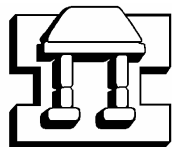




UNAM



IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA

**“Actividad espasmolítica del extracto
acuoso y fracciones obtenidas por
cromatografía en columna de *Alternanthera
repens* (L.) Kuntze”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA
DELFA BENAVIDES CATALÁN
ASESORA: M. en C. MARIA EUGENIA GARÍN
AGUILAR**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
VOCAL	M. en C. MARIA EUGENIA GARIN AGUILAR
SECRETARIO	Dra. BEATRIZ VAZQUEZ CRUZ
SUPLENTE	M en C LEONOR ANA MARIA ABUNDIZ BONILLA
SUPLENTE	M. en C. DAVID SEGURA COBOS

AGRADECIMIENTOS

A la **M. en C. María Eugenia Garín Aguilar** por su amistad, motivación, comprensión, paciencia y su apoyo en la realización de este trabajo.

A él **M. en C. David Segura Cobos** por su apoyo en el laboratorio, por su amistad y cooperación en la realización de este trabajo.

A él **Dr. Gustavo Valencia de el Toro** por su cooperación en la revisión de este trabajo, su amistad y sus observaciones realizadas en la presente tesis.

A la **Dra. Beatriz Vázquez Cruz** por su amistad, cooperación y observaciones realizadas en la presente tesis.

A la **M. en C. Leonor Ana María Abundiz Bonilla** por su amistad, cooperación y observaciones realizadas en la presente tesis.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio 514, Sandra, Lizzy, Magali, Viviana, Araceli, Rocío por su comprensión, apoyo y amistad en la realización de este trabajo.

A todas las personas que de manera directa o indirecta participaron en este trabajo. **Muchas Gracias.**

DEDICATORIA

- ❖ A mis padres **Aristeo Benavides Jacinto y Silvia Catalán López** quienes me alentaron con cariño a lo largo de mi carrera, brindándome siempre su apoyo moral y económico. Mi eterno agradecimiento.
- ❖ A mis hermanos **Maryli y Alejandro** por su amor y amistad incondicional, y su apoyo durante mi carrera, por estar conmigo en las buenas y en las malas e impulsarme a seguir adelante.
- ❖ A mi tía **Josefina** y su pequeña hija **Paola** por su amor consejos y apoyo incondicional durante mi carrera.
- ❖ A mis tías **Gabriela, Fidelina Rosario** y su pequeña hija **Jaretzi** por su apoyo, sus consejos y motivación.
- ❖ A mis **abuelitos** por darme su amor, cariño y comprensión durante mi estancia en Guerrero.
- ❖ A la memoria de mi tía **Yolanda** quien siempre me alentando para seguir estudiando donde quiera que estés gracias.
- ❖ A mis mejores amigas **Viviana y Rocío**, por compartir conmigo sus alegrías y tristezas, por su amistad y su cariño por nunca dejar que los problemas me derribaran, por levantarme el ánimo. Por todo lo que vivimos juntas y nunca olvidaremos. Gracias.
- ❖ A mis tíos y primos por su apoyo y motivación

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
RESUMEN.....	II
1.-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Participación del calcio en el tejido muscular.....	2
1.2 Plantas Medicinales.....	4
2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	7
2.1. Sinonimias.....	7
2.2. Nombres comunes.....	7
2.3. Botánica y ecología.....	7
2.4. Etnobotánica y Antropología.....	9
2.5. Fitoquímica.....	11
3.- ANTECEDENTES.....	12
4.- OBJETIVO GENERAL.....	15
4.1. Objetivos particulares.....	15
5.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
5.1. Colecta.....	18
5.2. Preparación del extracto acuoso y fracciones.....	19
5.3. Bioensayo.....	24
6.- RESULTADOS.....	28
7.- DISCUSIÓN.....	43
7.1 Resumen de Discusión.....	49
8.- CONCLUSION.....	49
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

10.- GLOSARIO.....	55
--------------------	----

1.- INTRODUCCIÓN

La diarrea, es un síntoma de un trastorno cuya gravedad depende de la causa que lo origine. La diarrea se caracteriza por la evacuación frecuente de heces acuosas, lo que provoca una escasa absorción de agua y nutrientes. Puede ir o no acompañada de dolor, debilidad, náuseas, vómitos, espasmos abdominales (retortijones), fiebre o pérdida de apetito. El índice de mortalidad por diarrea y otras enfermedades gastrointestinales para 1994 fue de 10,082, la cifra se incrementó en 1998 a 41,726 defunciones (Anuario estadístico, 1999), para 1999 la cifra fue de 5,622 defunciones (Anuario estadístico, 2000) y para el 2001 la cifra fue de 1,695 defunciones (Anuario estadístico 2002). La diarrea puede ser aguda o crónica.

Aguda.- Aparición repentina, suele durar uno o dos días, lo mismo con tratamiento que sin él.

Crónica.- La diarrea puede estar presente durante largo tiempo, alternándose con períodos de estreñimiento. La primera causa de la diarrea crónica es un tumor en el canal intestinal, especialmente en el caso de cáncer de intestino grueso. Otras causas de diarrea crónica son de carácter infeccioso como la colitis úlceroosa y la enfermedad de Crohn (Espiga, 2004)). Existen diversos tratamientos como los opiáceos y sus derivados (codeína, difenoxilato y loperamida) son los fármacos más eficaces como agentes antidiarreicos, por lo que son considerados de primera línea. Su principal mecanismo de acción es reducir la actividad propulsiva del intestino. Otros fármacos que

pueden mejorar los síntomas son los agentes formadores de bolo fecal, tales como la metilcelulosa. Un antidiarreico no opiáceo, el subsalicilato de bismuto, cuyo mecanismo de acción se desconoce, puede resultar útil en las diarreas leves. Las resinas de intercambio iónico como la colestiramina, son eficaces en la diarrea relacionada con las sales biliares (tras resección ileal en una enfermedad de Crohn.). Otros fármacos que han sido utilizados en la diarrea crónica severa refractaria al tratamiento habitual son los análogos de la somatoestatina, como el octreótido, los antagonistas de los canales del calcio y la clonidina, que deben ser considerados fármacos de segunda línea. Algunos otros como los antiespasmódicos, que producen la reducción de la contracción muscular y la disminución del dolor asociado (Espiga, 2004).

1.1.- PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EN EL TEJIDO MUSCULAR

El músculo liso contiene filamentos de actina y miosina de características químicas similares a las del músculo esquelético. No contienen el complejo de troponina normal necesario para el control de la contracción del músculo esquelético, de forma que el mecanismo de control de la contracción es diferente (Guyton, et. al, 1998). No obstante, al igual que en el músculo esquelético la contracción del músculo liso es regulada por el calcio (Harper, et. al, 1992).

La contracción del tejido muscular liso es una respuesta al aumento de la concentración del Ca^{2+} intracelular. La célula modula esta concentración regulando el flujo del calcio a través de los canales de calcio que se localizan en la superficie de la membrana plasmática. El incremento del Ca^{2+} en el citosol puede de manera secundaria, movilizar el calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico y en las mitocondrias (Méndez, 2000). La liberación de calcio almacenado en los depósitos intracelulares ocurre además por la acción del propio calcio al aumentar en el citosol, a este proceso se le denomina “ Ca^{2+} induce la salida Ca^{2+} ” (Méndez, 2000). El citoplasma es el compartimiento en la célula donde se encuentran la mayoría de las enzimas sensibles al calcio y que son encargadas de regular la interacción del calcio con las proteínas contráctiles. La unión del calcio con la calmodulina forma un complejo Ca^{2+} - calmodulina el cual activa la cinasa de la cadena ligera de la miosina, produce la fosforilación de la serina en la cadena ligera de la miosina, la que en su forma fosforilada activa a la ATPasa de la actina-miosina y el músculo se contrae (Tortora, et.al, 1989). En la figura1 se muestra el esquema general de la contracción del músculo liso.

CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO

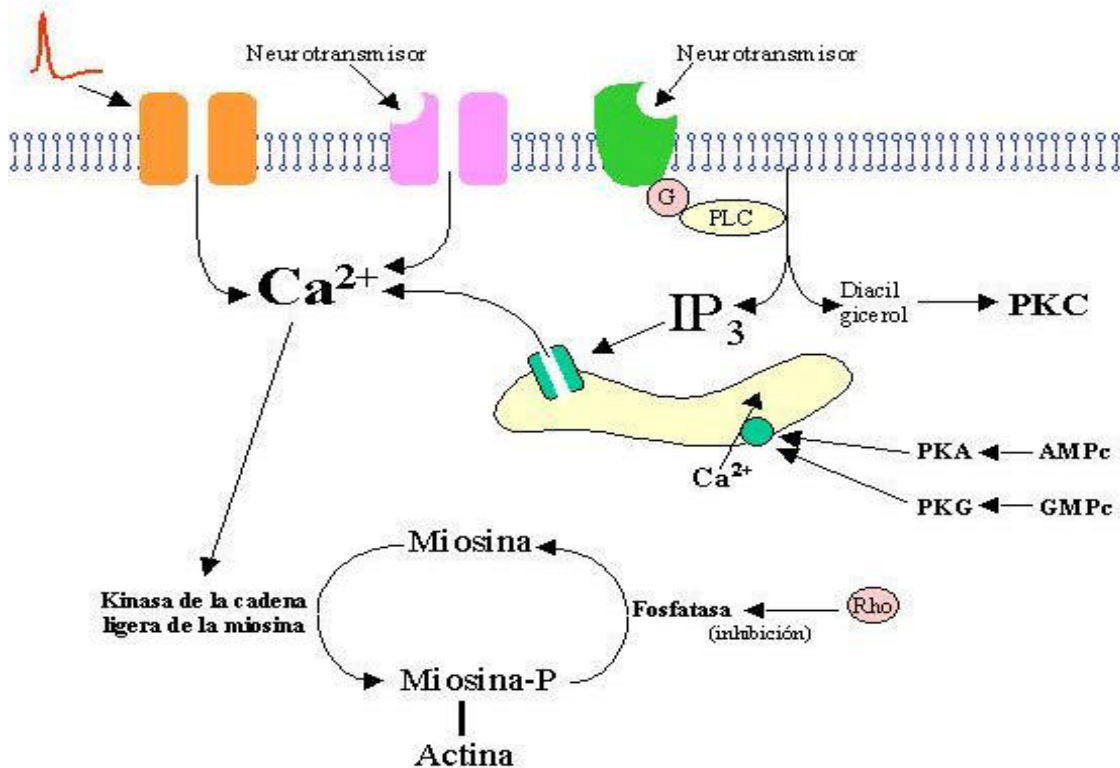


Fig. 1 Esquema general de la contracción del músculo liso tomado de www.uam.es

Los avances logrados en el conocimiento de los mecanismos que median la acción antagonista de canales de calcio como una alternativa para contrarrestar la diarrea, los espasmos, dolor de estomago entre otros y la posibilidad contar con fármacos más selectivos, ha propiciado el interés por encontrar otros compuestos con estas propiedades y la herbolaria puede ser una fuente que proporcione nuevas moléculas (Méndez, 2000).

1.2.- PLANTAS MEDICINALES

México es un país de gran diversidad florística. Su población a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de esos

recursos de la naturaleza para su beneficio y sistematizarlos atendiendo a la utilidad que le proporcionan; así encontramos plantas de orden alimenticio como forrajero, ornamental o medicinal. Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional popular mexicana, y han representado desde siempre una alternativa como recursos para la salud (Aguilar y Camacho, 1994).

La medicina tradicional popular ocupa un lugar en la realidad médica del país. Mientras la medicina alópata cubre el 40% de los servicios de salud, cerca de 20 millones de habitantes recurre a las plantas medicinales o a otros recursos de la medicina tradicional popular para poder curarse. Gran parte de la medicina tradicional es rescatable y puede ser un importante campo para implementar nuevos planes de salud que combinen el conocimiento popular con el conocimiento científico (Tascón, 1997).

Datos estadísticos del programa del IMSS-COPLAMAR (posteriormente IMSS-SOLIDARIDAD) señalan que existen 1300 curanderos. De esta encuesta se desprende que en el territorio nacional hay especialistas de la medicina tradicional como yerberos, hueseros, parteras, sobadores, entre otros (Aguilar, 1994).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de los habitantes del planeta recurren principalmente a remedios tradicionales. Esta afirmación se había dicho ya en los años setenta. En aquella época la OMS sugería que esta tendencia podría invertirse en el año 2000

a fin de que para ese entonces el 80% de la población pudiera tener acceso a la atención primaria de salud en dispensario y que sólo la quinta parte de la población fuera tratada con la medicina tradicional. A partir de esa sugerencia se comienza a replantear la investigación científica de la herbolaria utilizada por la población mexicana (Aguilar, 1994).

