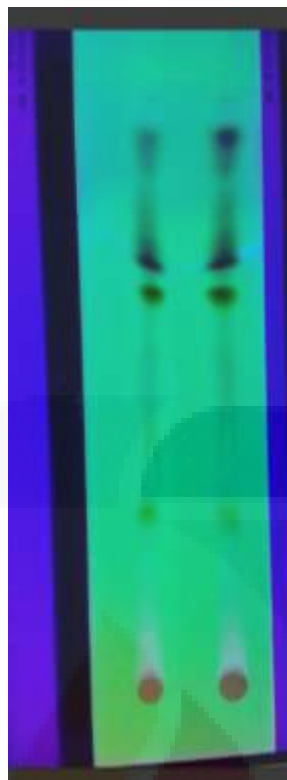


Figura 24. Cromatografía. El color azul claro, nos podría indicar la presencia de cumarinas

5.9. Pruebas cuantitativas.

5.9.1. Preparación de extractos:

Se colectaron hojas de las plantas que se encuentran sembradas en el jardín botánico de la UAA, estas se congelaron a una temperatura aproximada de -52°C ., ya congeladas se liofilizaron, después de esto, se molieron en mortero, se hizo la extracción con etanol 96%, se centrifugó cada muestra para separar la parte sólida y se realizaron las pruebas de determinación de capacidad antioxidante (antirradical), contenido de fenoles, flavonoides, etc.

La preparación de los extractos se muestra en las siguientes figuras:

Obtención del extracto:



Cuantificación espectrofotométrica.

Figura 25. Fotografías de las etapas de preparación del extracto para su análisis.

5.9.2. Determinación de capacidad antirradical con DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

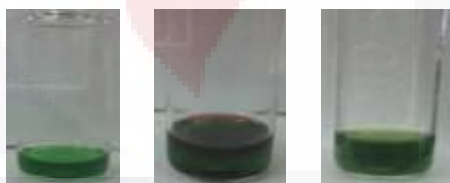


Figura 26. Fotografía de las etapas de la reacción para la determinación de la capacidad antirradical con DPPH.

Método DPPH

Este método consiste en que este radical (DPPH) tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante, al donarle ésta el electrón que requiere. La absorbancia es medida a 517nm. (Bondet,, *et. al.*, 1997, Moura, *et. al.*, 2007).

Procedimiento:

La capacidad antioxidante, se midió mediante el descenso de la absorbancia a 517 nm de una solución etanólica de DPPH provocado por el extracto de Juan mecate. El extracto de Juan mecate fue analizado en diferentes diluciones (25%, 10% y 5%). Se utilizó una solución del radical DPPH 0.5 M en etanol y como antioxidante estándar, trolox.

El extracto a utilizar fue diluido al 10% en un volumen total de 1 ml, se adicionó a cada muestra a medir 600 microlitros de la solución DPPH 0.5M (ambos en etanol) e inmediatamente se realizó la medición de la absorbancia.

Tabla 1. Tabla comparativa de las capacidades antirradical de los diferentes ejemplares de *Anredera cordifolia*, procesadas de diferentes formas para obtener el extracto.

ORIGEN DE LA MUESTRA	PROCESAMIENTO ANTES DE LA EXTRACCION	MUESTRA UTILIZADA (mg)	ETANOL PARA LA EXTRACCIO N(ml)	DILUCION DEL EXTRACTO 25%	CANTIDAD DE DPPH agregada	ABS A 515 dil 25% inmediatamente después de agregado el dpph	OBSERVACIONES
PALO ALTO	SECADA AL HORNO A 37°	754	1	25	600	2.5505	
	FRESCA (RECIEN CORTADA)	754	1	25	600	2.4807	
	LIOFILIZADA	754	1.5	25	600	2.3336	vire inmediato en 50%, el color verde oscuro interfiere
	COCIDA A 90° APROX 3 HRS	754	1	25	600	2.6241	
COLINAS DEL RIO	SECADA AL HORNO A 37°	754	1	25	600	2.406	
	FRESCA (RECIEN CORTADA)	754	1	25	600	2.6126	vire inmediato no total
	LIOFILIZADA	754	1.5	25	600	0.9918	vire inmediato
	COCIDA A 90° APROX 3 HRS	754	1	25	600	1.5326	vire inmediato no total , se observa un incremento de color a café claro
JESUS MARIA	SECADA AL HORNO A 37°	754	1	25	600	2.6086	
	FRESCA (RECIEN CORTADA)	516	1	25	600	2.5836	
	LIOFILIZADA	754		25	600		
	COCIDA A 90° APROX 3 HRS	516	1	25	600	2.294	

Tabla 2. Tabla comparativa de la capacidad antirradical del extracto obtenido de la muestra originaria de colinas del río, a diferentes diluciones.

origen de la muestra	procesamiento antes de la extracción	cantidad de muestra utilizada	etanol utilizado para la extracción	dil del extracto (%)	dpph agregado (µl)	abs dil. 10%	abs. Dil 5%	promedio de absorbancias 10%	promedio de absorbancias 5%	diferencia al 10%	diferencia al 5%
colinas	liofilizado	60mg de muestra liofilizada	1ml	10 y 5	600µl	0.5792	1.1725	0.5464	1.11935	0.365	1.01955
			1ml		600µl	0.5136	1.0662				
			1ml		600µl de etanol en lugar de dpph	0.18141	0.0998	0.18141	0.0998		

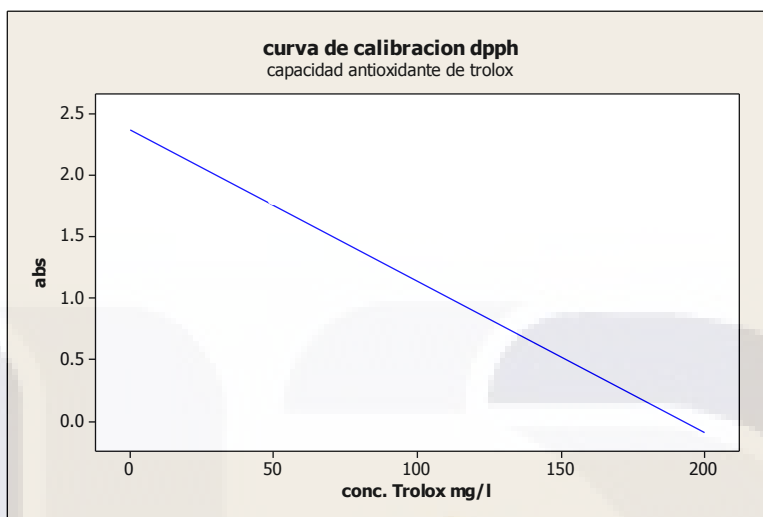
De acuerdo a los resultados anteriores se observó que la muestra que presentaba mayor actividad antioxidante fue la que se colectó originalmente en Colinas del río y el mejor método de extracción es a partir de hojas liofilizadas, la dilución a usar es del 10%.

Se realizó además un análisis comparativo de la capacidad antirradical de diferentes antioxidantes y extractos de "*Anredera cordifolia*", diluidos en proporción semejante. obteniéndose lo siguiente:



Gráfica 1. : Gráfica comparativa de La capacidad antirradical de diferentes antioxidantes comparados con extractos de *Anredera cordifolia*. 1. Trolox. 2. Quercetina. 3. Ac. Gálico. 4. Ac. Ascórbico, 5. Extracto 1. 6. Extracto2. 7. Extracto3. 8. Extracto 4.(Extracto1: extracto obtenido un mes antes de su análisis de hojas liofilizadas aproximadamente 2 meses antes, ambos guardados en condiciones de media oscuridad y a temperatura ambiente. Extracto 2: extracto obtenido de las mismas hojas del extracto anterior, pero hecho 4 días antes de su análisis, luego liofilizado y después resuspendido en alcohol. Extracto 3: igual que extracto 1. Extracto 4: hecho de hojas liofilizadas una semana antes del análisis).

Gráfica 2. curva de calibración para la determinación de Capacidad antioxidante con DPPH



La ecuación de regresión es: $Abs = 2.37 - 0.0123 \text{ conc. Trolox mg/l}$. $R^2 = 92.0449$

5.9.3. Determinación de fenoles. Método de Folin y Ciocalteu.

Este método, se basa en la medida de la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, oxidos que dan color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Waterhouse, 2005.).



Figura 27. Reacción de la curva de calibración para la determinación de fenoles.

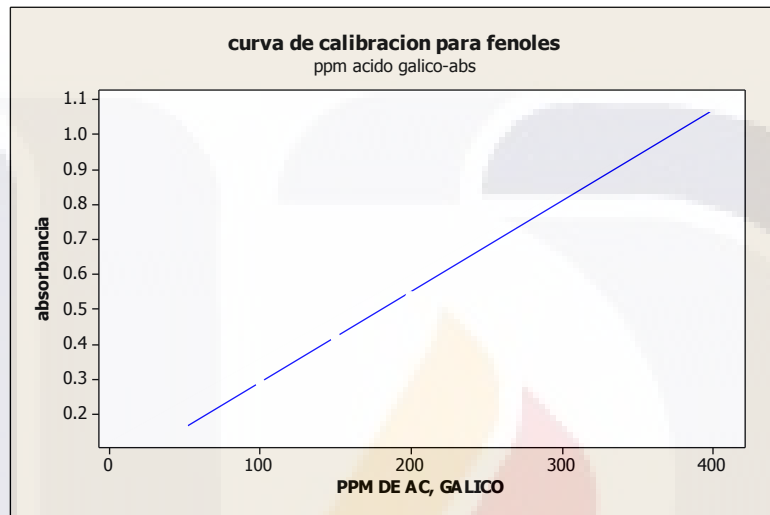
Procedimiento:

Se preparó carbonato de calcio 0.5 g en 25 ml, Reactivo Folin 500µl en 500µl de etanol. Para hacer la reacción se agregó al tubo de reacción 2 ml de carbonato de sodio y 100µl de extracto, se agitó y a esto se agregó 100µl de reactivo Folin. Se dejó reposar

30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y se leyó a 765 nm.

Para conocer la concentración del extracto se preparó una curva de ácido gálico con diferentes concentraciones.

Gráfica 3. curva de calibración para la determinación de Fenoles por el método Folin-Ciocalteu



La ecuación de regresión es Absorbancia = 0.0326 + 0.00259 ppm de Ac. Gálico. $R^2= 98.7$

5.9.4 Actividad de barrido del óxido nítrico.

El nitroprusiato de sodio en solución acuosa con pH fisiológico genera espontáneamente óxido nítrico, que reacciona con el oxígeno produciendo iones de nitrito que se pueden estimar mediante el reactivo de Griess. Los secuestrantes de óxido nítrico compiten con el oxígeno, ocasionando una reducción en la producción de óxido nítrico (Bafna y Mishra, 2005).

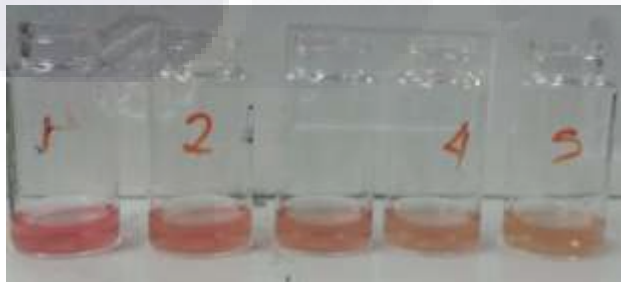


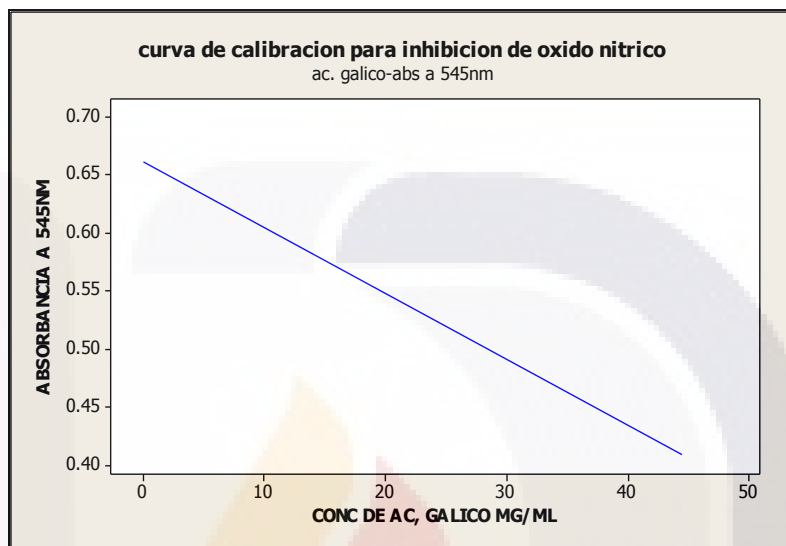
Figura 28. Reacción de la curva de calibración para la determinación de barrido de oxido nítrico.