Entre los padecimientos que frecuentemente la población atiende con plantas medicinales se encuentran los desórdenes gastrointestinales; estas enfermedades son causa de un alto índice de mortalidad en nuestro país, siendo la diarrea como se menciono anteriormente, la principal causa de muerte especialmente en la población infantil (Zavala et al., 1998).

Diversas son las plantas que la población emplea para tratar enfermedades gastrointestinales entre las que se encuentran la hierbabuena (*M. spicata*), la manzanilla (*M. chamomilla*), el epazote (*Ch. ambrosioides*) y estafiate (*A. judaica*) que además la han utilizado como antagonista de calcio entre otras. En la literatura también se destaca el papel de *Alternanthera repens* por su efecto antidiarreico. Esta planta se recomienda para el tratamiento de padecimientos digestivos como diarrea, dolor de estómago e inflamación intestinal. Debido a la gran incidencia de estas enfermedades *A. repens* es una, de las tantas plantas consideradas, como alternativa real que la población utiliza para afrontarlas (Calderón, 1998).

2.- DESCRIPCIÓN BOTÁNICA *Alternanthera repens* (L.) Kuntze (Tianguis).

2.1- Sinonimias.-

Alternanthera caracasana HBK

Achyranthes repens L.

Alternanthera pungens HBK

Alternanthera repens (L.)Kuntze

2.2- Nombres comunes.-

Estado de México: verdolaga cimarrona, verdolaga de puerco, tianguis, tianguispeptla, tianquizpepetla (Calderón, 1998).

Michoacán: nxiga Otomí), tianquispeptla, Tumina, tianguis.

Puebla: Tianguistumina, Tianguispeptla, tlalpetate, verdolaga cimarrona.

Veracruz: Verdolaga de puerco, Tianguispeptla.

Hidalgo: Tianguis, Tianguispepetla (Calderón, 1998).

Distrito Federal: Tianguis, Tianguispepetla (Calderón, 1998).

2.3- Botánica y Ecología

Hierba rastrera, con tallos ramificados parece alfombra. Con hojas más largas que anchas de color verde oscuro. Las flores están en cabezuelas de color blanquecino, parecen estrellitas que están colocadas entre las hojas (Carvajal, 1990). Pertenece a la familia de las Amarantáceas (Ver figura 2).



Fig. 2 *Alternanthera repens* (L.) Kuntze (James, 2004)

Originaria de América tropical y subtropical, se encuentra en climas cálidos, semicálidos y templados desde el nivel del mar hasta los 2700m, asociados a terrenos de cultivo, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosques espinosos, matorral y xerófilo, bosques mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino-encino (Argueta et al,1994). La distribución de esta planta es amplia y se encuentra desde el sureste de los Estados Unidos hasta Argentina. Se ha reportado que se encuentra en el sur de Europa (Rzedowski y Rzedowski, 1990). En la República Mexicana esta ampliamente distribuida, algunos de los estados donde se ha encontrado son Puebla, Michoacán, Veracruz, Hidalgo, Distrito Federal, Yucatán, Durango, San Luis Potosí, Estado de México, Chiapas,

Guanajuato, Querétaro, Baja California sur, Coahuila, Chihuahua, Jalisco, Nayarit, Nuevo León (Ver figura 3).



Fig. 3 En el mapa se muestra la distribución de *Alternanthera repens* (L.) Kuntze en México. En los estados en crema se ha reportado la presencia de *A.repens* tomado de www.sre.gov.mx

2.4- Etnobotánica y Antropología

Aunque se menciona que las fiebres o calenturas son los principales padecimientos para los que se usa esta planta, también es de gran importancia en malestares digestivos, dolor de estómago, estreñimiento, empacho, infección

intestinal, cólicos, vesícula sucia, diarrea, contra parásitos entre otras (Argueta et al, 1994). Se menciona que en caso de tifoidea, se hierve la raíz en suficiente agua, posteriormente se le agrega limón y se da un lavado, usando medio litro para los niños y un litro para los adultos. Se reporta también como purgante (Argueta et al, 1994). El uso del cocimiento de los tallos y las flores de la planta, en proporción de 5 a 7g en 100 ml de agua para tomar cada 3 horas, provoca en enfermos con fiebre una disminución de ésta, acompañada de sudoración abundante, y aumentando la cantidad de orina, pudiéndose considerar como diaforético y diurético. Se menciona que tiene cierta acción tónica sobre el corazón, aumentando la energía de las contracciones, lo que resulta muy útil en los estados de infección, impidiendo la astenia cardiaca, común en estos casos por lo que su empleo es como antitérmico, tónico y diurético (Cabrera, 1981).

Esta planta era utilizada por los antiguos mexicanos con el nombre de “tianguiz” en las enfermedades acompañadas de fiebre, especialmente en el tabardillo o tifo exantemático (Cabrera, 1981). Era usada además, en forma de agua o jugo para estomatitis, úlceras de la boca, fiebre, tifo, como diurético y astringente (Flores y Troncoso, 1982). El tianguis kijoso es utilizado por los grupos mixe, zapoteca y totonacas para la curación del empacho y la disentería. También puede emplearse en enfermedades como sarampión, viruela o escarlatina, para dolor de riñones, tifo, alferecía (enfermedad infantil de carácter convulsivo), mal de ojo y como antiespasmódico (Argueta et al, 1994). Otros estudios como el de Calderón (1998) establecen que el uso de la planta es vigente en poblaciones del Estado de México y Michoacán principalmente para padecimientos

gastrointestinales. En recientes estudios han utilizado esta planta como antiprotozoaria siendo efectiva contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Tapia- Pérez et al., 2003).

2.5- Fitoquímica

La planta contiene una corta cantidad de resina blanda de sabor ligeramente amargo y desagradable, materia extractiva, clorofila, nitratos y oxalatos de potasio y sodio y un glucósido, que no ha sido aislado, y que parece ser el elemento más activo de la planta (Martínez, 1992). Se han aislado Triterpenos y saponinas de *A. repens* (Sonoko et al, 1999).

3.-ANTECEDENTES

Hernández en 1996 reportó que el extracto metanólico de *A. repens* presentó actividad antidiarreica dependiente de la dosis en el intervalo 12.5 a 50 g/Kg. El extracto metanólico presentó un efecto inhibitorio sobre la peristalsis del intestino de ratas Wistar disminuyendo el tránsito intestinal.

Zavala y colaboradores (1998) realizaron un estudio en donde el extracto metanólico de *A. repens* presentó actividad antidiarreica en ratas macho Wistar, de igual forma trabajaron con peristalsis. El extracto metanólico presentó una inhibición del transporte intestinal de ratas Wistar.

Evaluando el efecto antimicrobiano de *Alternanthera repens* Calderón en 1998 realizó pruebas microbiológicas con bacterias asociadas a gastroenteritis además, al realizar el análisis químico preliminar de la planta detecta la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, fenoles y azúcares, en los tres extractos analizados (acuoso, etanólico y metanólico).

Canales en el 2000 realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de *Alternanthera caracasana* HBK así como la elucidación de la estructura química del compuesto responsable de esta actividad. Obtuvo 5 extractos (con hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol) de 7 Kg de planta seca. Con el método de Kirby-Bauer evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de esta planta sobre 14 cepas de bacterias y una de hongo. El extracto de acetato de etilo presentó mayor actividad, este extracto se fraccionó utilizando cromatografía en

columna, en placa fina, y en placa preparativa, con lo cual se purificó el compuesto y mediante estudios espectroscópicos y espectrometría de masas, se elucidó la estructura química de la sustancia responsable de la actividad antimicrobiana la cual correspondió a la 7-metoxi-cumarina.

En el laboratorio ^aGarín-Aguilar y col. (2001) realizaron estudio sobre la reducción de la fuerza de contracción del íleon de rata y el efecto antimicrobiano de extractos de *Alternanthera repens*. Los resultados mostraron que el extracto hexánico produjo halos de inhibición y el extracto acuoso redujo en un 80% la fuerza de contracción del íleon sin afectarla frecuencia de las contracciones y que este efecto es dependiente de la dosis.

En el laboratorio, ^bGarín-Aguilar y col. (2001) realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana y espasmolítica de extractos de *Alternanthera repens* (L.) Kuntze. Los resultados de actividad antibacteriana indicaron que el extracto hexánico de hojas de *Alternanthera repens* fue efectivo contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella boydii*. Por otro lado, empleando una preparación para órgano aislado, mostraron el efecto espasmolítico del extracto acuoso de hojas de *Alternanthera repens* sobre cortes de íleon aislado de rata. Este extracto (1.77 mg/ml) relajó el intestino pre-contraído con acetilcolina 5 μ M y con KCl 50 mM. Los datos sugieren que el extracto acuoso de las hojas de esta planta se comporta como un antagonista colinérgico, y que posiblemente bloquea la entrada de calcio. Así, los autores sugieren que el o los principios activos de la planta responsables de la actividad antimicrobiana son de

naturaleza no polar, mientras que los responsables de la actividad espasmolítica son de naturaleza polar. Sin embargo es necesario conocer los mecanismos por los cuales es posible se contraiga el músculo liso, así, esta investigación se diseñó con la finalidad de evaluar el efecto de los extractos, y fracciones de las hojas de *A. repens* sobre el transporte de calcio y sobre la acción contráctil de serotonina con el fin de conocer si el efecto anticolinérgico es específico o no por tal motivo en este estudio se plantearon los siguientes objetivos.

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antiespasmódico del extracto acuoso y de las fracciones obtenidas de la planta *Alternanthera repens* en preparaciones *in vitro*.

4.1- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto que producen los extractos acuoso, hexánico y metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con cloruro de potasio.
- Evaluar el efecto que producen los extractos acuoso, hexánico y metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con cloruro de calcio.
- Evaluar el efecto que producen los extractos acuoso, hexánico y metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con serotonina.
- Evaluar el efecto que producen las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con cloruro de potasio.
- Evaluar el efecto que producen las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con cloruro de calcio.

➤ Evaluar el efecto que producen las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *Alternanthera repens* sobre la contracción del íleon de rata aislado inducida con serotonina.