Procedimiento:

La reacción se efectuó agregando a 2 ml de nitroprusiato de sodio, 200ul de la muestra en etanol y 2 ml de reactivo de Griess (1% sulfanilamida. 2% H_3PO_4 y 0.1%

naftilendiamida) y lectura de absorbancia del cromóforo formado a 545nm. El IC₅₀ se calcula como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por la muestra en comparación con el blanco. Se utilizó ácido gálico como estándar.

Gráfica 4. Curva de calibración para determinar la capacidad de inhibición de oxido nítrico



La ecuación de regresión es: Absorbancia a 545nm = 0.661 - 0.00567 Conc. de ac. Gálico mg/ml. R²= 91.7

5.9.5. Determinación del poder reductor.

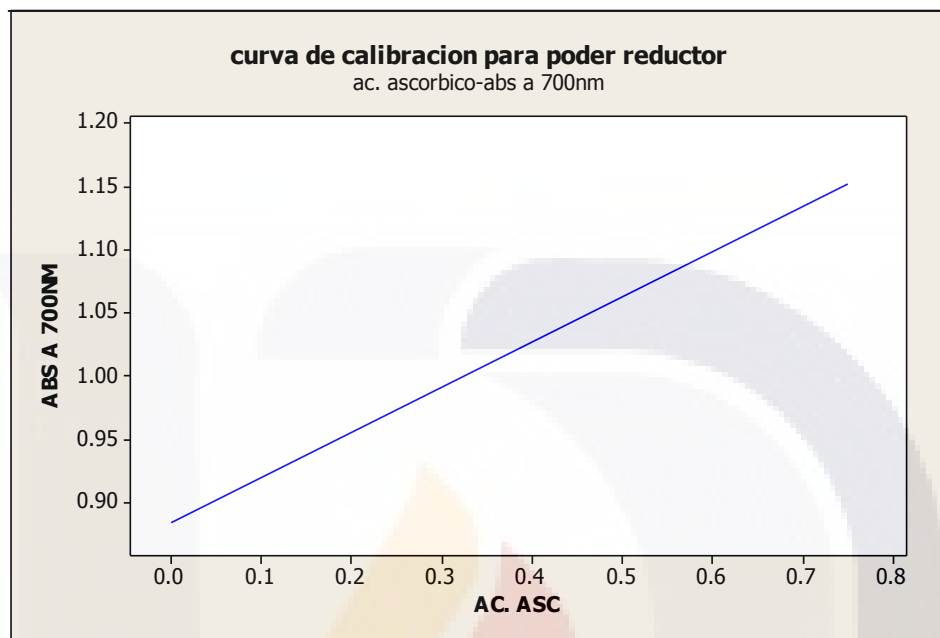
El poder reductor de los extractos de la planta se determinó por el método de Oyaizu. El poder reductor de un compuesto depende de la capacidad de transferir electrones del propio compuesto. El aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción indica un aumento en el poder reductor (Bafna y Mishra, 2005).



Figura 29. Fotografías de aspectos de la reacción para la determinación del poder reductor.

Se agregó a 2.5 ml de extracto diluido al 10% 2.5 ml de tampón fosfato y 2.5 ml de ferrocianuro potásico, incubando a 50 °C durante 20 min, agregando después 2.5 ml de ácido tricloroacético, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min, del sobrenadante se tomó 2.5 ml, agregando 2.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de cloruro férrico y leyendo a 700nm. Como estándar se utilizó ácido ascórbico.

Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de poder reductor.



La ecuación de regresión es $Abs\ A\ 700nm = 0.883 + 0.359\ Ac.\ Ascórbico$. $R^2 = 97.1$

5.9.6. Determinación de flavonoides totales.

El método de análisis se basa en una evaluación espectrofotométrica de un complejo formado con cloruro de aluminio tras la hidrólisis ácida de los glucósidos (Lock, *et. al.*, 2006).

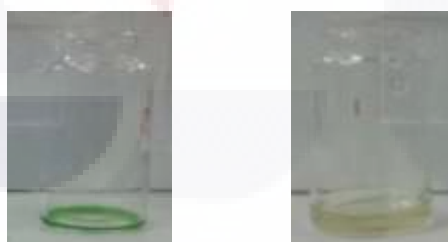


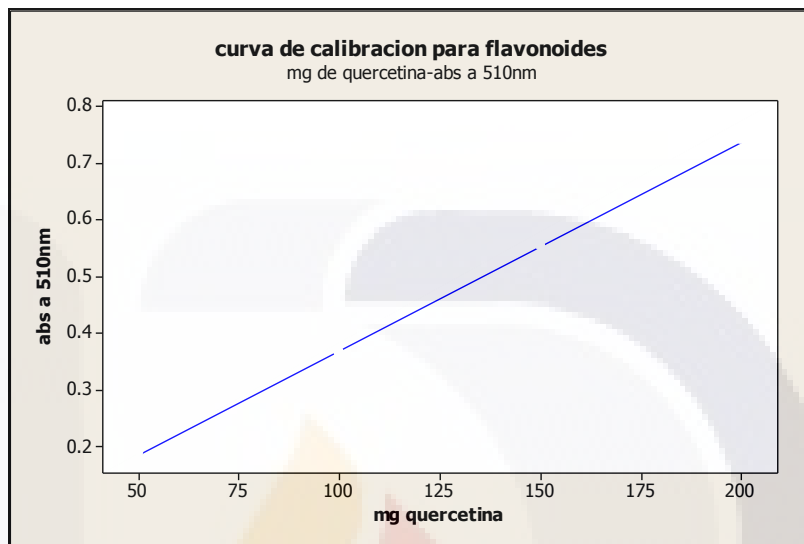
Figura 30. Aspectos de la reacción para la determinación cuantitativa de flavonoides totales.

Procedimiento:

La reacción se efectuó, agregando a 100µl de extracto diluido al 10%, 300µl de agua deionizada, 30µl de nitrito de sodio al 5%, se dejó reposar 5 min, agregándose después 30µl de cloruro de aluminio al 10%, reposando nuevamente 5 min, agregando luego 200µl de hidróxido de sodio 1 mM y 340µl de agua deionizada, leyéndose a 510nm.

Se realizó la curva para la determinación de flavonoides utilizando como estándar quercetina.

Gráfica 6. Curva de calibración para la determinación de Flavonoides.



La ecuación de regresión es $\text{abs a 510nm} = 0.00241 + 0.00368 \text{ mg quercetina}$. $R^2 = 100$

La cuantificación de las pruebas realizadas, se llevó a cabo por medio de un espectrofotómetro Cintra 10e.



Figura 31. Fotografía del espectrofotómetro con el que realizó la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios de *Anredera cordifolia*.

5.9.7. Resumen de resultados de pruebas cuantitativas.

Tabla 3. Tabla de resultados de acuerdo a las absorbancias obtenidas y las curvas de calibración para cada prueba.

Prueba	Capacidad antioxidante con DPPH	Fenoles por el método Folin-Ciocalteu	Flavonoides	Poder reductor con ferrocianuro potásico	Capacidad de barrido de oxido nítrico
Capacidad del extracto	228322±2421 eq de trolox en 100g de hoja fresca	193128±11784 eq de ácido gálico (mg/l) en 100g de hoja fresca	208633±51985 eq de quercetina en 100 g de hoja fresca	1331±201 eq de ac. Ascórbico en 100g de hoja fresca	6952±875 eq de ac. Gálico en 100g de hoja fresca

5.10. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

La Espectrometría de Masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. Requiere cantidades pequeñas de muestra y obtiene información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito.

En la Espectrometría de masas la muestra es ionizada (y por tanto destruida) usando diversos procedimientos para ello. De todos ellos el más usual y/o utilizado es la técnica denominada de Impacto Electrónico consistente en el bombardeo de la muestra (previamente vaporizada mediante el uso de alto vacío y una fuente de calor) con una corriente de electrones a alta velocidad.

Mediante este proceso, la sustancia pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras. Los iones (moléculas o fragmentos cargados) son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador curvado sobre el que existe un fuerte campo magnético y conducidos a un colector/analizador sobre el que se recogen los impactos de dichos iones en función de la relación carga/masa de los mismos. Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito (scai).

Se realizó cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los extractos de raíz, hoja y de las bandas más representativas (gruesas) de la cromatografía de capa fina (hoja), realizadas.

Para la realización de estos análisis se utilizó un equipo Agilent 6850 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C.

Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura del inyector 270 grados, temperatura inicial de corrida 70 grados durante 1 min, seguido de una rampa con incrementos de 20 grados por min, hasta 250 grados y después se mantuvo por 2 min.

La temperatura de salida al espectro de masas de 270 grados. La temperatura de la fuente de ionización 230 grados y temperatura del cuadrupolo 150 grados. Se utilizó una columna HP 5MS.

5.10.1 Compuestos encontrados:

Se encontraron algunos compuestos tales como: benzofenona, , benzaldehído, 3-dimetil-1-butanamina, , ciclohexiletamina, 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol, dextroanfetamina, , 7-hidroxy-3(1;1-dimetil prop-2-enyl)coumarina, ácido hexadecanoico 4-nitrofenil éster, bacchotricuneatin c, Biciclo (2,2,1) heptan-2-ona, 1,7,7, trimetyl (1s).

La benzofenona se utiliza en la síntesis de antihistamínicos; bacchotricuneatin c es un diterpeno; Biciclo (2,2,1) heptan-2-ona, 1,7,7, trimetyl (1s), es el alcanfor terpenoide que ofrece acción rubefaciente, antiprurítica, antiséptica y ligeramente analgésica; 3-dimetil-1-butanamina, parece que muestra actividad antifúngica; dextroanfetamina, se considera estimulante del sistema nervioso central. (The Merck index, 1983).

Cromatograma de extracto de raíz

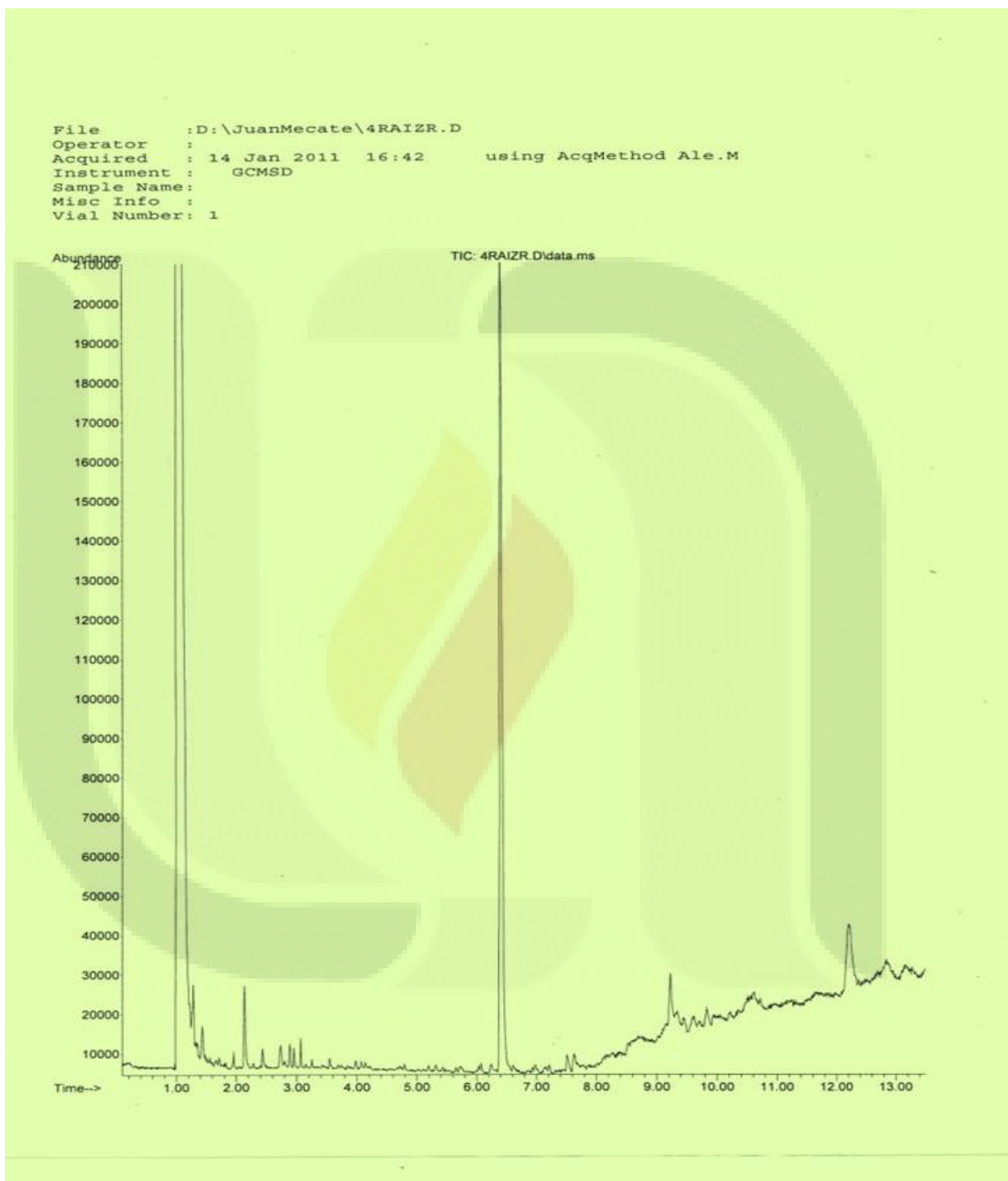


Figura 32. Cromatograma obtenido del extracto etanólico de raíz en el equipo GC-MS, los espectros de masas, así como su fórmula más probable se muestran en las últimas figuras.

Cromatograma de extracto de hoja

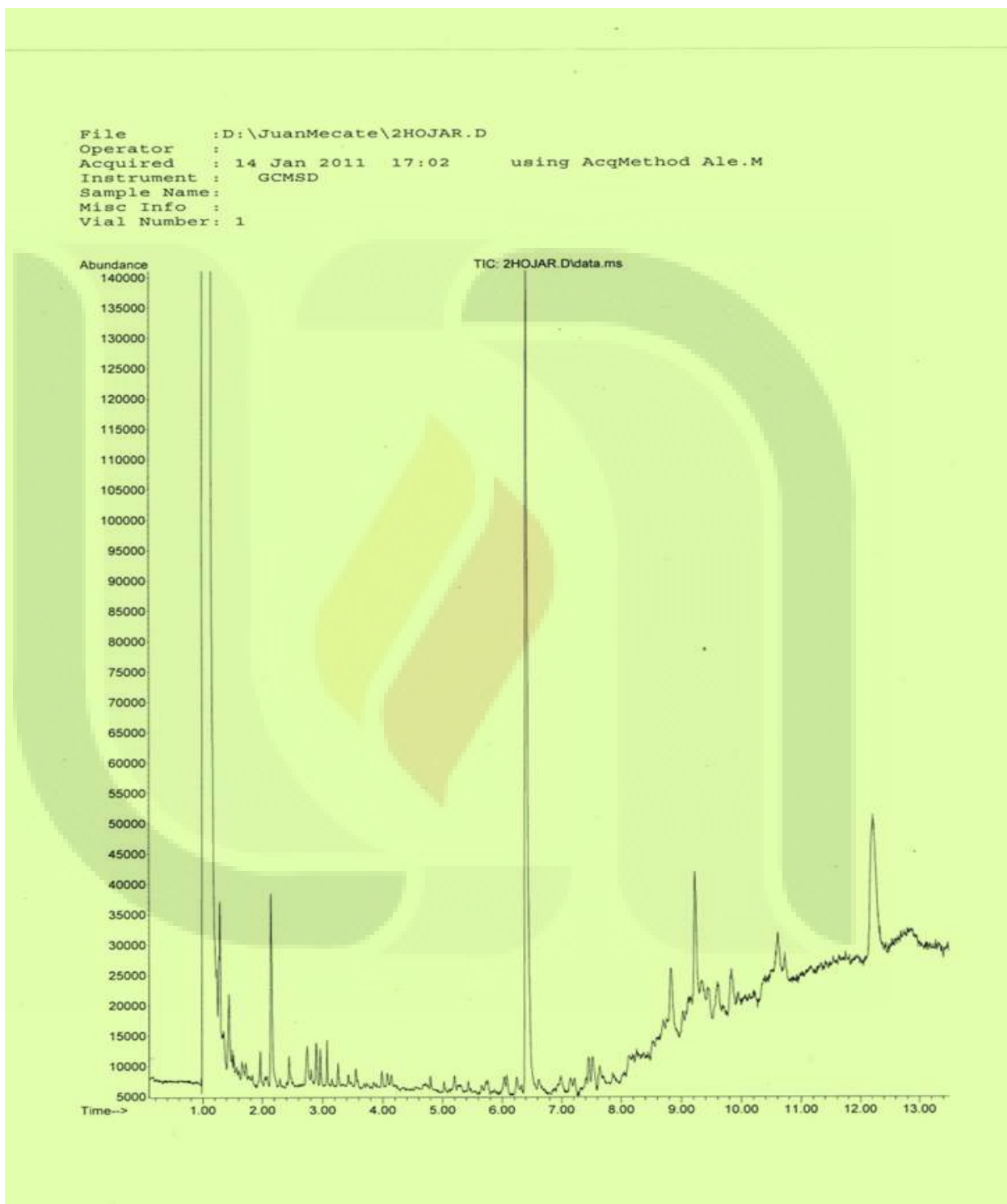


Figura 33. Cromatograma obtenido del extracto etanólico de hojas en el equipo GC-MS, los espectros de masas, así como su fórmula más probable se muestran en las últimas figuras.

Cromatograma de bandas extraídas de una cromatografía de capa fina

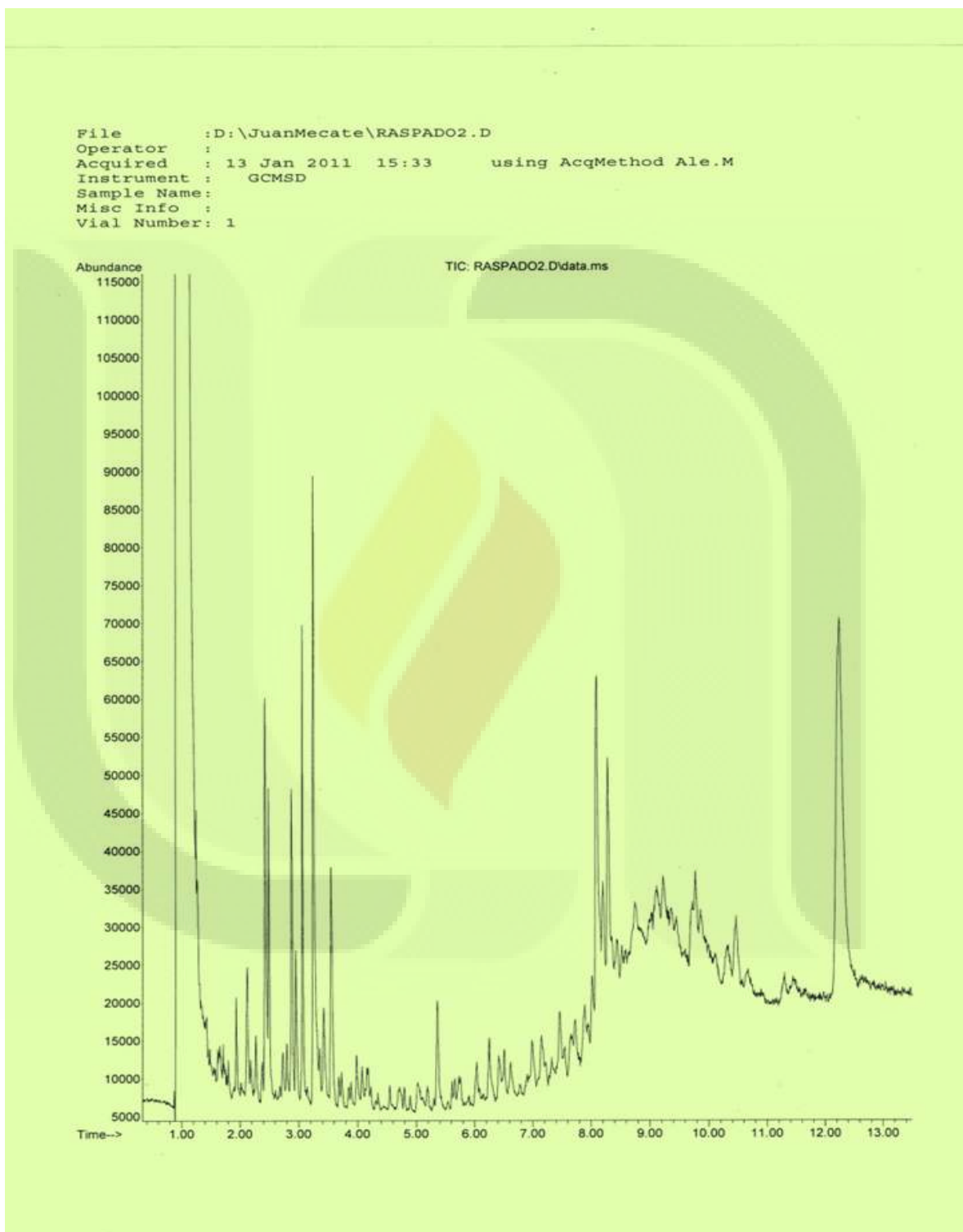
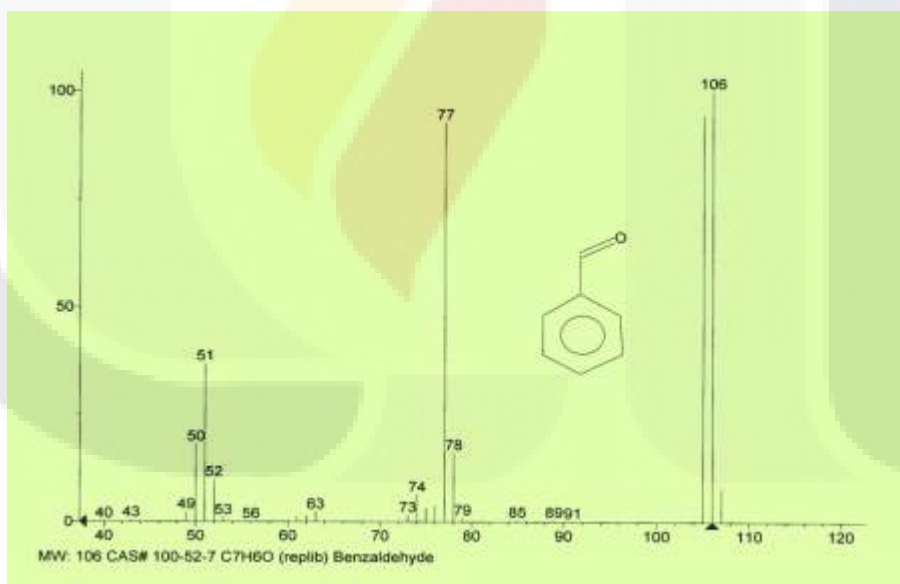
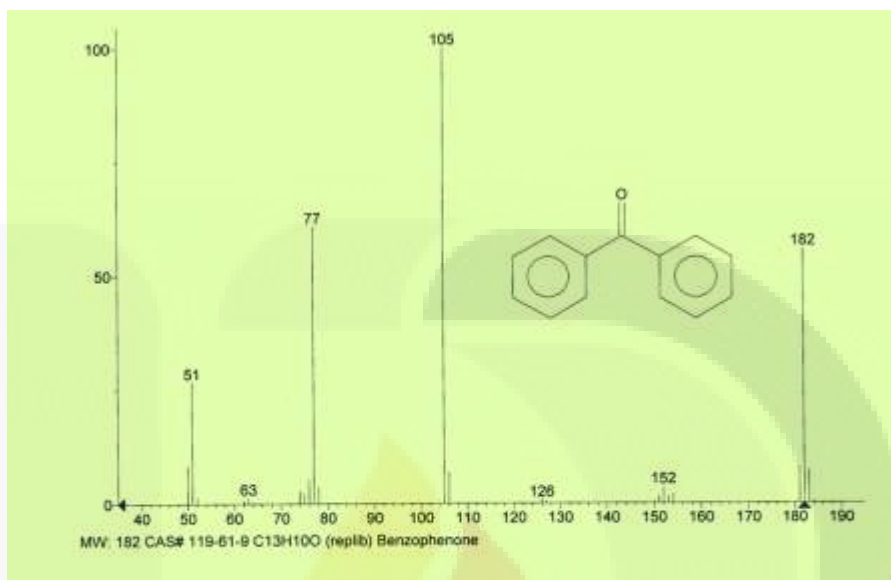
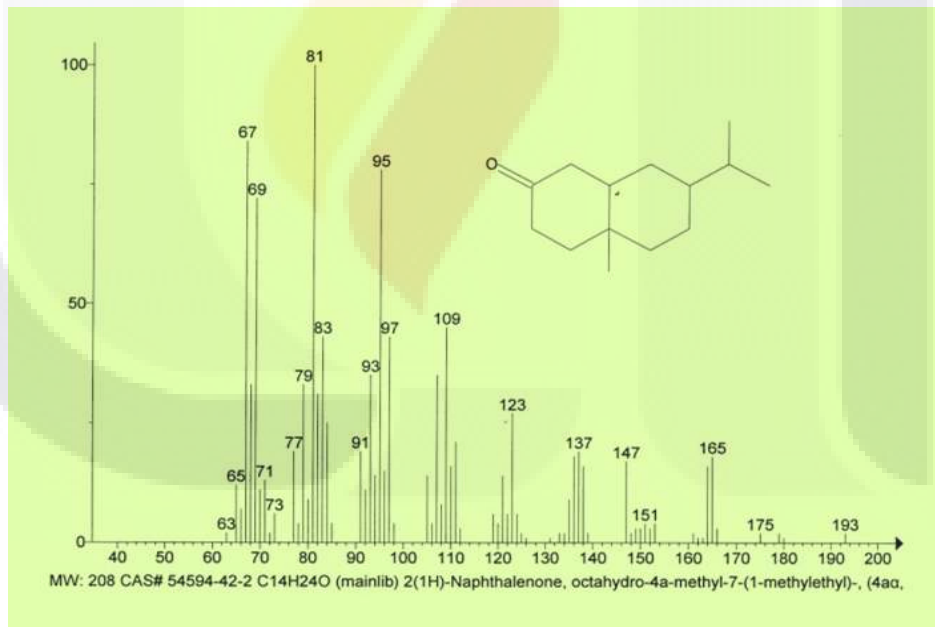
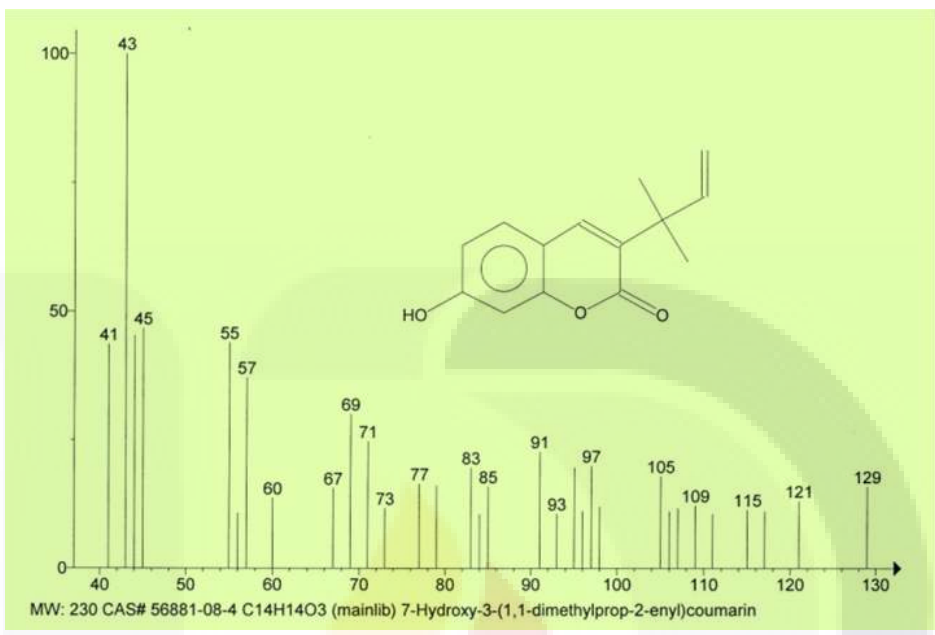