5.- MATERIAL Y METODO

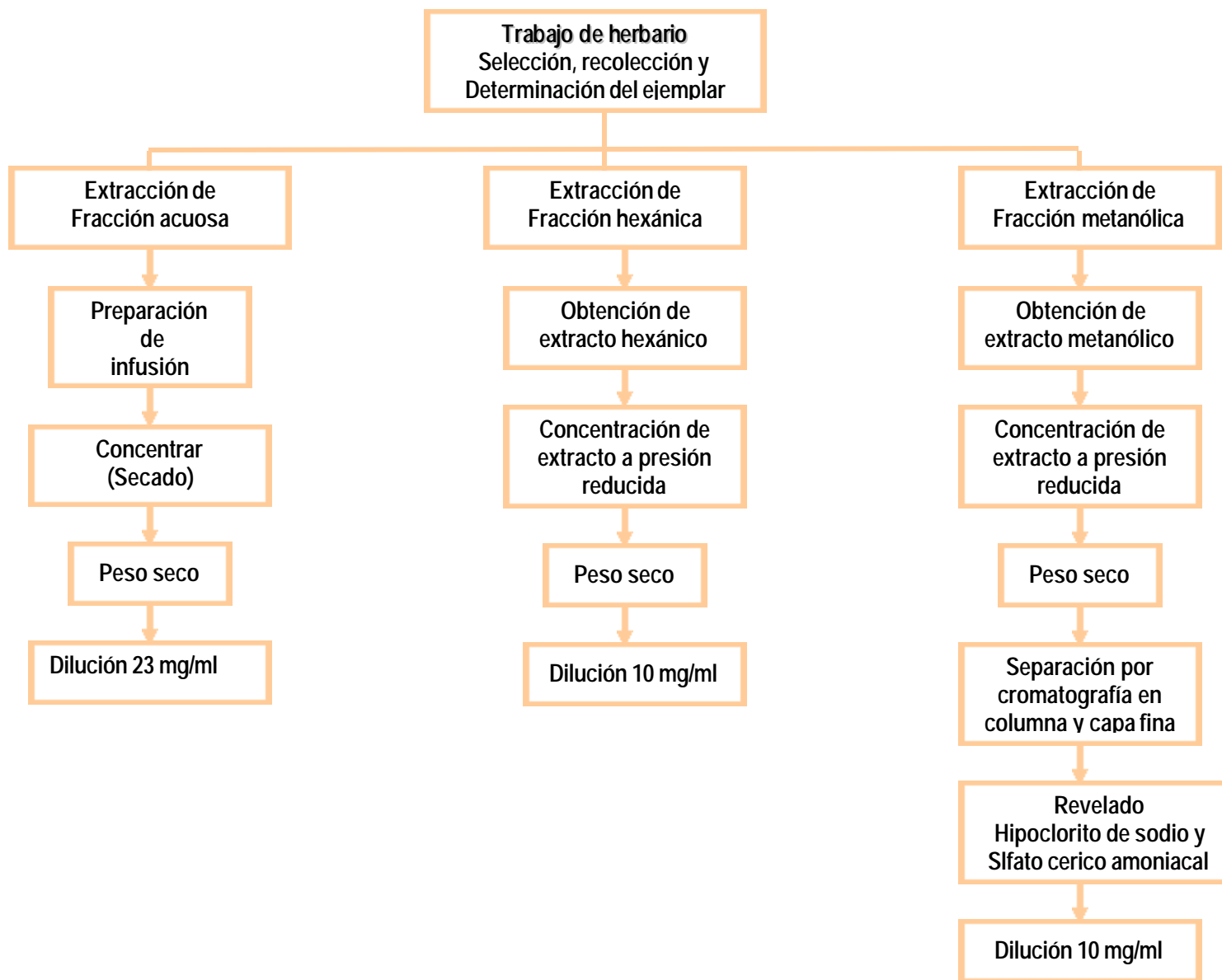


Fig. 4 Diagrama de metodología Fase 1

5.1- COLECTA

La recolección de la planta se llevó a cabo de junio de 2003- septiembre de 2003 en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES Iztacala). Se seleccionaron tres sitios de colecta y en cada uno se realizaron tres muestreos: (Kiosko de la UIICSE, alrededor de las Canchas de basket ball y Pista de Atletismos). En la figura 5 se muestra un mapa donde se indican los sitios de colecta. Colectados los ejemplares se prensaron y secaron para proceder a su determinación taxonómica misma que se realizó en el Herbario MEXU del Instituto de Biología de la UNAM por la especialista en Amarantáceas, Dra. Hilda Flores Olvera.

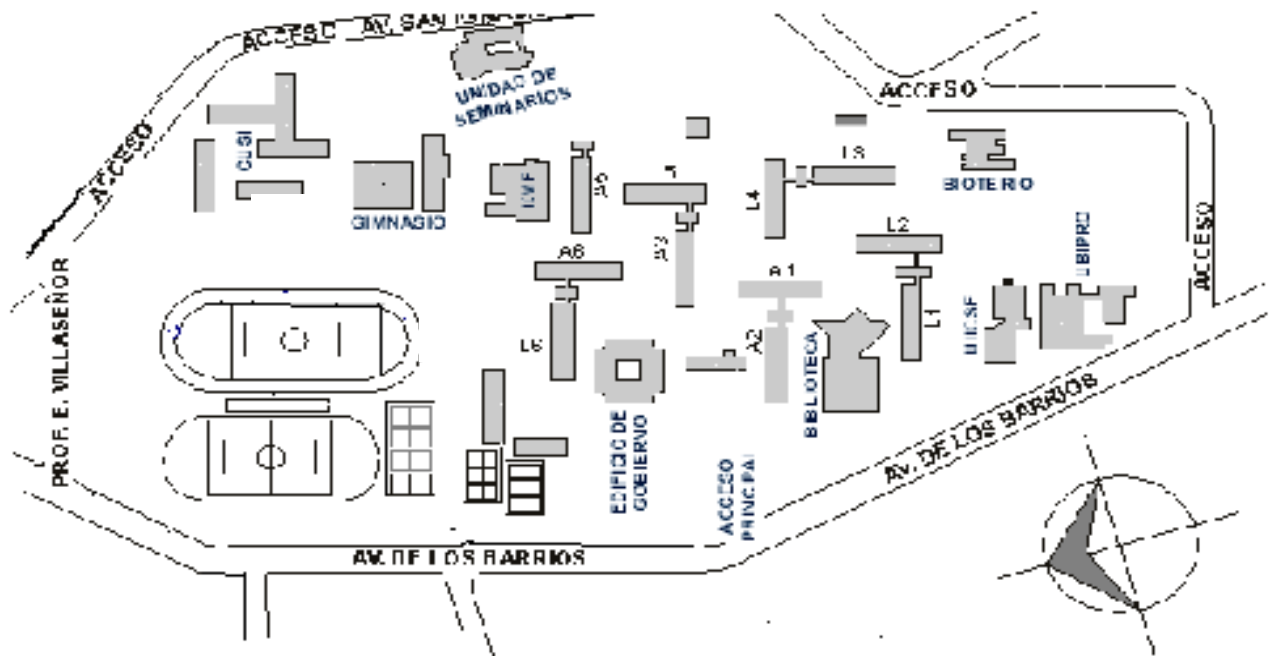


Fig.5 En el mapa se muestran los puntos de colecta en la FES Iztacala tomado de biologia.iztacala.unam.mx

Los ejemplares fueron depositados en el Herbario MEXU quedando registrados con el número **11256** y en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala quedando registrados con el número **849**.

5.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSO, HEXÁNICO, METANÓLICO Y FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DEL EXTRACTO METANÓLICO.

EXTRACTO ACUOSO.- Se pesaron 5 g de hojas secas de *A. repens*, se pulverizaron y suspendieron en 100 ml de agua destilada, posteriormente se colocaron en una parrilla previamente calentada, se puso por 15 minutos a ebullición, se dejó enfriar a temperatura ambiente y filtró con papel Watman #1, el sobrenadante se colocó en un vaso de precipitado de 500 ml y se dejó secar en un horno a 60° C , por 24h posteriormente se obtuvo el extracto seco, se suspendió con solución salina isotónica 0.9%. Se determinó el pH y se ajustó a 7.4.

EXTRACTO HEXÁNICO.- Se pesaron 50 g de hojas secas de *A. repens* y se colocaron en un frasco con hexano cubriendo perfectamente las hojas y se dejó por 48 h evitando la luz directa del sol a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se filtró con papel Watman #1, el sobrenadante obtenido se concentró a presión reducida pasándolo por el rotavapor a temperatura del baño maría y se dejó en frascos rotulados a temperatura ambiente evitando la luz solar.

Posteriormente se obtuvo el extracto seco se tomo 1g para elucidar alguno de los compuestos presentes en el extracto crudo mediante determinación espectrométrica en el ultravioleta y otra parte se resuspendió. Se determino el pH y se ajusto a 7.4

EXTRACTO METANÓLICO.- La hoja desengrasada se colocó posteriormente en metanol por 48 h a temperatura ambiente, después de ese tiempo se filtró con papel Watman #1, el sobrenadante obtenido se concentró a presión reducida pasándolo por el rotavapor a temperatura del baño maría y se dejó en frascos a temperatura ambiente evitando la luz solar. Posteriormente se obtuvo el extracto seco; se tomo 1g para elucidar alguno de los compuestos presentes en el extracto crudo mediante determinación espectrométrica en el ultravioleta y otra parte se resuspendió con solución salina isotónica 0.9%. Se determino el pH y se ajusto a 7.4.

OBTENCIÓN DE FRACCIONES.- Se pesaron 50 g de hojas secas de *A. repens* se colocaron en frascos con hexano para obtener la parte no polar de las hojas y se tapó dejándolos por 48 h a temperatura ambiente, después de ese tiempo se filtró con papel Watman #1, el sobrenadante obtenido se concentró a presión reducida pasándolo por el rotavapor a temperatura del baño maría y se dejó en frascos a temperatura ambiente evitando la luz solar. La hoja desengrasada fue puesta posteriormente en metanol por 48 h a temperatura ambiente, después de ese tiempo se filtró con papel Watman #1, el sobrenadante obtenido se concentró a presión reducida pasándolo por el rotavapor a temperatura del baño maría y se

dejó en frascos rotulados a temperatura ambiente evitando la luz solar. Se obtuvo el peso seco y se tomó parte del extracto crudo 0.02 g posteriormente se resuspendió con metanol y se colocó en la columna y obtener así las fracciones. Se tomó 0.02 g de cada fracción obtenida y se probó en el tejido.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.- Se realizó una resolución de los componentes de cada concentración empleando cromatofolios de sílica gel Merck (kieselgel 60-5553) de 5 X 3 cm utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano: metanol (8: 2 %). Las placas se revelaron con hipoclorito de sodio al 30% y sulfato cérico amoniacal para marcar diferentes compuestos (figura 5).

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.- El primer paso fue poner como fondo aproximadamente unos 20 cm de sílica gel de malla 60-230 (Sigma 5-2509) disuelta en diclorometano, para posteriormente colocar el extracto metanólico y por último colocar nuevamente sílica. Para que fueran arrastrados los solutos se utilizó como disolventes diferentes concentraciones de diclorometano: metanol desde la 100% diclorometano (fracción A) hasta la 70: 30 % diclorometano: metanol (fracción F). Ya que se tuvieron todas las concentraciones se realizó una resolución de los componentes de cada concentración empleando cromatofolios de sílica gel de 5 X 3 cm utilizando como eluyente una mezcla de diclorometano: metanol (8: 2). Después de que el eluyente ascendió se sacó la placa de la cámara cromatográfica dejando que se secase para posteriormente pasar las placas a una lámpara ultravioleta donde se observaban manchas de compuestos presentes que fueron marcadas, para después ser reveladas con hipoclorito de

sodio al 30% y sulfato cérico amoniacal para marcar diferentes compuestos (figura 6).



Fig. 6 Cromatografía en columna y placa fina

Peristalsis y Mecanismo de acción

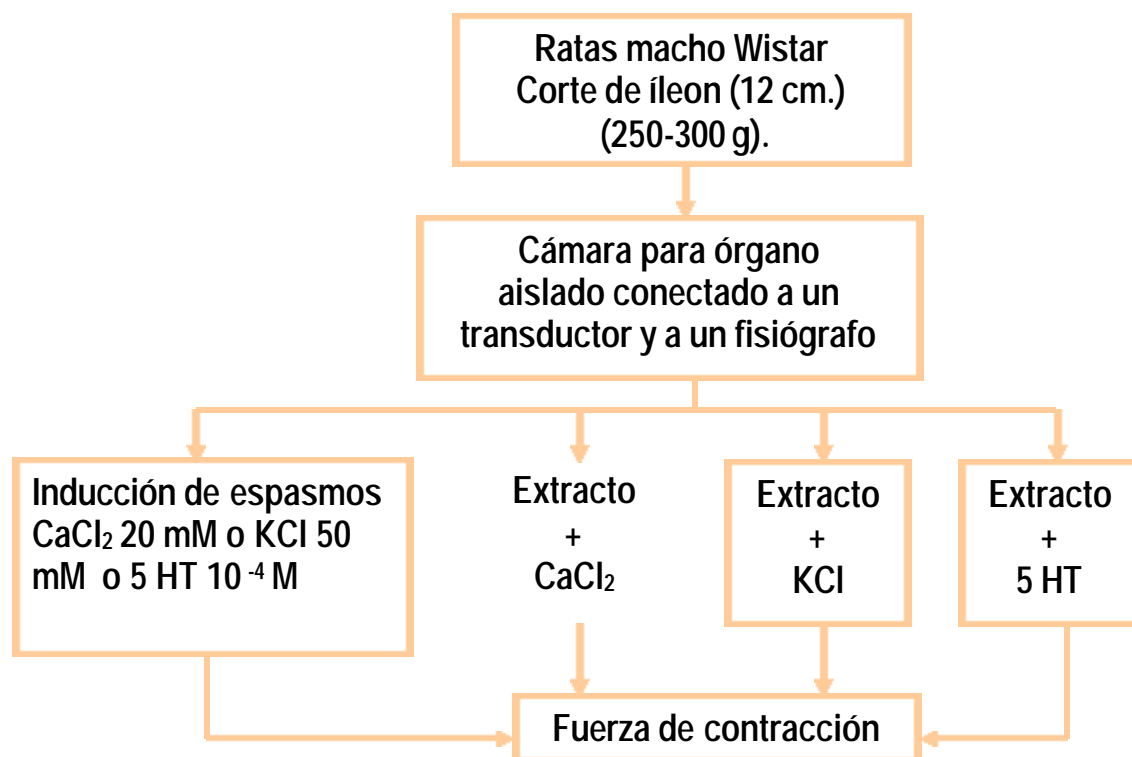


Fig. 7 Diagrama de la metodología Fase 2

5.3. BIOENSAYO

Animales.- Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 250-300 gramos, que fueron proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Donde se mantuvieron en condiciones ambientales con agua y alimento ad libitum.

Preparación *in vitro*.- El modelo biológico se diseñó de acuerdo a las técnicas tradicionales descritas para registrar *in vitro* cambios peristálticos producidos por fármacos aplicados directamente en la cámara de incubación (Barastegui, 1984). El animal se sacrificó por dislocación cervical. Se disectó el ileon, abriendo en la parte del abdomen, y se localizó el ciego, alzándolo por la parte de atrás, se hizo un corte con tijeras muy cerca de la unión ileocecal. Se separó un fragmento de intestino (unos 10cm). El fragmento de ileon se colocó en una caja petri con solución de Tyrode (NaCl 8 g/l, KCl 0.2g/l, MgCl₂.6H₂O 0.213 g/l, CaCl₂ 0.2g/l, NaH₂PO₄ 0.058 g/l, NaHCO₃ 1 g/l, Glucosa 1 g/l) pH 7 a 37 °C. Se lavó cuidadosamente para eliminar el material fecal, se cortaron segmentos de 2 cm atando de manera independiente ambos extremos con hilo de seda (No. 5/0). El órgano se colocó longitudinalmente en una cámara de vidrio vertical para órgano aislado con solución de Tyrode (15 ml), a temperatura de 37 °C y con aireación. El hilo de uno de los extremos se enlazó a un miógrafo F60 (Narco Byo-Sistem) acoplado al fisiógrafo (modelo DMP-4B), previamente calibrado (figura 8). Se aplicó una tensión de 0.5 g al fragmento del ileon. Se realizaron varios cambios de la solución fisiológica. Se realizó un registro de la actividad basal hasta que se mantuvo estable.



Fig. 8 Miógrafo F60 (Narco Byo-Sistem) acoplado al fisiógrafo NBS (modelo DPH-4B).

Tratamientos.

- Cloruro de Potasio (KCl) 50 mM
- Serotonina (5HT) 0.0001 M
- Cloruro de Calcio (CaCl_2) 20 mM

Procedimiento.

Se realizaron curvas concentración-respuesta aplicando de manera acumulativa Cloruro de Potasio (KCl) 50 mM ó Serotonina (5HT) 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio (CaCl_2) 20 mM para observar la fuerza de contracción que producen estas sustancias. Se realizó una curva concentración-respuesta de 0.98 a 4.54 mM de KCl ó 2.23 a 1.02×10^{-6} M de 5HT ó 0.392 a 1.81 mM de CaCl_2 . Posteriormente se hizo un lavado al tejido con solución fisiológica y se dejó estabilizar la actividad peristáltica por 15 minutos, después de ese tiempo se

aplicó 0.35 ml extracto acuoso (concentración de 23 mg/ml) ó extracto hexánico (10mg/ml) ó extracto metanólico (10mg/ml). Se dejó estabilizar la preparación por 5 minutos y enseguida se aplicaron 0.28 ml de KCl 20 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM acumulativamente como en el caso de la curva control y se registró la fuerza de contracción. Enseguida se hizo un lavado con solución fisiológica y se dejó estabilizar la preparación por 5 minutos, después de ese tiempo se aplicó 0.70 ml extracto acuoso (concentración de 23 mg/ml) ó extracto hexánico (10mg/ml) ó extracto metanólico (10mg/ml). Se dejó estabilizar la preparación por 5 minutos y enseguida se aplicaron 0.28 ml de KCl 20 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM acumulativamente como en el caso de la curva control y se registró la fuerza de contracción. Posteriormente se hizo un lavado al tejido con solución fisiológica y se dejó estabilizar la actividad peristáltica por 15 minutos, después de ese tiempo se aplicó 1.4 ml del extracto acuoso (concentración de 23 mg/ml) ó extracto hexánico (10mg/ml) ó extracto metanólico (10mg/ml). Se dejó estabilizar la preparación por 5 minutos y enseguida se aplicaron 0.28 ml de KCl 20 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM acumulativamente como en el caso de la curva control y se registró la fuerza de contracción. Finalmente se hizo un lavado al tejido con solución fisiológica y se dejó estabilizar la actividad peristáltica por 15 minutos. Después de ese tiempo se aplicó nuevamente KCl 50 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM de manera acumulativa para corroborar que la preparación responde adecuadamente. Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto metanólico se probaron de manera semejante al extracto acuoso, se realizó una curva control aplicando de manera acumulativa 0.28 ml de

Cloruro de Potasio (KCl) 50 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM para observar la fuerza de contracción que producen estas sustancias. Se realizaron cinco aplicaciones acumulativas. Solo se hizo una aplicación de 1ml de cada fracción antes del KCl 50 mM ó Serotonina 10^{-4} M ó Cloruro de Calcio 20 mM obteniendo así las curvas concentración -respuesta. De manera similar para los extractos y las fracciones obtenidas por cromatografía en columna se realizaron cálculos para determinar las concentraciones de cada aplicación en unidades molar (M) milimolaridad (mM) y se determinó la fuerza de contracción en miligramos.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Con la media aritmética de las tres réplicas se elaboraron las curvas de concentración-respuesta y se compararon los efectos de contracción y relajación obtenidos a partir de las hojas de *A. repens* colectadas en los diferentes sitios de la FES-I. Los resultados fueron evaluados mediante la prueba t Student pareada ($p < 0.05$).

6.- RESULTADOS

6.1- Efecto del extracto acuoso de *A. repens* sobre la contracción inducida con KCl.

En la figura 9 se muestra la curva concentración-respuesta del intestino aislado de rata a KCl de 0.98 a 4.54 mM control y en presencia de 0.56, 1.095 y 2.09 mg/ml del extracto acuoso de las hojas de *A. repens*. Se observó que este extracto inhibió la contractilidad inducida por el K^+ .

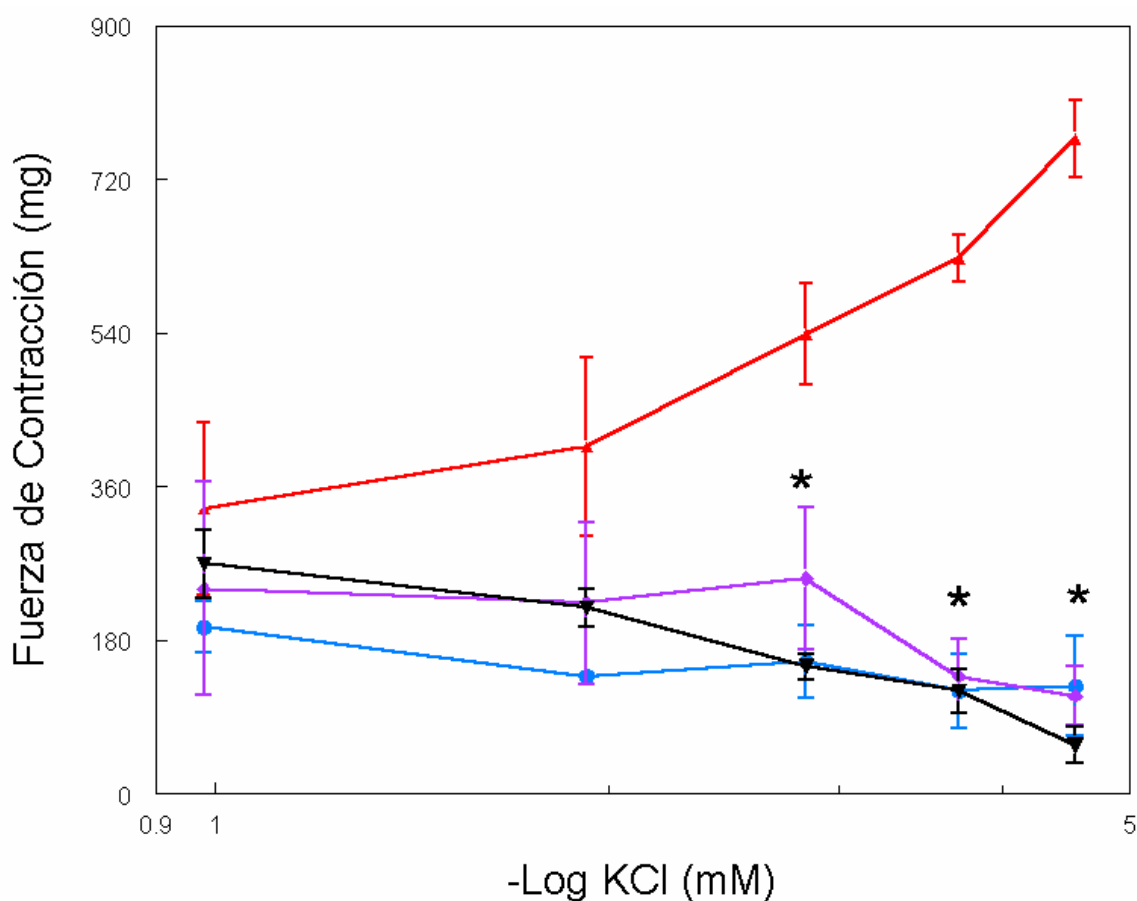


Fig.9 Efecto del extracto acuoso de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con KCl. Se realizaron curvas concentración-respuesta a KCl () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso (0.56, 1.09, 2.09 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p < 0.05; n=3.

6.2- Inhibición de la contractilidad en respuesta a Ca^{2+}

En la figura 10 se muestra la curva concentración-respuesta contráctil a CaCl_2 de 0.39 a 1.81 mM control y en presencia de 0.56, 1.095 y 2.09 mg/ml del extracto acuoso de las hojas de *A. repens*. Se observó que el extracto inhibió la contractilidad intestinal inducida por el Ca^{2+}

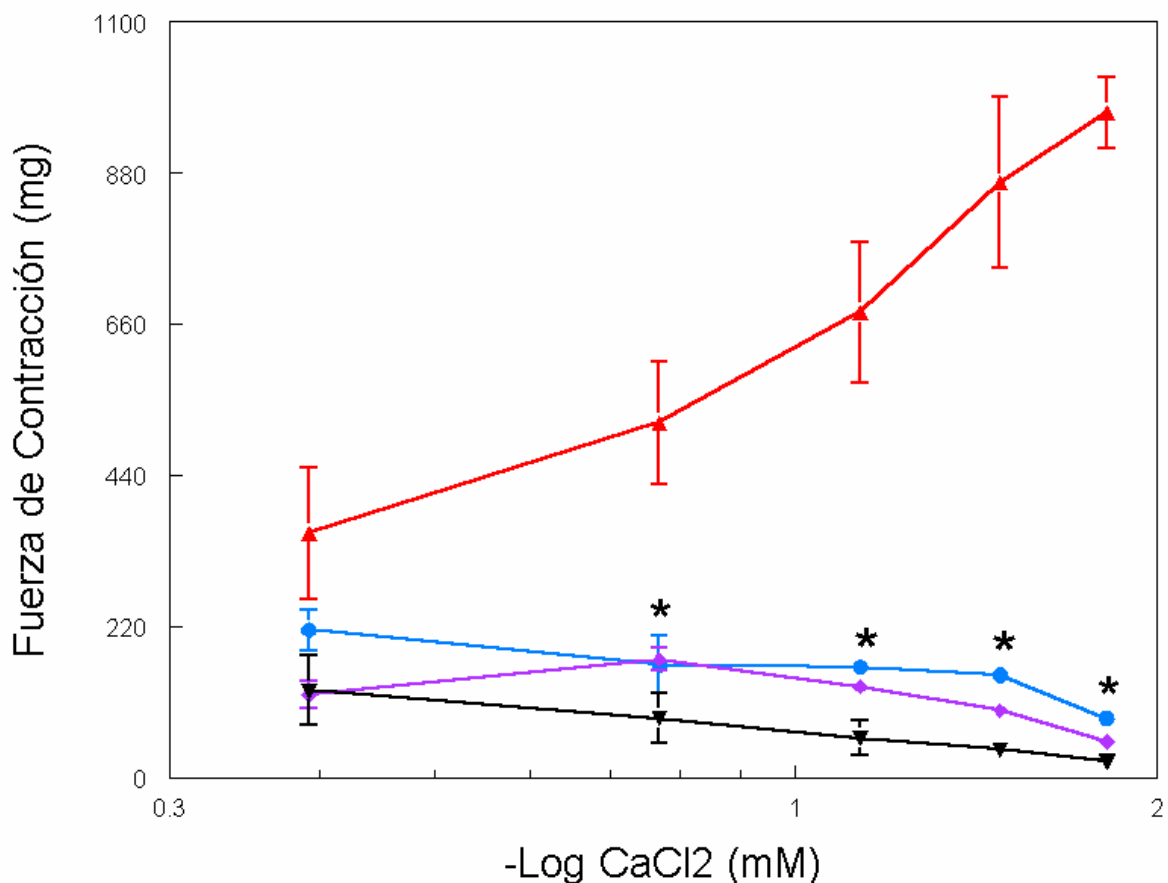


Fig. 10 Efecto del extracto acuoso de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con CaCl_2 . Se realizaron curvas concentración-respuesta a CaCl_2 . () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso (0.56, 1.09, 2.09 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05; n=3.