Figura 34. Cromatograma obtenido a partir de raspado de bandas de Cromatografía en capa fina.

Espectros de algunos compuestos encontrados





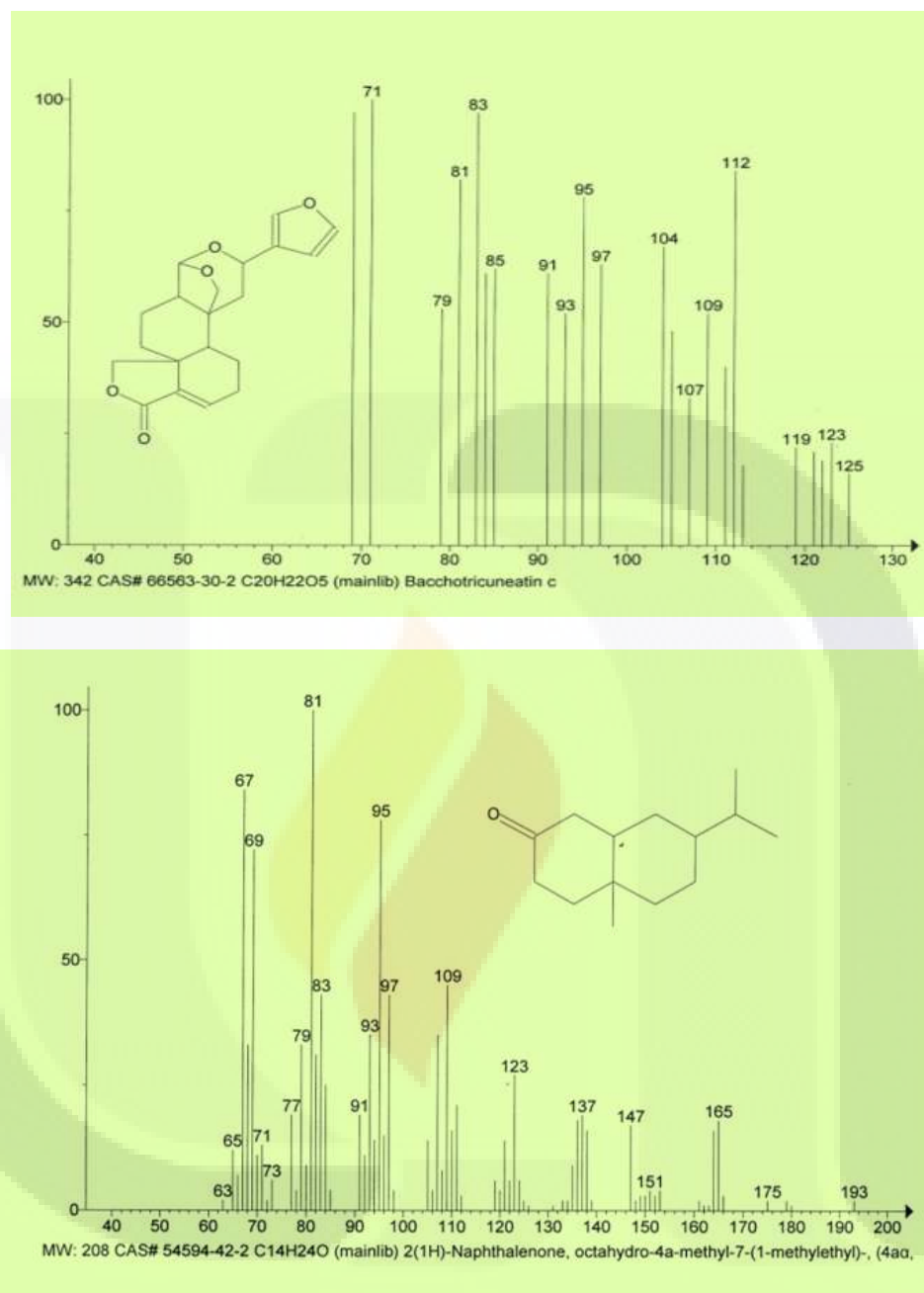


Figura 35. Espectros de los diferentes compuestos encontrados en las muestras de *Anredera cordifolia*.

5.11. Resumen de compuestos encontrados en Juan mecate (*Anredera cordifolia*).

COMPUESTO ACTIVO	TIPO DE ANÁLISIS MEDIANTE EL QUE SE ENCONTRÓ
*Saponinas de triterpenos pentacíclicos	*Reactivo de Rosenthaler y método de la espuma y cromatografía de capa fina.
*Flavonoides©	*Exposición del extracto a un álcali y cromatografía de capa fina.
*Cumarinas	*uv-vis con álcali y cromatografía de capa fina visualizada con uv-vis.
*Taninos	*Reacción con sales de fierro.
*Triterpenos	*Ensayo de Liebermann-buchard,
Fenoles©	Folin Ciocalteu.
*Sapogeninas esteroidales	* Ensayo de Liebermann-buchard, Baccou, <i>et al.</i> , 1977.
*Acido oleanólico	Cromatografía de capa fina.
Benzofenona	Cromatografía de gases acoplada a masas.
Biciclo (2,2,1) heptan-2-ona, 1,7,7, trimetyl (1s), [es el alcanfor]	Cromatografía de gases acoplada a masas.
3-dimetil-1-butanamina	Cromatografía de gases acoplada a masas.
Dextroanfetamina	Cromatografía de gases acoplada a masas.
ciclohexiletilamina,	Cromatografía de gases acoplada a masas.
3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol	Cromatografía de gases acoplada a masas.
7-hidroxy-3(1;1-dimetil prop-2-enyl) coumarina	Cromatografía de gases acoplada a masas.
Acido hexadecanoico 4-nitrofenil ester	Cromatografía de gases acoplada a masas.

Tabla 4. Resumen de compuestos encontrados en Juan mecate. *Pruebas preliminares, © método cuantitativo.

5.11. Pruebas realizadas en rata con el veneno de la araña *Loxosceles apachea*.

Considerando la gran capacidad antioxidante que se encontró en el extracto de *Anredera cordifolia* y los compuestos activos encontrados, así como la capacidad para barrer el oxido nítrico, se determinó probar la capacidad de este para inhibir el daño

generado por el veneno que inyecta la araña *Loxosceles apachea* con su mordedura, ya que uno de los efectos observados ha sido un proceso inflamatorio agudo que generalmente termina en necrosis en el lugar de la mordedura y/o falla renal y/o hepática.

5.12.1. Procedimiento para la realización de la prueba.

Para la realización de este experimento se llevó a cabo los siguientes pasos:

- a).** Obtención del extracto de *Anredera cordifolia*, considerándose una dosis de 100mg: el extracto a utilizar se obtuvo de igual forma que para hacer las determinaciones cuantitativas, liofilizándose y resuspendiéndose en solución salina.
- b).** Inyección del extracto en la zona peritoneal de la rata, considerando que es la vía más rápida de absorción. A las ratas control se les inyectó de igual forma 100 mg de extracto.
- c).** Extracción del veneno de la araña *Loxosceles apachea*.



Figura 36. Extracción de veneno de *Loxosceles apachea* con estimulación eléctrica a los quelíceros.

Para poder obtener el veneno de la araña *Loxosceles apachea*, se somete ésta a un estímulo eléctrico en sus quelíceros con los siguientes parámetros:

Voltaje: 30 – 40 volts

Frecuencia 100 milisegundos

Duración: 90 milisegundos

De cada araña se han obtenido hasta 1 microlitro de veneno, esta producción es variable, de acuerdo a las condiciones (edad, tamaño, ayuno) en que se encuentre el arácnido.

d) Inoculación del veneno. La inoculación se llevó a cabo inmediatamente después de la extracción, en la pata trasera izquierda de la rata. La cantidad de veneno inoculado fue de 5 microlitros.

Ratas Wistar hembras n=3.

Tabla 5. Prueba para la determinación del efecto producido en ratas inoculadas con el veneno de la araña *Loxosceles apachea* en ratas tratadas con extracto de *Anredera cordifolia* y sin tratamiento.