6.3- Inhibición de la contractilidad en respuesta a serotonina.

En la figura 11 se muestra la curva concentración-respuesta a la serotonina de 2.23 a 1.025×10^{-6} M control y en presencia de 0.56, 1.095 y 2.09 mg/ml del extracto acuoso de las hojas de *A. repens*. El extracto inhibió la respuesta a serotonina.

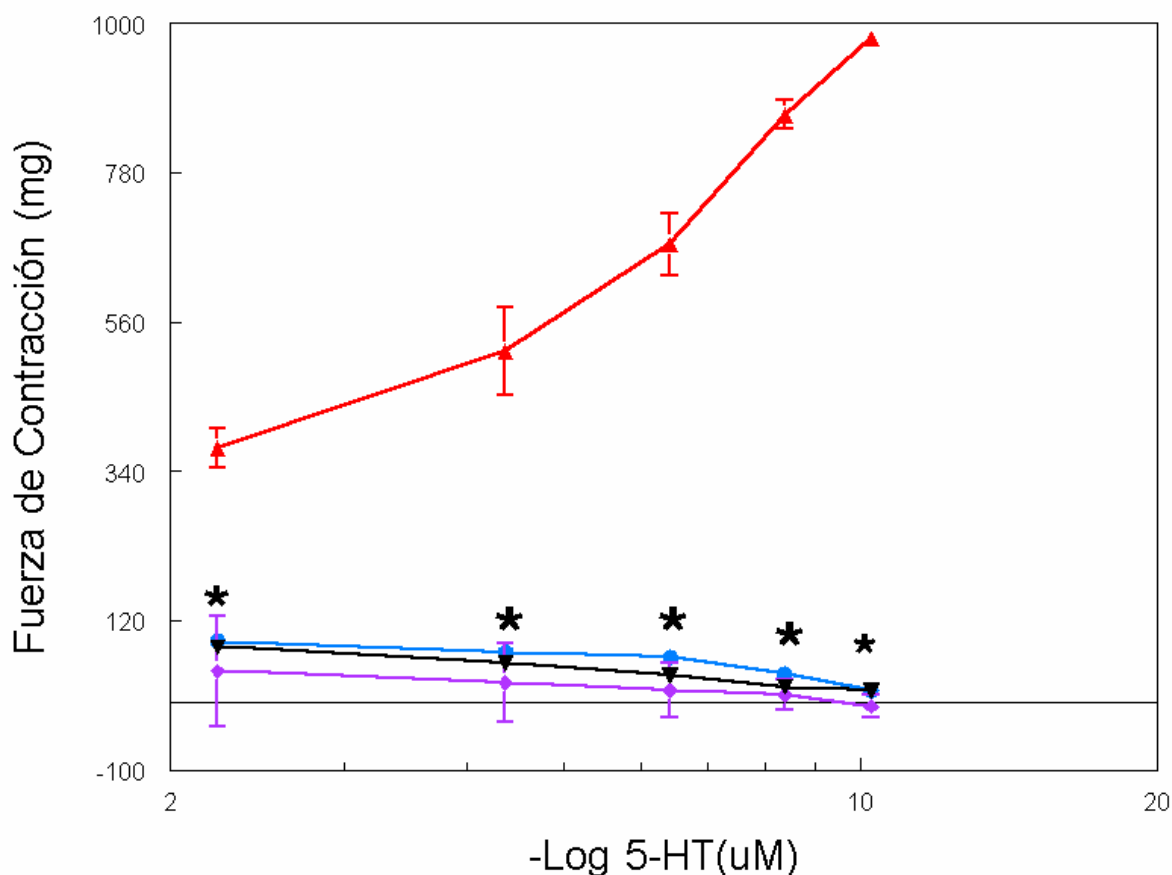


Fig. 11 Efecto del extracto acuoso de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con serotonina. Se realizaron curvas concentración-respuesta a 5HT () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso (0.56, 1.09, 2.09 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p < 0.05; n=3.

6.4- Efecto del extracto hexánico de *A. repens* sobre la contracción inducida con KCl.

En la figura 12 se muestra la curva concentración-respuesta del intestino aislado de rata a KCl de 0.98 a 4.54 mM control y en presencia de 0.245, 0.4761 y 0.909 mg/ml del extracto hexánico de las hojas de *A. repens*. Se observó que este extracto no inhibió la contractilidad inducida por el K^+ .

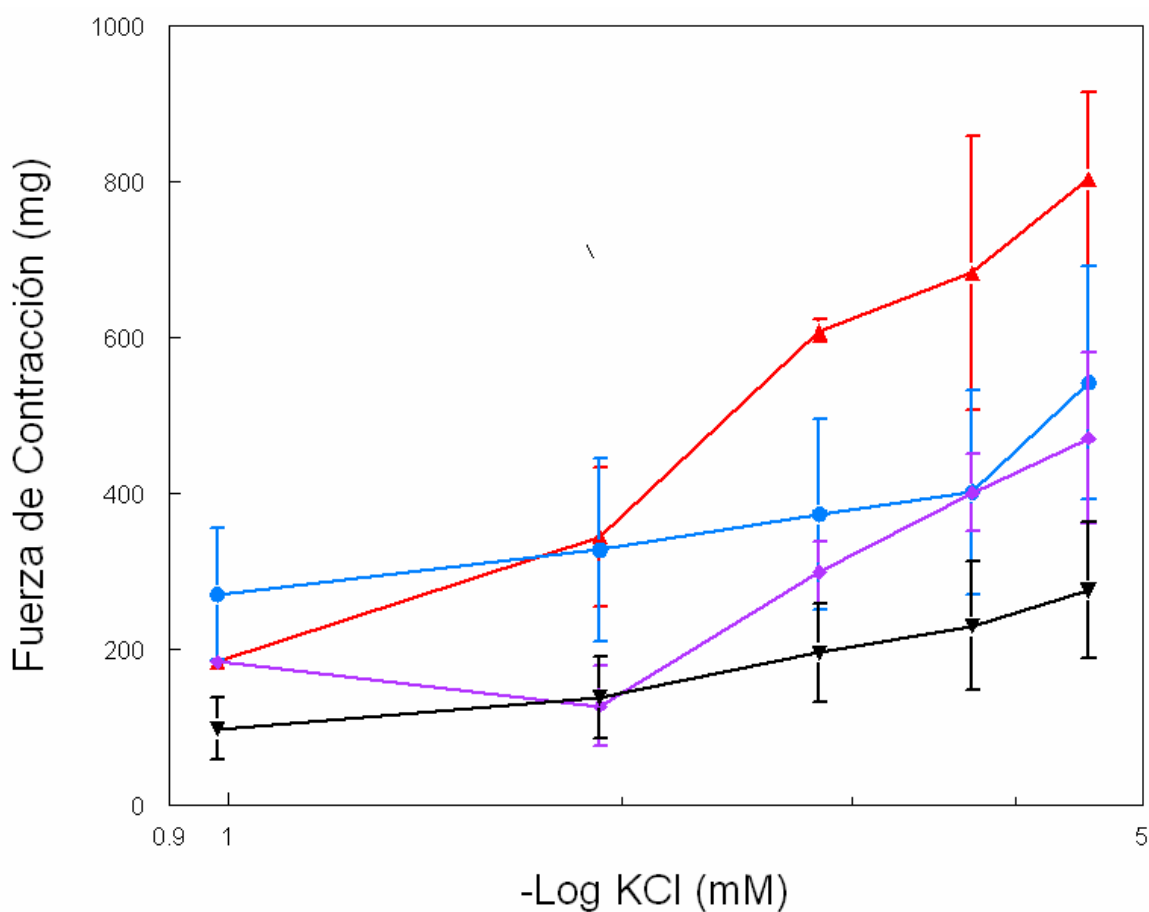


Fig. 12 Efecto del extracto hexánico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con KCl. Se realizaron curvas concentración-respuesta a KCl () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de l extracto hexánico (0.245, 0.4761, 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05; n=3.

6.5- Inhibición de la contractilidad en respuesta a Ca^{2+}

En la figura 13 se muestra la curva concentración-respuesta contráctil a CaCl_2 de 0.39 a 1.81 mM control y en presencia de 0.245, 0.4761 y 0.909 mg/ml del extracto hexánico de las hojas de *A. repens*. Se observa que el extracto no inhibió la contractilidad intestinal inducida por el Ca^{2+}

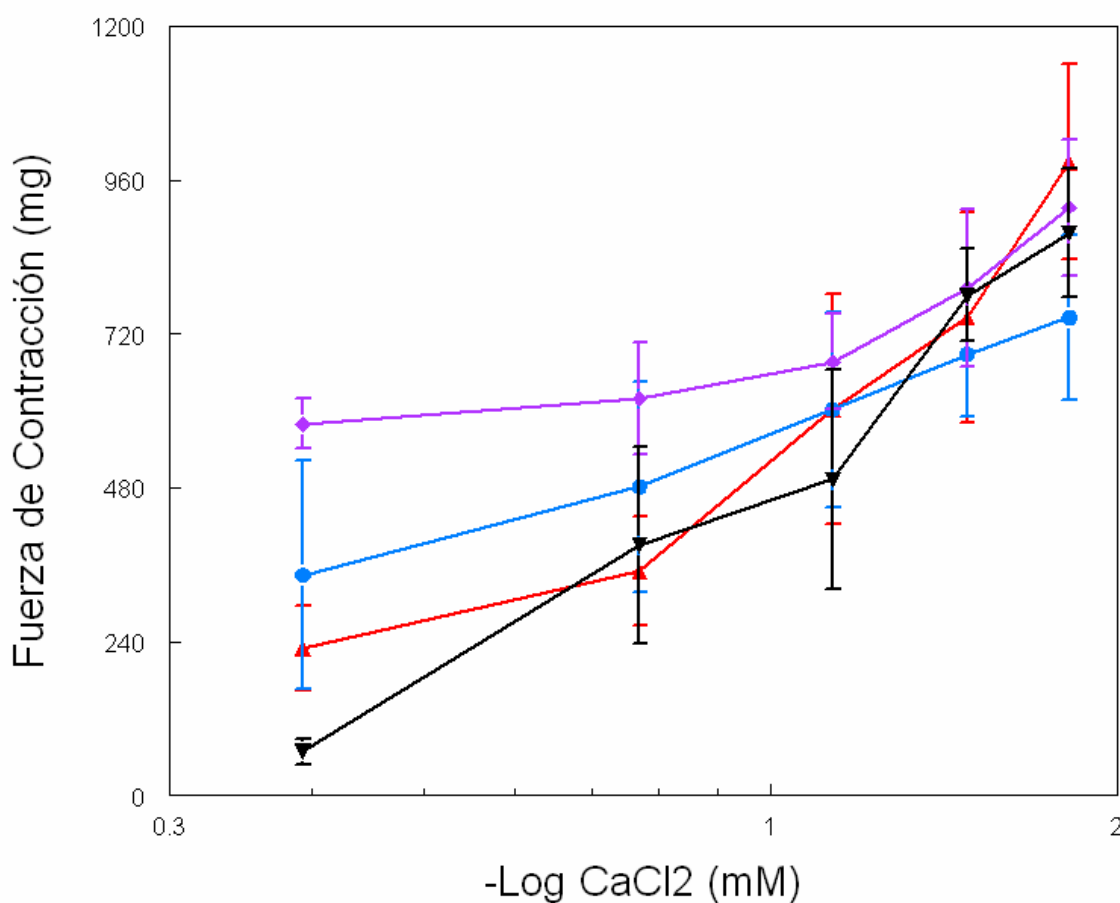


Fig. 13 Efecto del extracto hexánico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con CaCl_2 . Se realizaron curvas concentración-respuesta a CaCl_2 () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto hexánico () (0.245, 0.4761, 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05; n=3.

6.6- Inhibición de la contractilidad en respuesta a serotonina.

En la figura 14 se muestra la curva concentración-respuesta a la serotonina de 2.23 a 1.025×10^{-6} M control y en presencia de 0.245 , 0.4761 y 0.909 mg/ml del extracto hexánico de las hojas de *A. repens*. El extracto no inhibió la respuesta a serotonina.

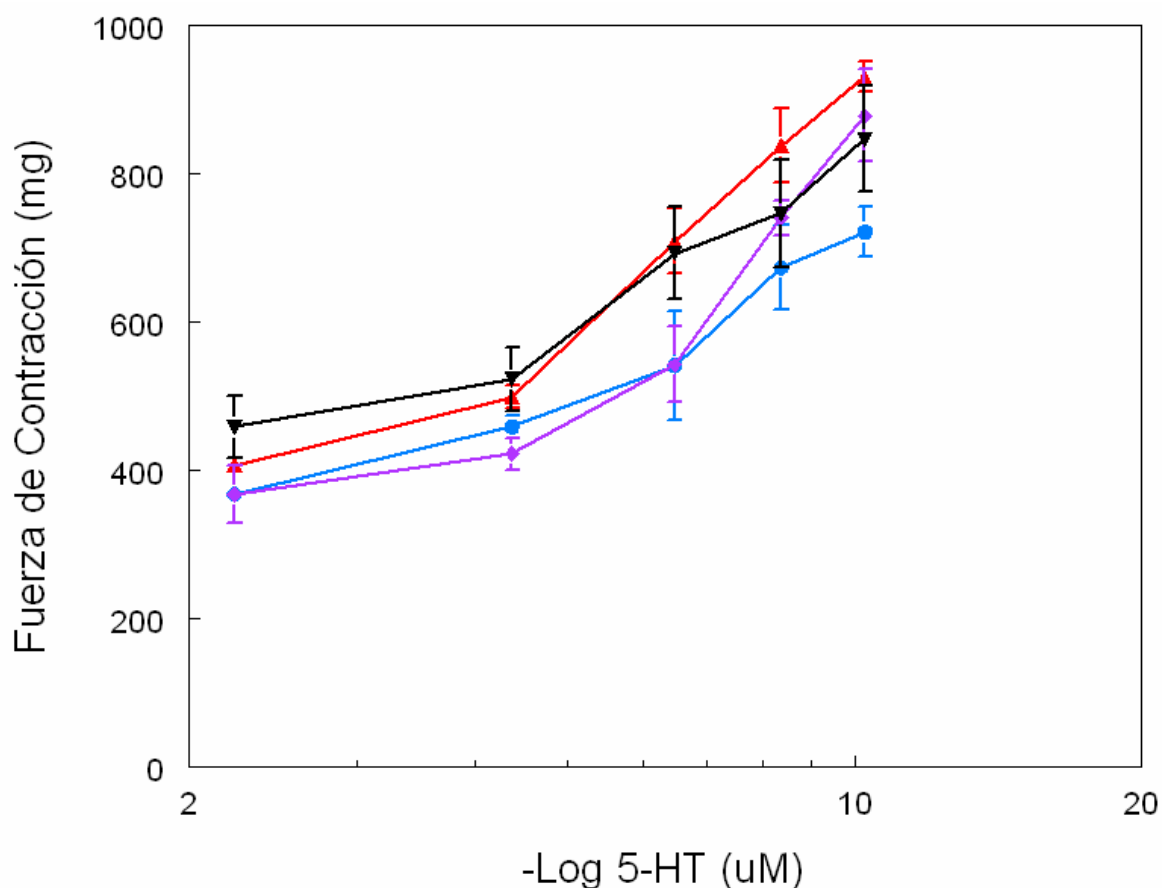


Fig. 14 Efecto del extracto hexánico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con serotonina. Se realizaron curvas concentración-respuesta a 5HT () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto hexánico (0.245 , 0.4761 , 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05 ; $n=3$.

6.7- Efecto del extracto metanólico de *A. repens* sobre la contracción inducida con KCl.

En la figura 15 se muestra la curva concentración-respuesta del intestino aislado de rata a KCl de 0.98 a 4.54 mM control y en presencia de 0.245, 0.476 y 0.909 mg/ml del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observa que este extracto inhibió la contractilidad inducida por el K^+ .

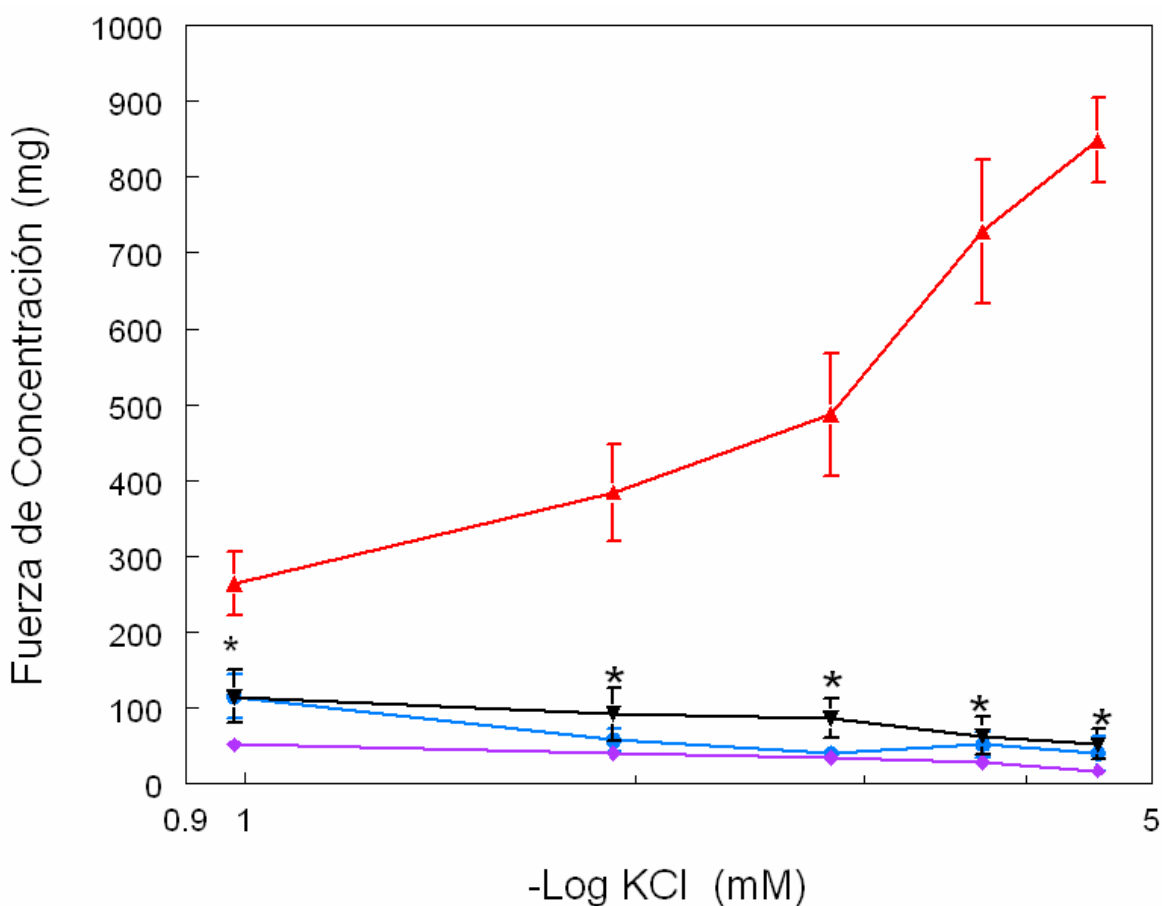


Fig. 15 Efecto del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con KCl. Se realizaron curvas concentración-respuesta a KCl () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto metanólico (0.245, 0.4761, 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05; n=3.

6.8- Inhibición de la contractilidad en respuesta a Ca^{2+}

En la figura 16 se muestra la curva concentración-respuesta contráctil a CaCl_2 de 0.39 a 1.81 mM control y en presencia de 0.245, 0.476 y 0.909 mg/ml del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que el extracto inhibió la contractilidad intestinal inducida por el Ca^{2+}

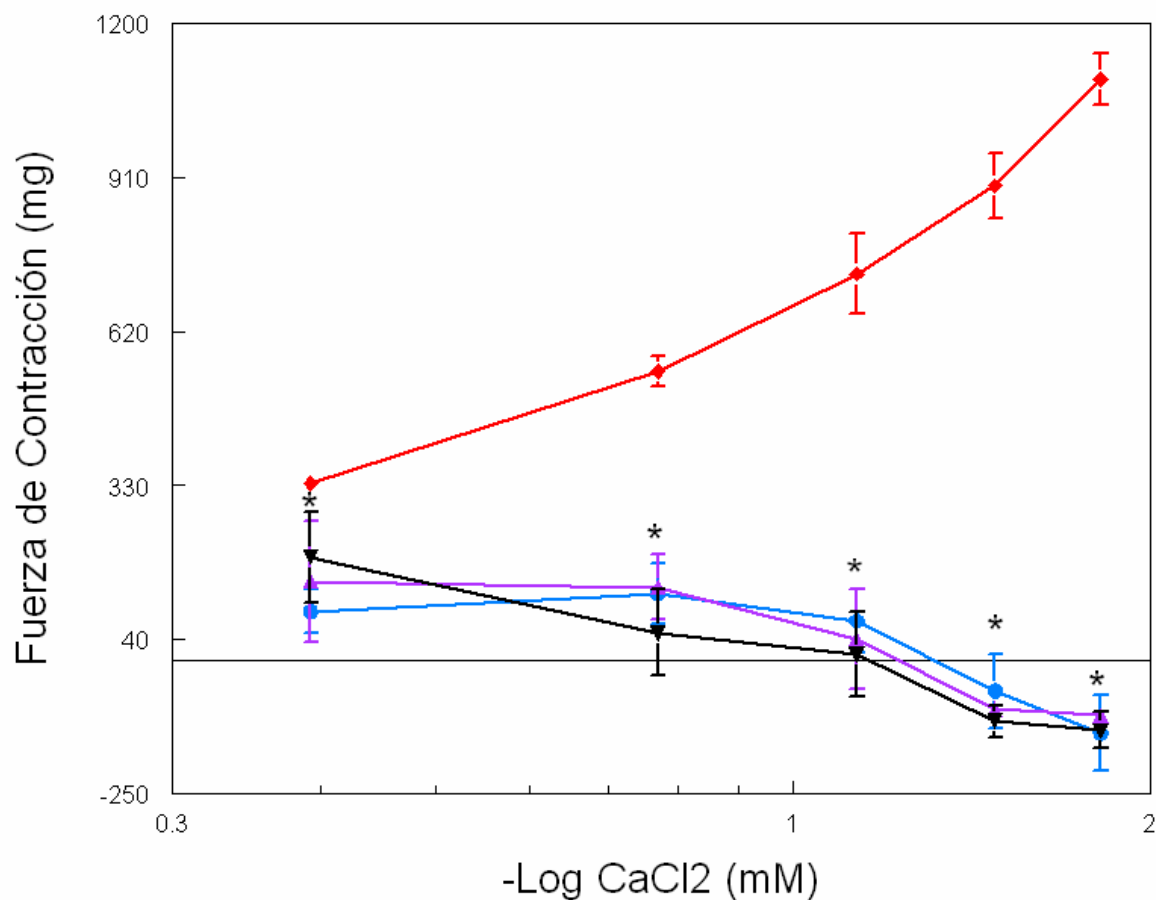


Fig. 16 Efecto del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con CaCl_2 . Se realizaron curvas concentración-respuesta a CaCl_2 () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto metanólico () (0.245, 0.4761, 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una * $p < 0.05$; $n=3$.

6.9- Inhibición de la contractilidad en respuesta a serotonina.

En la figura 17 se muestra la curva concentración-respuesta a la serotonina de 2.23 a 1.025×10^{-6} M control y en presencia de 0.245, 0.476 y 0.909 mg/ml del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. El extracto inhibió la respuesta a la serotonina.