NO. DE EXPERIMENTO	PESO RATA(g)	CANTIDAD DE VENENO INOCULADO	CANTIDAD DE EXTRACTO INYECTADO
1	203 ± 12	5 microlitros	
2	215 ± 27	5 microlitros	100mg
3	205 ± 6	-	100mg

d). Obtención de muestras de riñón, hígado y piel a las 4 hrs después de haber inoculado el veneno (ver cuadro de experimento).

Después de 4 hrs, se tomó muestras de hígado, riñón, pata y se observó el efecto mostrado visualmente.. Se tomó muestra de piel, donde fue inoculado el veneno, hígado y riñón, para realizar cortes histológicos de las mismas.

e). Obtención y análisis de cortes histológicos obtenidos de estas muestras.

5.12.2. El efecto visual resultante.

Experimento 1: Inoculación de veneno.



Figura 37. Fotografías de diferentes etapas de la reacción después de la inoculación del veneno de *Loxosceles apachea* en la pata derecha de la rata.

Experimento 2: Inoculación de veneno + tratamiento con extracto de *Anredera cordifolia*.



Figura 38. Fotografías de diferentes etapas de la reacción después de la inoculación del veneno de *Loxosceles apachea* en la pata derecha de la rata a la que se inyectó previamente extracto de *Anredera cordifolia*.

Además se observó que:

- a) En la primera hora después de inocular el veneno se mostró menos inflamación en las ratas a las que se inyectó extracto en comparación con las que se inoculó solo veneno.
- b) La inflamación nunca llegó a ser igual en las ratas a las que solo se inyectó veneno.
- c) Las ratas a las cuales solo se inoculó veneno, se estuvieron lamiendo la pata lastimada desde el momento de la inoculación.
- d) Las ratas a las cuales se inyectó extracto, nunca se lamieron la pata lastimada.
- e) Las ratas a las que se inyectó solo extracto se mostraron un poco relajadas.

5.12.3. Cortes histológicos obtenidos.

Después de 4 horas de haber inoculado el veneno, se tomaron muestras de piel, hígado y riñón, fijándose con formalina neutra, para su procesado y obtención de los respectivos cortes histológicos, utilizando tinción de Hematoxilina-eosina.

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Con esta técnica, se tiñen los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

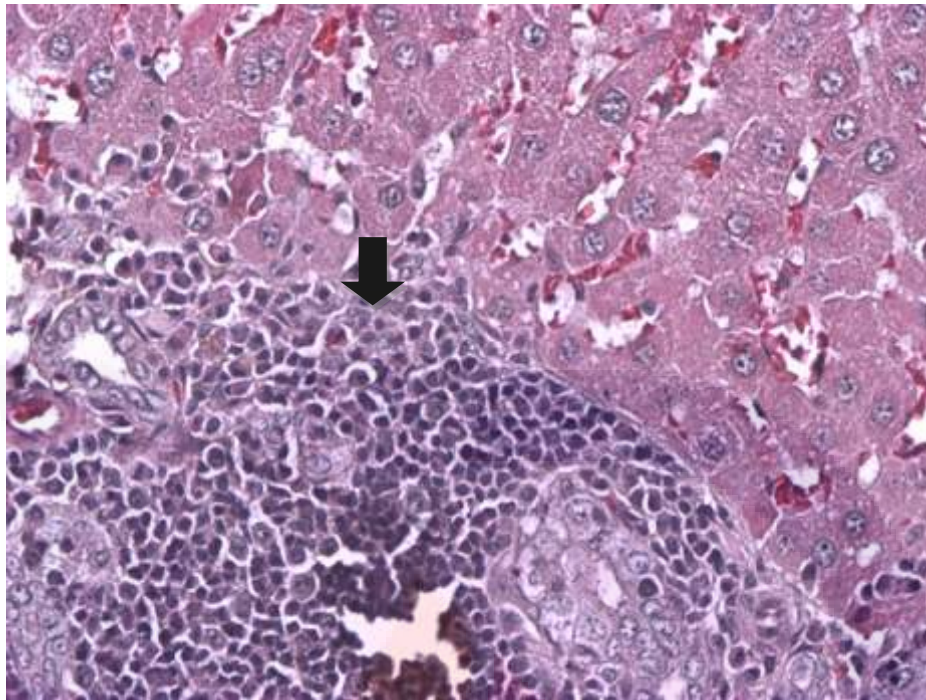


Figura 39. Corte histológico de Hígado de rata inoculada con veneno de loxosceles apachea, donde puede observarse el infiltrado inflamatorio generado (20x).

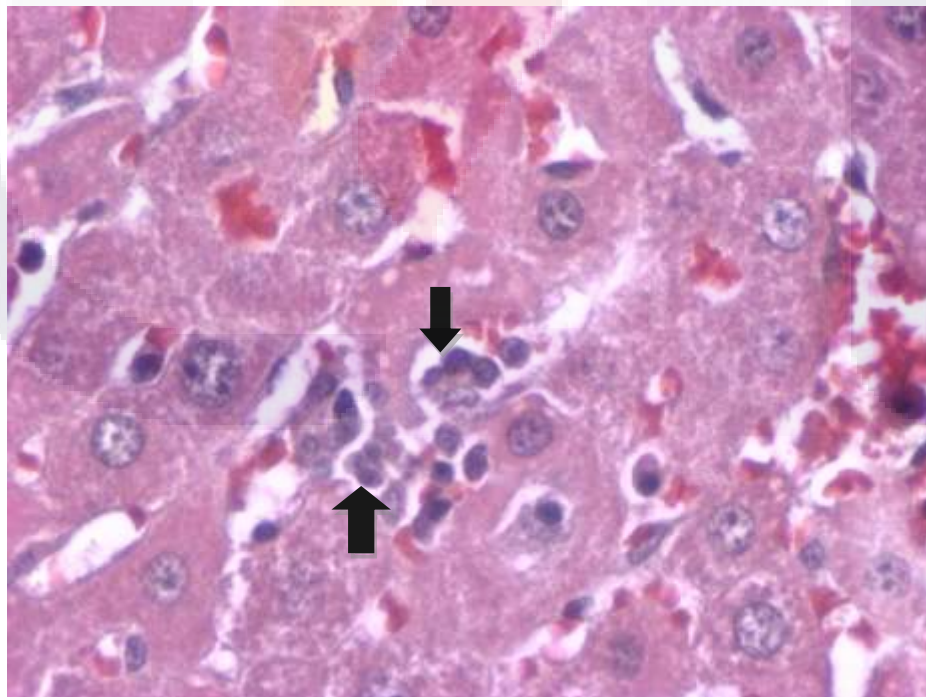


Figura 40. Corte histológico de Hígado de rata inoculada con veneno de loxosceles apachea, donde se observa necrosis de hepatocitos (20x).

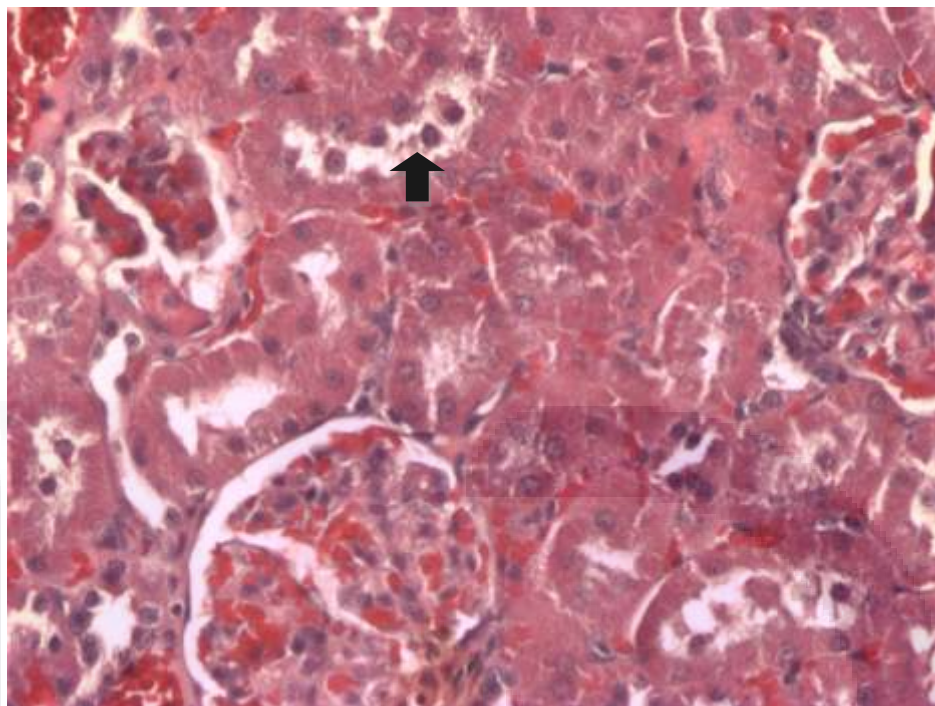


Figura 41. Corte histológico de riñón de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*, donde puede observarse células desprendidas en la luz de los túbulos.(20x).

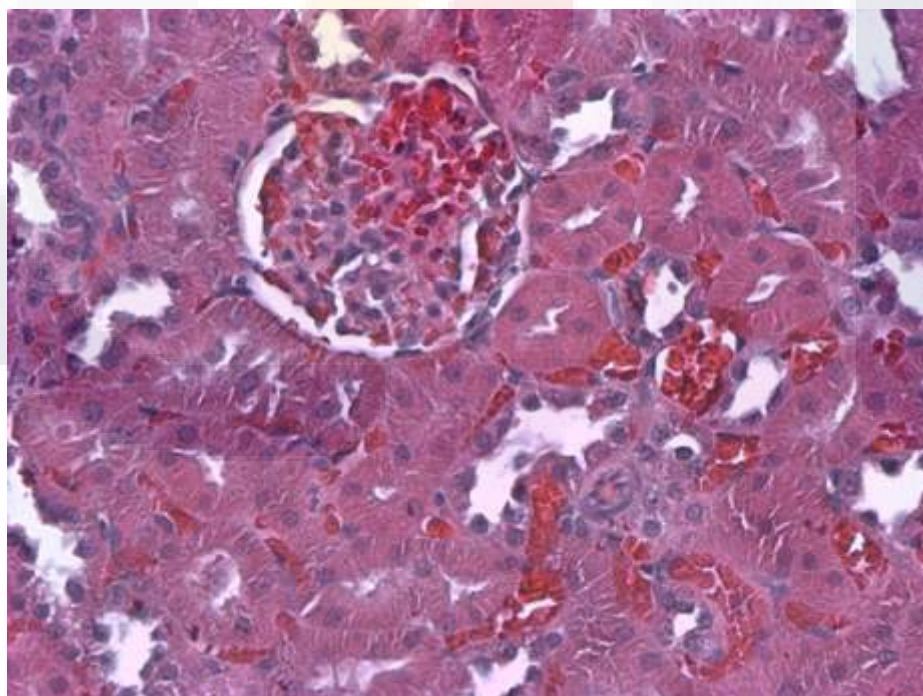


Figura 42. Corte histológico de riñón de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*, previamente tratada con extracto de *Anredera cordifolia*.(20x)

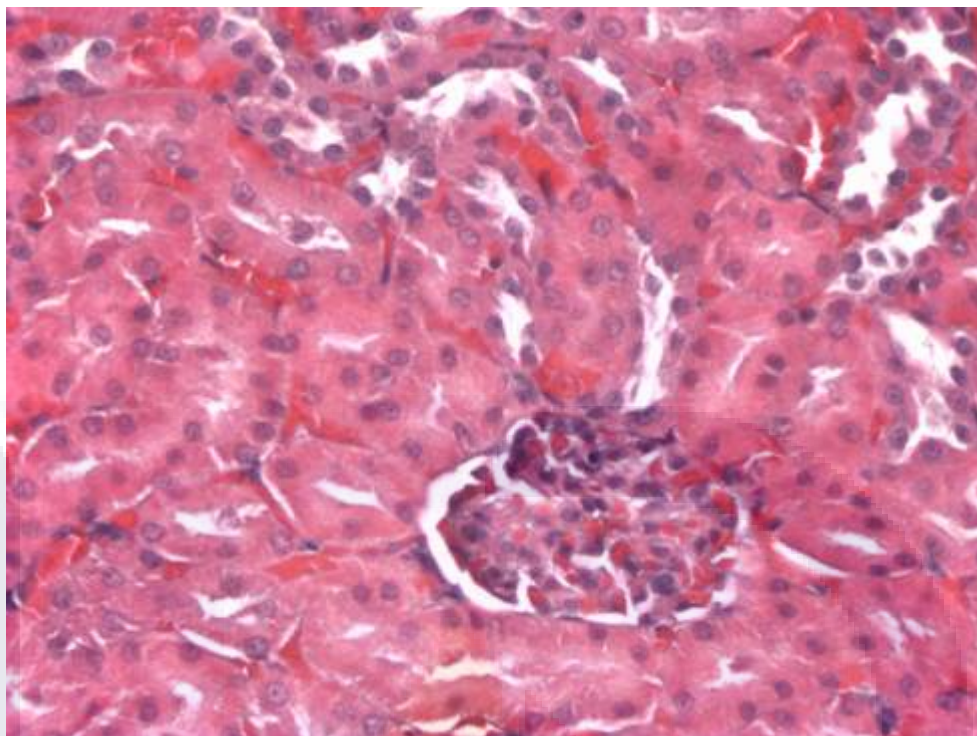


Figura 43. Corte histológico de riñón de rata tratada con extracto de *Anredera cordifolia*.(20x).