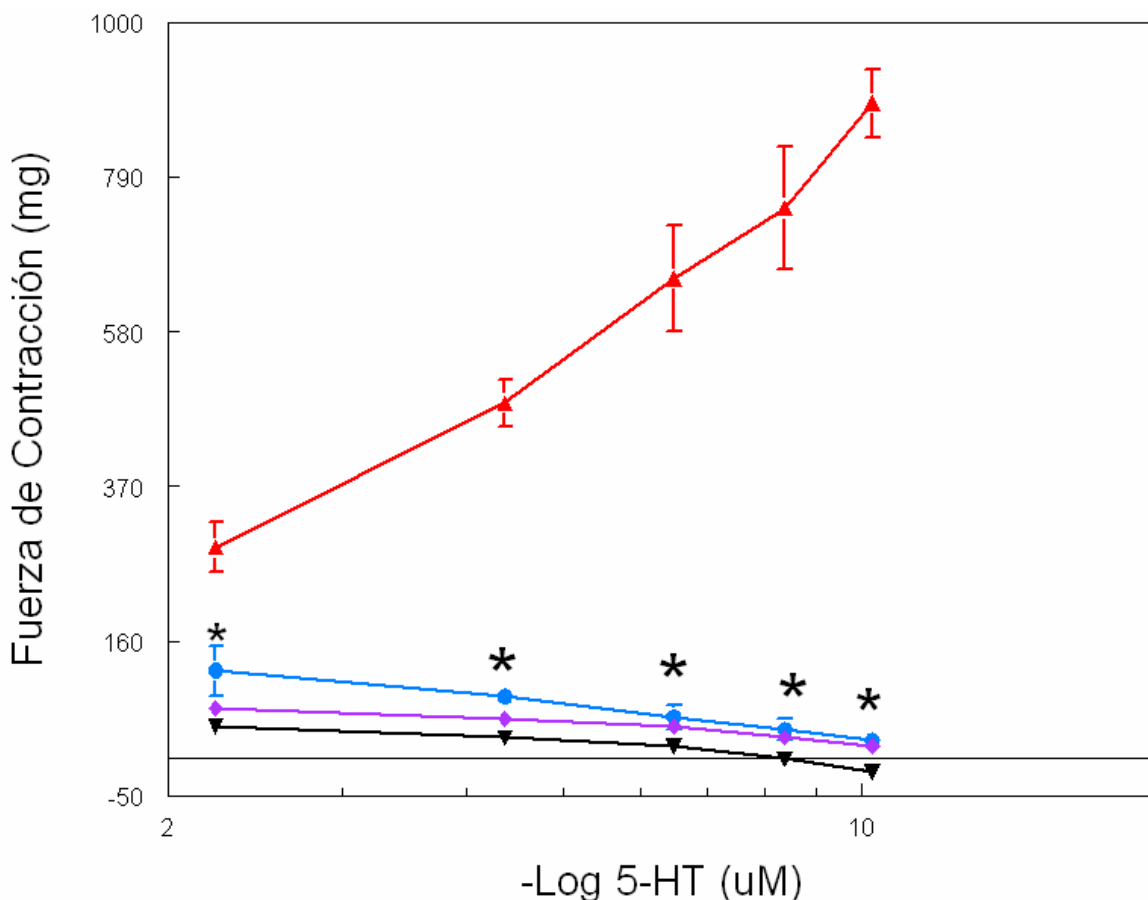


Fig. 17 Efecto del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con serotonina. Se realizaron curvas concentración-respuesta a 5HT () en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del extracto metanólico (0.245, 0.4761, 0.909 mg/ml). Cada punto representa la media \pm EEM para una * $p < 0.05$; n=3.

6.10- Efecto de fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *A. repens* sobre la contracción inducida con KCl.

En la figura 18 se muestra la curva concentración-respuesta del intestino aislado de rata a KCl de 0.98 a 4.54 mM control y en presencia de 0.66 mg/ml de las fracciones 90:10 diclorometano: metanol (B), 80:20 diclorometano: metanol (C) y 85:15 diclorometano: metanol (D) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que estas fracciones inhibieron la contractilidad inducida por el K^+ .

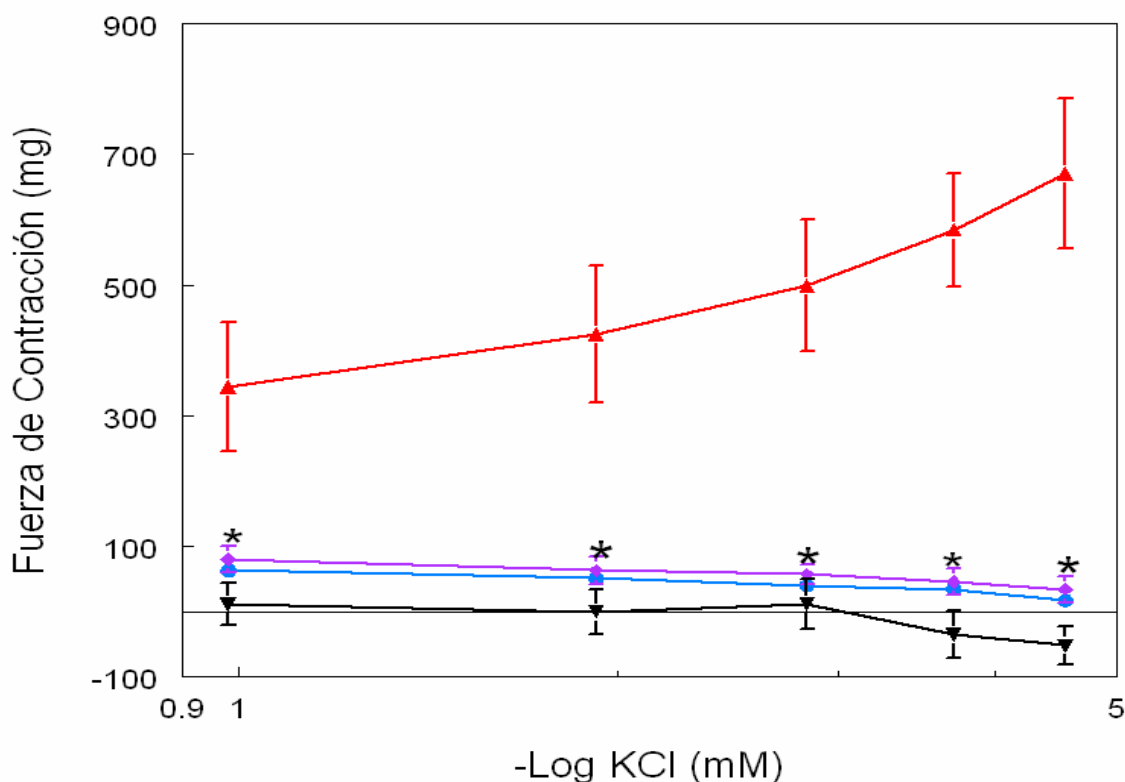


Fig. 18 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción del íleon de rata inducida con KCl. Se realizaron curvas concentración-respuesta a KCl () en ausencia y presencia de diferentes fracciones (B, C, D, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una * $p < 0.05$; $n=3$.

6.11- Inhibición de la contractilidad en respuesta a Ca^{2+}

En la figura 19 se muestra la curva concentración-respuesta contráctil a CaCl_2 de 0.39 a 1.81 mM control y en presencia de 0.66, mg/ml de las fracciones 90:10 diclorometano: metanol (B), 80:20 diclorometano: metanol (C) y 85:15 diclorometano: metanol (D) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que las fracciones inhibieron la contractilidad intestinal inducida por el Ca^{2+} .

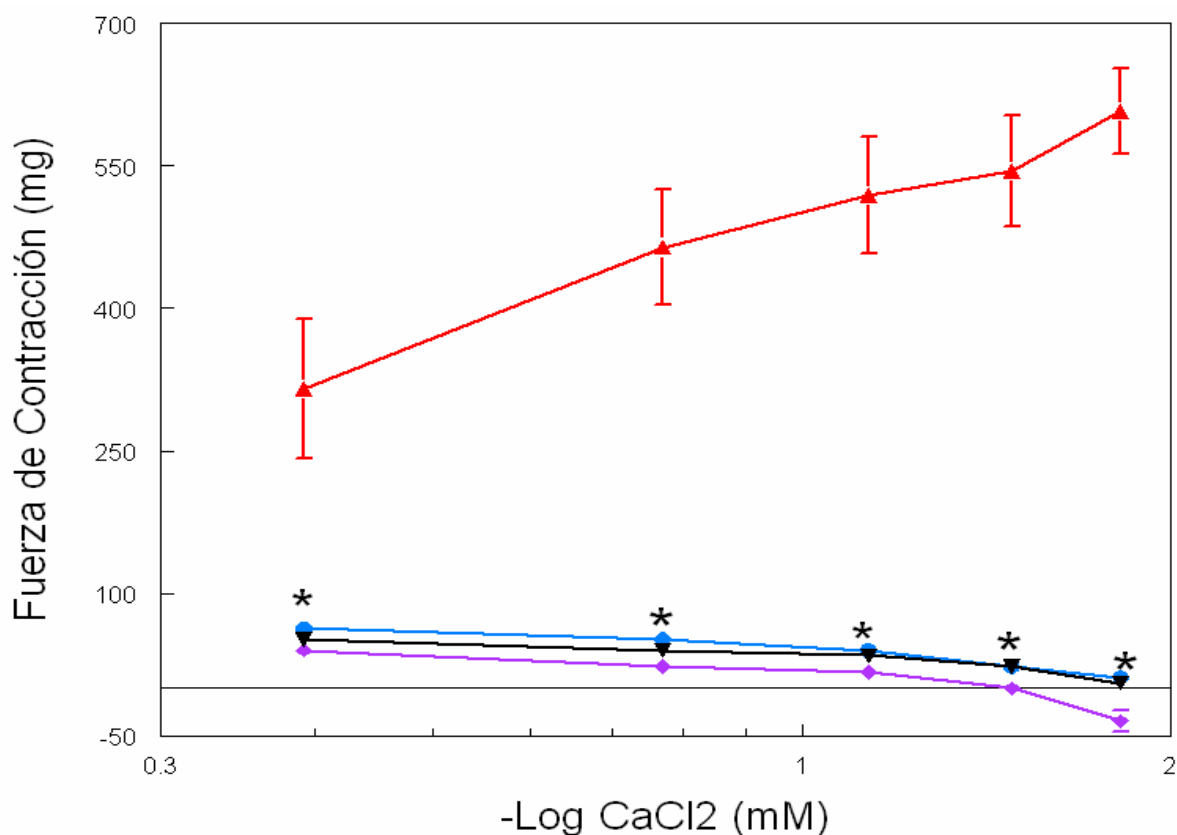


Fig. 19 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción ileon de rata inducida con CaCl_2 (). Se realizaron curvas concentración-respuesta a CaCl_2 en ausencia y presencia de diferentes fracciones (B, C, D, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una *p < 0.05 ; n=3.

6.12- Inhibición de la contractilidad en respuesta a serotonina.

En la figura 20 se muestra la curva concentración-respuesta a la serotonina de 2.23 a 1.025×10^{-6} M control y en presencia de 0.66 mg/ml de las fracciones 90:10 diclorometano: metanol (B), 80:20 diclorometano: metanol (C) y 85:15 diclorometano: metanol (D) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que las fracciones inhibieron la respuesta a serotonina.

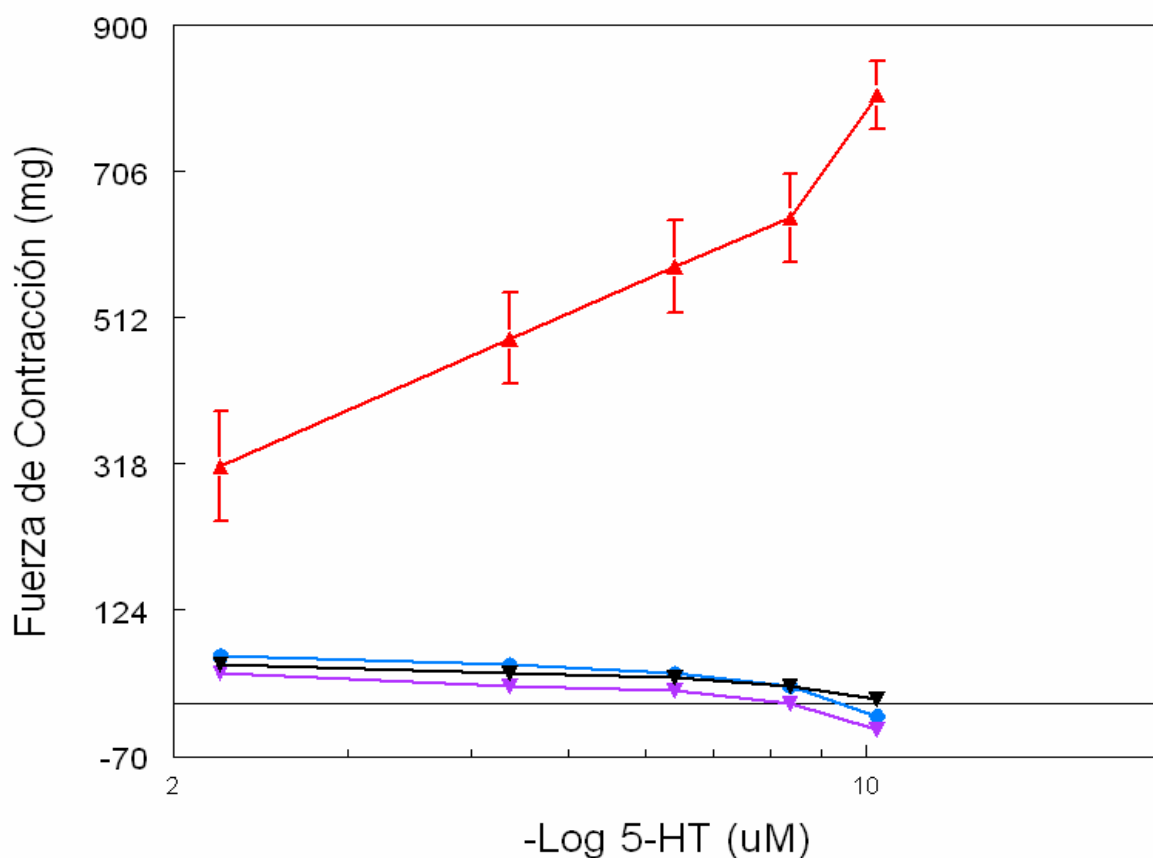


Fig.20 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción ileon de rata inducida con 5HT (). Se realizaron curvas concentración-respuesta a 5-HT en ausencia y presencia de diferentes fracciones (B, C, D, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una *p 0.05 ; n=3.