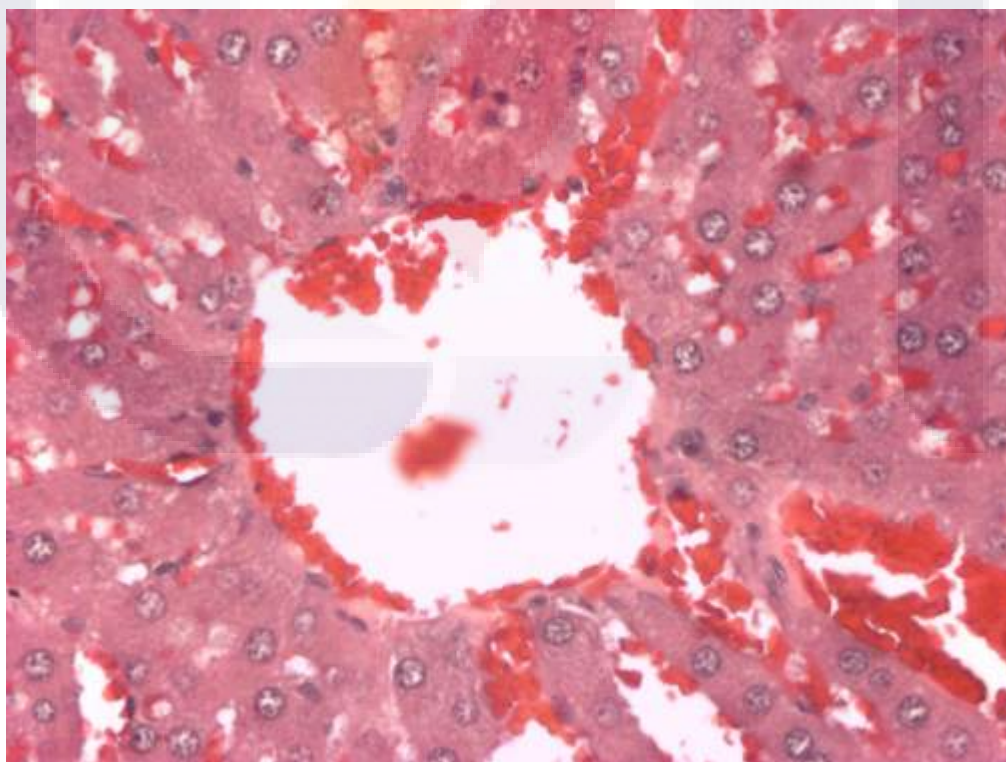


Figura 44. Corte histológico de hígado de rata tratada con extracto de *Anredera cordifolia*.(20x).

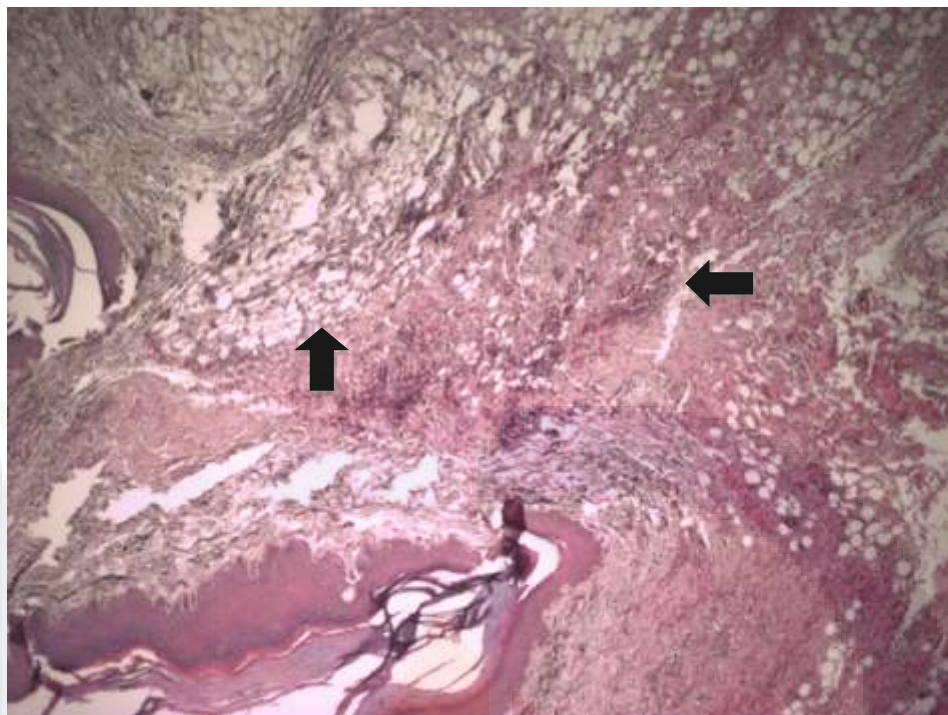


Figura 45. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*.(2,5x).

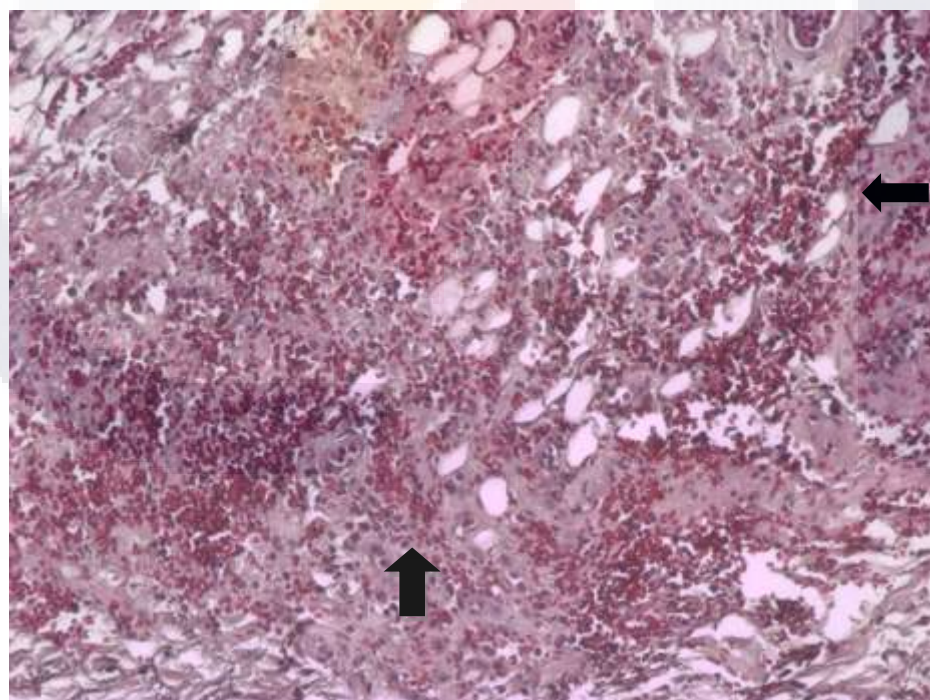


Figura 46. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*.(20x).

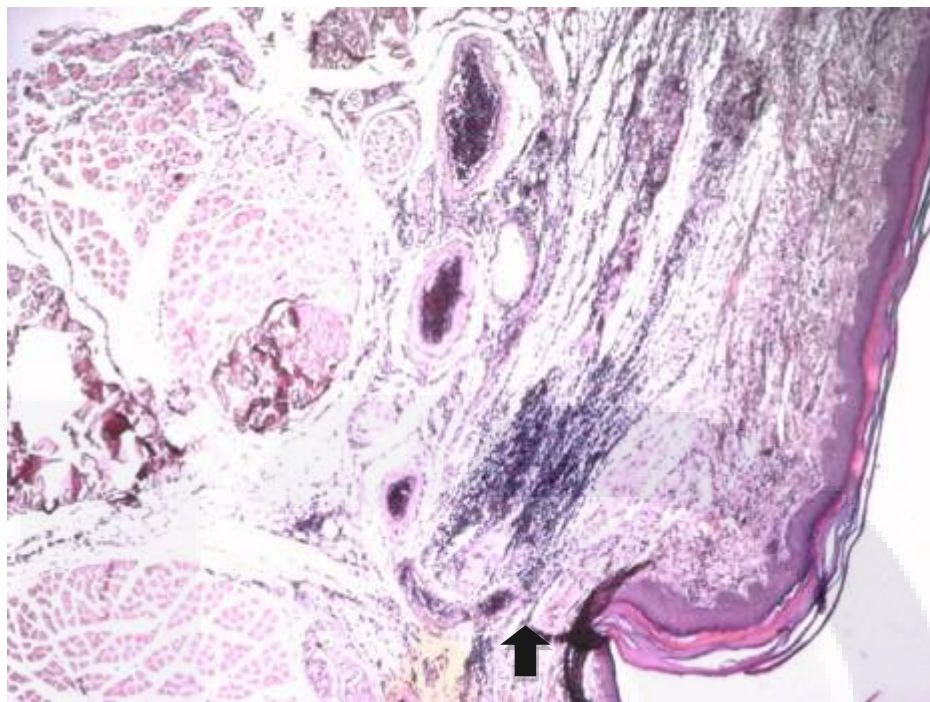


Figura 47. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*, y tratada previamente con extracto de *Anredera cordifolia* (20x).

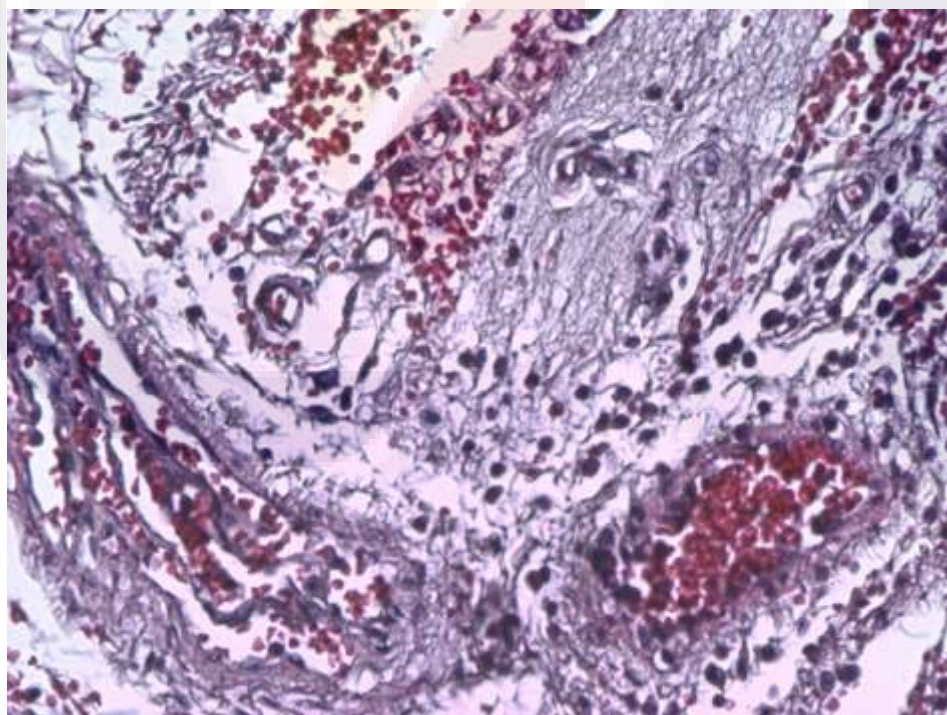


Figura 48. Corte histológico de piel de rata inoculada con veneno de *Loxosceles apachea*, tratada previamente con extracto de *Anredera cordifolia* (20x).

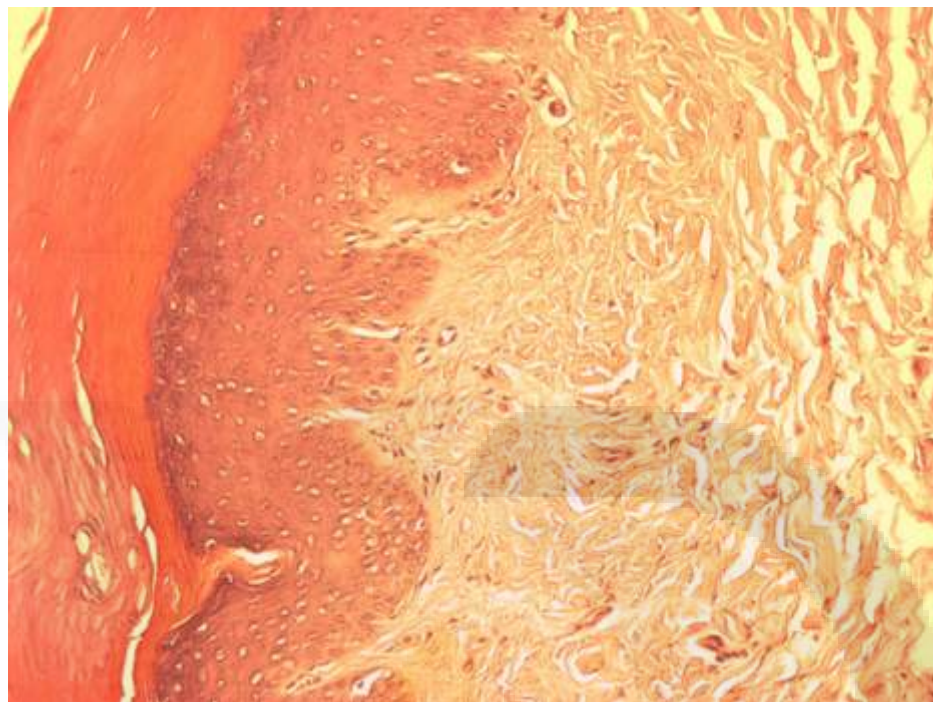


Figura 49. Corte histológico de piel de rata tratada con extracto de *Anredera cordifolia*.(20x).

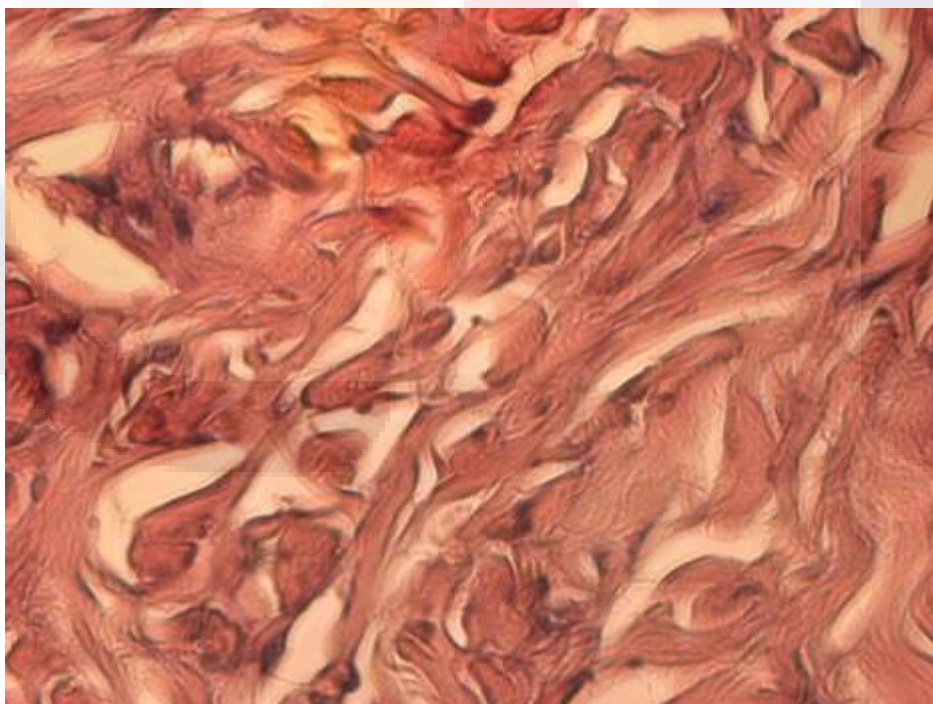


Figura 50. Corte histológico de piel (dermis profunda) de rata tratada con extracto de *Anredera cordifolia*.(40x).

6. DISCUSIONES:

- El presente trabajo, se realizó para justificar la razón del uso como tratamiento en picaduras de zancudos, acné, heridas, y animales ponzoñosos en la medicina tradicional de la planta comúnmente llamada Juan mecate además de conocer la especie a la que pertenece.
- Se identificó la especie, siendo esta una *Anredera cordifolia* además de que se encontraron compuestos activos que justifican la capacidad antioxidante tan alta que muestra, lo cual explica en parte algunas de las propiedades que se le atribuyen en la herbolaria Aguascalentense.
- Al inicio de la investigación, el ejemplar que se sembró en el jardín botánico de la universidad, se heló, por lo que se sembró en otros lugares, jardín del edificio 202 y varias macetas de donde se estuvo recolectando, por lo que la mayor parte del tiempo tuvimos como limitante la cantidad de hojas disponibles para su procesamiento, además del tiempo para una caracterización más amplia de la planta.
- Se puede observar que la molienda en mortero no es eficiente, ya que los tamaños de partícula obtenidos no son uniformes (varían desde menos de 5 micras, hasta 40 micras, ver figuras, 12, 12a y 12b), lo que podría mejorarse utilizando un molino de bolas o de otro tipo, lo que nos permitiría, además de obtener un tamaño de partícula más pequeño y uniforme, un mejor aprovechamiento en el extracto.
- Se estableció que el solvente de extracción a utilizar sería el etanol, ya que en las pruebas cromatográficas del extracto, obtenido con este solvente, se obtuvo una mayor cantidad de metabolitos secundarios (ver fig.11), así como la parte de la planta que muestra más metabolitos es la hoja (ver fig.11).
- Se obtuvo extractos a partir de hojas frescas, secadas al horno a 37°C, cocidas a 90 °C y liofilizadas, observando que, el extracto obtenido a partir de hojas liofilizadas es del que se puede obtener un producto con mayor capacidad antioxidante (ver tabla 1). Así como también se observó que el extracto diluido al

10%(ver tabla 2), muestra una muy buena capacidad antioxidante, por lo que se decidió utilizar esta dilución para las pruebas a realizar.

- Se comparó la capacidad antioxidante de extractos obtenidos de *Anredera cordifolia*, con muestras diluidas de antioxidantes estandarizados (trolox, quercetina, ácido gálico y ácido ascórbico), observándose que la capacidad antioxidante del extracto obtenido es bastante importante.
- Se determinaron los sólidos totales, encontrando que las hojas contienen un 92% de humedad y un 8% de sólidos. De estos últimos, el 11% corresponden al extracto etanólico (0.88gr, por cada 100gr de hoja fresca), obtenido de la molienda con mortero, lo cual se puede mejorar si se realiza la molienda con un molino de bolas u otro.
- Se evaluó la capacidad antioxidante de diferentes muestras traídas de: el municipio de El Llano (Palo Alto), Jesús María y la colonia Colinas del río, observándose que el extracto obtenido de la muestra de este último lugar mostró una mayor capacidad antioxidante (ver fig.11).
- Se realizó al extracto obtenido, pruebas preliminares para flavonoides, Triterpenos, cumarinas y taninos, considerando que algunos ejemplares de *Anredera*, han mostrado propiedades características de estos compuestos, confirmándose la presencia de los mismos en *Anredera cordifolia*, Sáenz, *et. al.*, 2002, aislaron esteroides y Triterpenos de la especie *Anredera leptostachys*.
- La prueba para cuantificar la capacidad antioxidante con DPPH se realizó, ya que este es uno de los efectos que se obtiene de los compuestos activos que presuntamente contiene esta planta, encontrándose una muy notable capacidad antioxidante, por lo que se utilizó, esta característica como referencia, para seleccionar los ejemplares que se utilizaron.
- El óxido nítrico es un compuesto presente en el funcionamiento del endotelio, así como en los procesos inflamatorios, por lo cual se decidió, medir la capacidad de barrido de óxido nítrico del extracto ya que, se ha mencionado que esta planta se utiliza como tratamiento en algunos procesos inflamatorios.

- La capacidad de donar electrones, es la que presentan algunos compuestos que actúan como antioxidantes, por lo cual se realizó la prueba para determinar el poder reductor del extracto de *Anredera cordifolia*.
- Dentro de los compuestos que tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, encontramos a los compuestos fenólicos, dentro de los que se encuentran los flavonoides, esta es la razón por la cual se midió fenoles totales y contenido de flavonoides.
- Las desviaciones estándar obtenidas en las diferentes determinaciones, presentan un rango bastante amplio, debido a que las muestras utilizadas fueron obtenidas de diferentes plantas y en diferentes tiempos y condiciones, cuya capacidad antioxidante fue la referencia para su elección. Esto no parece afectar los resultados en las pruebas de capacidad antiinflamatoria en el experimento de las ratas, lo que podría explicarse de dos formas; la dosis necesaria para inhibir el daño es menor a la aplicada y/o, existen otros metabolitos secundarios que no se han evaluado como se menciona en el artículo, "Ancordin, the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions", (Chuang, *et al.*, 2007). (Madera-vine, es otro nombre con el cual se conoce a *Anredera cordifolia*). Donde se menciona que se aisló una proteína a la que le nombraron "ancordina", que parece inhibir la producción de tripsina, además de tener efectos modulatorios en la producción de óxido nítrico.
- Al observar las fotografías donde se determinó tamaño de partícula, se puede observar que el extracto liofilizado forma una especie de película, esta especie de viscosidad se observa cuando se agrega agua a la muestra, este efecto parece ser el que no permite que el extracto se absorba totalmente cuando se inyecta vía intraperitoneal, aún así se observa un efecto antiinflamatorio, lo que podría suponer que la dosis necesaria de extracto de *Anredera cordifolia*, para inhibir el daño producido por el veneno de *Loxosceles apachea*, podría ser menor a la aplicada (100mg).

- En el estudio “carotenoides en quimiopreención: Licopeno” (Vitale, *et. al.*, 2010) se demostró que una mezcla de compuestos fenólicos rica en taninos condensados y no condensados mostró una supresión en la expresión de la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), *Anredera cordifolia*, resultó positiva en la prueba preliminar para taninos condensados, esto podría explicar parte del efecto antiinflamatorio de Juan mecate debido al contenido de taninos condensados que muestra.
- En los cortes histológicos de las ratas a las cuales se aplicó solamente el veneno de la araña *Loxosceles apachea*, se observa que: en el hígado hay una gran cantidad de células inflamatorias reclutadas, así como necrosis de hepatocitos, aunque no generalizada. En riñón, se observa desprendimiento de células a la luz de los túbulos. En el área donde se inoculó el veneno, se observa una gran cantidad de células inflamatorias.
- El extracto ha mostrado una disminución de la inflamación en el área de inoculación del veneno de la araña *Loxosceles apachea*, así como inhibición el daño observado en riñón y en hígado, se observa también disminución o inhibición del dolor generado en el área de la picadura, esto último se concluye por que las ratas que son tratadas con extracto de Juan mecate, no se lamen la pata donde se inocula el veneno, sin embargo, las ratas que fueron inoculadas solamente con el veneno, se pasaron casi todo el tiempo lamiéndose la pata, este patrón de comportamiento se ha tomado para la medición del dolor en otras pruebas como se menciona en el artículo “Efectos antinociceptivos de los tubérculos de *Anredera leptostachys*”, (Tornos et al, 1999), donde se compara el efecto analgésico del extracto de esta *Anredera* con morfina, resultando más eficaz que esta última, además de que al probarse en un estudio de efectos depresores del sistema nervioso central (relajación muscular e instinto de huida), resultó más eficaz que el diazepam, todo esto podría confirmar que esta característica (efecto antinociceptivo), es una característica de algunas especies de *Anredera*. En el estudio “Anti-inflammatory activity and acute toxicity of *Anredera leptostachys*”, de Sáenz, *et. al.*, 1998, se menciona el efecto antiinflamatorio (dosis dependiente) de la *Anredera leptostachys*, en la prueba de la carragenina y una baja toxicidad..

- Aún cuando podemos suponer que parte del veneno se degradó antes de inocularse, se puede comparar el efecto causado con y sin el tratamiento con extracto de *Anredera cordifolia* y puede confirmarse que el daño producido es inhibido con el extracto.



7. CONCLUSIONES.

- Los resultados obtenidos, confirman la razón del uso de Juan mecate (*Anredera cordifolia*) en la medicina tradicional en Aguascalientes, en otras partes del país y el mundo.
- El contenido de metabolitos secundarios, hasta ahora encontrados en esta planta, así como su gran capacidad antioxidante, nos permiten establecer que, además del uso en la medicina tradicional, podría considerarse un alimento funcional, ya que su sabor no es desagradable.
- Hasta ahora, el extracto de Juan mecate (*Anredera cordifolia*), parece inhibir el daño causado por la araña *Loxosceles apachea* en riñón e hígado, para la plena confirmación de su uso para casos delicados como este, es necesario realizar más experimentos, así como la determinación de la dosis y forma de aplicación más adecuada.

8. RECOMENDACIONES:

- Sería muy útil, la realización de más estudios para establecer cuál es el comportamiento de esta planta en la producción de metabolitos secundarios útiles en diferentes condiciones en que puede desarrollarse.
- Así como la determinación del contenido de la viscosidad que se forma cuando está en contacto con el agua y cuando se muele la hoja fresca, establecer así cual es la función de los compuestos que la forman en el efecto medicinal de la planta.
- Se considera que esta planta podría considerarse como un alimento funcional por las características que muestra, además de la ventaja que representa su fácil propagación y crecimiento.
- Para la curación de la mordedura de la araña *Loxosceles apachea* no existe anti veneno, solo sabremos si esta podría considerarse una buena opción generando más información.
- Es deseable seguir realizando estudios para confirmar el uso de esta planta en otros países como reguladora de azúcar en la sangre.

10. REFERENCIAS:

- Arango, A. G., 2010. Introducción al Metabolismo Secundario Compuestos Derivados del Ácido Shikimico. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>. 16pp.
- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145pp, ISSN: 1989-3620.
- Bafna, A.R. y Mishra, S. H. 2005. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ars Pharm* 46 (2): The M.S.University of Baroda, Vadodara, Gujarat, India. 125-138pp.
- Barba, J., 1997. Introducción al análisis de los productos naturales, laboratorio de fitoquímica, 1ª ed. Ediciones limusa. México D.F. 14-17. pp. Disponible online en <http://espartaco.azc.uam.mx/UAM/218311/218311.html>.
- Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C., 1997. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, D'épartement Science de l'Aliment, E.N.S.I.A., 1, France. Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* vol. 30, no. 6. 609–615pp.
- Bordés, G. R., Martínez, B.M., García, O., Guisado, B., R.,1994. Revisión bibliográfica. El proceso Inflamatorio. *Revista no.4. Universidad de Granada. Departamento de Enfermería y Fisioterapia. Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud.* <http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/index4.htm>.
- Bruneton, J., 2001. *Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales. Introducción.* Ed. Acribia S.A. Zaragoza España. 2da edición. 4pp.
- Cabrerizo, S, Docampo, P., Cari, C., Ortiz de Rozas, M., Díaz, M., de Roodt, A. y Curci, O. 2009. Loxoscelismo: epidemiología y clínica de una patología endémica en el país. *Archivos Argent Pediatr* ;vol.7 no.2 107(2):152-159pp. Scielo.

Calderón De Rzedowski, G. 1997. Familia Basellaceae. Flora del bajo y de regiones adyacentes. 59:1-11.

Calzada, F., Mata, R., Byes, R., Linares, E. 1998. "Retrochalcone From *Anredera Scandens*". Universidad Nacional Autónoma de México. Phytochemistry. Volume 29, Issue 8. Elsevier. 2737–2738.

Chuang, M.T., Lin, Y.S., Hou, W.C. 2007. Ancordin, the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions. Peptides 28. Traditional Herbal Medicine Research Center, Taipei Medical University Hospital, Taipei, Taiwan. Elsevier. 1311-1316pp.

Company, Ch. 2010. Enzima convertidora frente a quimasa mastocitaria en la infiltración leucocitaria inducida por angiotensina-I. Papel de fractalquina en la inflamación vascular causada por humo de tabaco. Tesis doctoral. València Spain. Universitat de València. 21-26pp.

De la Cerda, G. E., Jaramillo, J. F, Posadas del Río, F. y Acevedo, M, S. 2012. Manual de Diagnóstico y Tratamiento para Picaduras y Mordeduras de Arácnidos en el Estado de Aguascalientes. (en prensa). Departamento de Fisiología y Farmacología. Centro de Ciencias Básicas. Cuerpo académico de Toxicología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 57,58pp.

De la Serna, F. 2012. Insuficiencia cardiaca crónica. 3ª edición. Editorial Federación Argentina de Cardiología. Cap. 6, 105-106pp.

De Roodt, A., Salomón, O., Lloveras, S., Orduna, T. 2002. Envenenamiento por arañas del genero loxosceles. Medicina Vol.62. No.1. Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemoepidemias, Instituto Nacional de Producción de Biológicos; Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemoepidemias, ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán; Centro Municipal de Patología Regional Argentina y Medicina

Tropical (CEMPRA-MT), Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco J. Muñiz,.
Buenos Aires Argentina. 83-94pp. ISSN 0025-7680.

Domínguez, X. 1979, Métodos de Investigación Fitoquímica, 3a e. Ed. limusa, Primera
reimpresión. México D.F. 113 pp.

García, P., 2008. Inflamación. Universidad Complutense. Hospital General Universitario
Gregorio Marañón. España. pgbarreno@insde.es. Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.
Vol. 102, Nº. 1. 91-159.-102pp.

Grijalva, P.A., 2005. Flora útil etnobotánica de Nicaragua. 1a ed. Managua : MARENA,
290-57 pp. : il. ISBN : 99924-903-8-1.

Hijova, E., 2006. Bioavailability of chalcones. Minireview. Institute of experimental
medicine. Safarikiensis. University, Kosice, Slobvakia. Bratisl Lek Listy 107(3) 80-84pp.

Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2007. Inmunología de kuby, 6ª edición. Mc graw
hill.340pp.

Kuklinski, C. 2003. Farmacognosia. Primera reimpresión. Omega Barcelona. 149pp.

Laza, L. D., Rodríguez, L. I., y Sardiña, C. G. 2003. Descubrimiento y desarrollo de
agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. Artículo de Revisión. Rev
Cubana Plant Med. ;8 (3). Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. 1pp.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, MI., Nourshargh, S. 2007. Getting to the site of
inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* vol. 7.
University of Virginia, Charlottesville, Virginia USA. University of Verona, Verona, Italy.
University of Toronto, Toronto, Canada. Research Institute, London, e-mail:
klaus@liai.org. Nature Publishing Group. 678-689pp.

- Lock, O., Cabello, I., Doroteo, V., 2006. Práctica VI.6. Análisis de Flavonoides en Plantas. Pontificia Universidad Católica del Perú; Lima – Perú.
http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/index.html. 1-4pp
- Lozoya, X., 1998. La herbolaria en México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. 63pp.
- Martínez-García y Avendaño, 1996. Basellaceae. Flora de Veracruz. 90. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa, Ver. , University of California, Riverside, CA. Xalapa Veracruz, México.9pp.
- Meiri, O., Trevisan-Silva, D., Chaves-Moreira, D., Wille, A., Pereira F., V., Hitomi Matsubara, F., Mangili, O., Bertoni da Silveira, R., Gremski, L., Gremski, W., Senff-Ribeiro, A. and Sanches, S. 2011. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. *Toxins*. 3. 309-344. www.mdpi.com/journal/toxins.
- Moura, R. M., Elesbão, A. R., Sousa de Brito, E., Maia de Moraes, S, de Goes, S. C., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2007. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico on line 127. 1era edición online. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. 1-4pp.
http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Ct_127.pdf
- Moura-Letts, G. F., Villegas, L., Marçalo, A., Vaisberg, A. J., Hammond, G. B. , 2006. In Vivo Wound-Healing Activity of Oleanolic Acid Derived from the Acid Hydrolysis of *Anredera diffusa*. *J. Nat. Prod.*, 69- 978–979pp.
- Muñeton, P. 2009. "Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Revista digital universitaria. vol 10. No.9.
<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>. ISSN: 1607-6079).
- OMS (WHO, 2001). World Health Organization. Legal Status of Traditional Medicine and Complementary/Alternative Medicine: A Worldwide Review. 1-2pp.

Panyaphu, K., Van On, T., Sirisa-Ard, P., Srisa-Nga, P., Chansakaow, S., Nathakarnkitkul, S. 2011. Medicinal plants of the Mien (Yao) in Northern Thailand and their potential value in the primary healthcare of postpartum women. *Journal of Ethnopharmacology* 135 - 226–237pp. Elsevier.

Ramos, I. M., Batista, G. C., Gómez, M. B., Zamora, P. A., 2006. Diabetes, Estrés Oxidativo y antioxidantes. Artículo de revisión. Centro de Investigación Biomédica de Occidente. Guadalajara Jalisco México. *Medigrafics Artemisa*. Vol. VIII • Número 1. 7-15, 7-15pp.

Ríos, G., 2010. Política y sociedad by suite 101. Códice Amate Cehuatl Xihuitl Pitli. La herbolaria mexicana. <http://suite101.net/article/codice-amate-cehuatl-xihuitl-pitli-a11539#axzz2Jnv3rHEg>.

Rodríguez F. O., Torrez, C. E., Valenzuela, B. A. 2005. Trabajo de Diploma para optar al título profesional de Técnico Superior Agropecuario: Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural El Tisey, Estelí. Managua, Nicaragua. Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco. 35pp.

Saénez, M.T., García, M.D., Fernández, M.A., 1998. Anti-inflammatory activity and acute toxicity of *Anredera leptostachys*. Laboratorio de Farmacognosia y Farmacodinamia, Departamento Farmacología, Facultad de Farmacia, Sevilla, Spain. *Phytomedicine*. 5(3):195-198.

Sáenz, R., Tornos, M., García G., Fernández, A., 2002. Esteroles y Triterpenos Aislados de los Tubérculos de *Anredera Leptostachys* (Moq.) Steenis. Universidad de Sevilla España. IV International Workshop Natural Products Chemistry. International Workshop Natural Products Chemistry. Núm. 4. Universidad de la Habana. 11pp.

Scai. <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>. Unidad de Espectrometría de Masas. Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación.

scidev.net (<http://www.scidev.net/es/news/oms-crea-base-de-datos-mundial-de-remedios-tradicionales.html>)

Springer, T.A. (1995). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Annu. Rev. Physiol.* Harvard Medical School Boston, Massachusetts. 827-972pp.

Sullivan, W., Lee, D., Ross, G., DiVietro, A., Lappas, M., Lawrence, B. 2004. Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* Vol. 75. 127-134pp.

The Merck index. 1983. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.

Tornos, M. P., Sáenz, M. T., García, M. D., and Fernández, M. A. 1999. Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. Universidad de Sevilla, Seville, Spain. *J Ethnopharmacol.* 68(1-3):229-234pp.

Tshikalange, T.E., Meyer, J.J.M., Hussein, A.A. 2004. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. Department of Botany, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa. *J Ethnopharmacol.* 96 (2005) 515–519pp.

Vitale, A., Bernatene, E., Pomilio, A. 2010. Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. Carotenoids in chemoprevention: Lycopene. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* Incorporada al Chemical Abstract Service. Código bibliográfico: ABCLDL. 44 (2): 195-238.

Wagner, H. y Bladt, S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Second edition. Springer. 134, 135,, 212, 213, 318, 319pp.

Waterhouse, A., 2005. Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine. Department of Viticulture & Enology University of California, Davis. <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine>.