6.13- Efecto de fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *A. repens* sobre la contracción inducida con KCl.

En la figura 21 se muestra la curva concentración-respuesta del intestino aislado de rata a KCl de 0.98 a 4.54 mM control y en presencia de 0.66 mg/ml de las fracciones 95:15 diclorometano: metanol (A), 75:25 diclorometano: metanol (E) y 70:30 diclorometano: metanol (F) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que estas fracciones no inhibieron la contractilidad inducida por el K^+ .

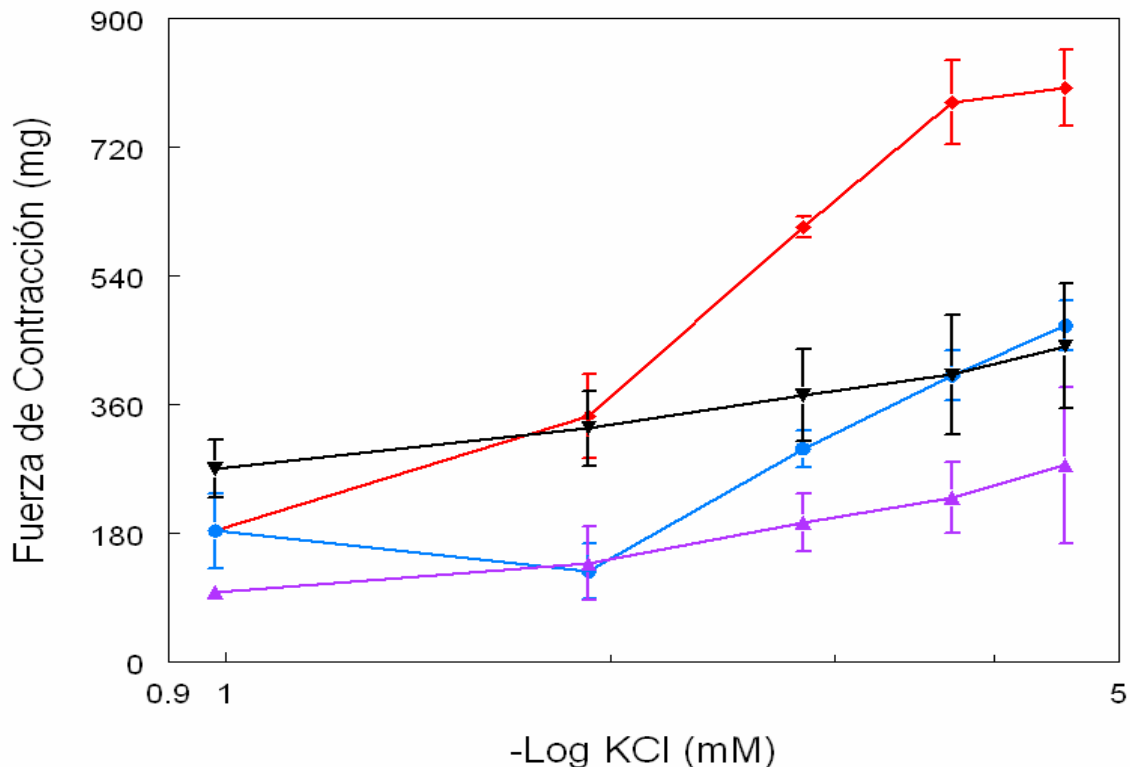


Fig. 21 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción ileon de rata inducida con KCl (). Se realizaron curvas concentración-respuesta a KCl en ausencia y presencia de diferentes fracciones (A, E, F, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una *p < 0.05; n=3.

6.14- Inhibición de la contractilidad en respuesta a Ca^{2+}

En la figura 22 se muestra la curva concentración-respuesta contráctil a CaCl_2 de 0.39 a 1.81 mM control y en presencia de 0.66, mg/ml de las fracciones 95:15 diclorometano: metanol (A), 75:25 diclorometano: metanol (E) y 70:30 diclorometano: metanol (F) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que las fracciones no inhibieron la contractilidad intestinal inducida por el Ca^{2+} .

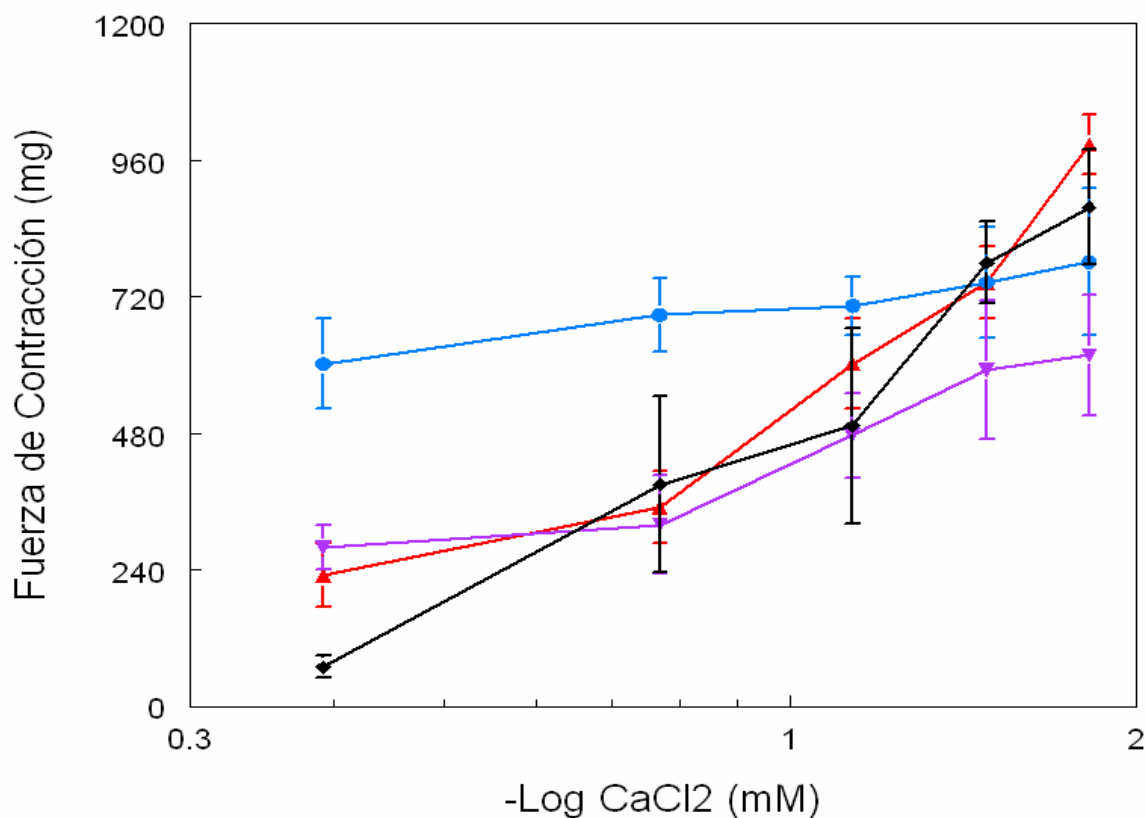


Fig. 22 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción ileon de rata inducida con CaCl_2 (). Se realizaron curvas concentración-respuesta a CaCl_2 en ausencia y presencia de diferentes fracciones (A, E, F, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una *p < 0.05; n=3.

6.15- Inhibición de la contractilidad en respuesta a serotonina.

En la figura 23 se muestra la curva concentración-respuesta a la serotonina de 2.23 a 1.025×10^{-6} M control y en presencia de 0.66 mg/ml de las fracciones 95:15 diclorometano: metanol (A), 75:25 diclorometano: metanol (E) y 80:20 diclorometano: metanol (F) obtenidas por cromatografía a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens*. Se observó que las fracciones no inhibieron la respuesta a serotonina.

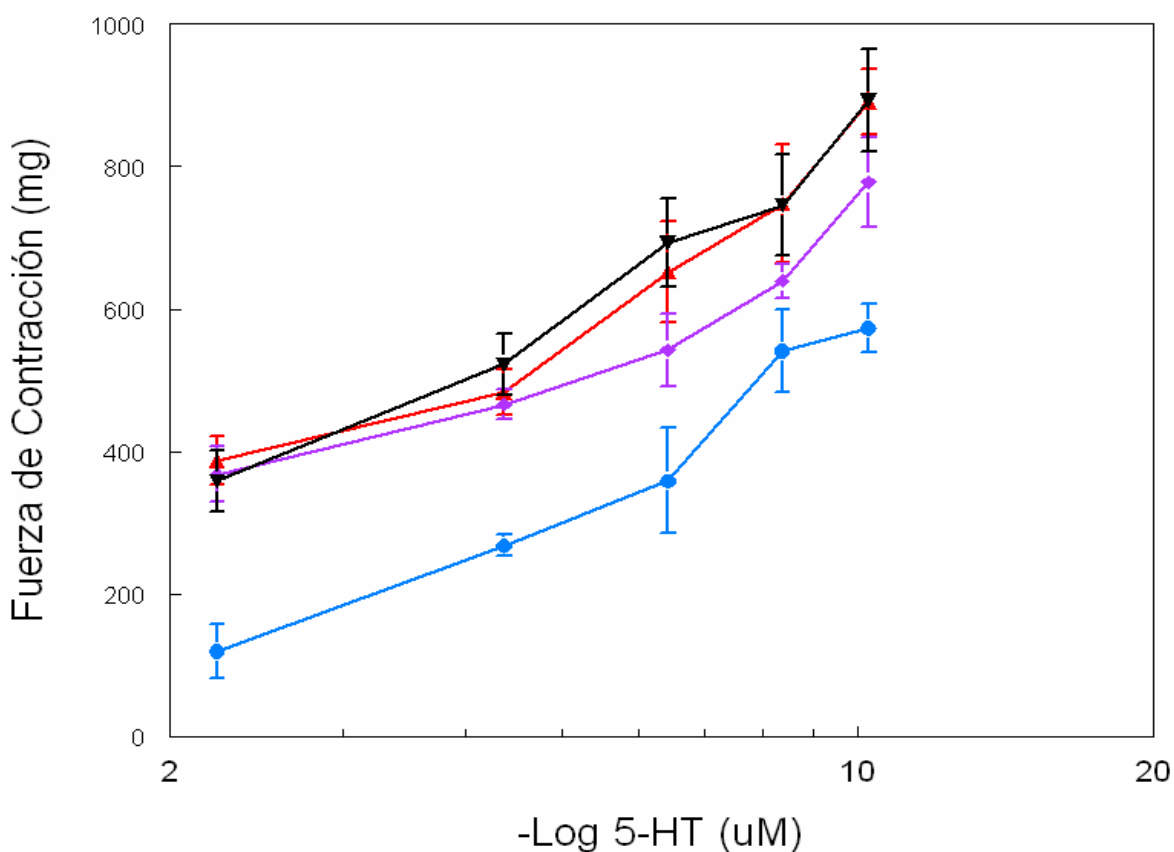


Fig.23 Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de las hojas de *A. repens* sobre la contracción ileon de rata inducida con 5HT (). Se realizaron curvas concentración-respuesta a 5HT en ausencia y presencia de diferentes fracciones (A, E, F, 0.66 mg/ml) obtenidas a partir del extracto metanólico. Cada punto representa la media \pm EEM para una $*p < 0.05$; $n=3$

7.1- DISCUSIÓN

El músculo liso del ileon de rata experimenta una respuesta mecánica bifásica cuando se expone a una solución que contiene acetilcolina. En primer lugar, la fásica, depende de una movilización inicial de calcio intracelular, probablemente desde el retículo sarcoplásmico, en una vía que depende de inositol trifosfato (IP3). La segunda fase, la tónica, es más dependiente del calcio del medio extracelular y se debe a un aumento en el influjo de calcio a través de la membrana. Así cuando en el trabajo de ^aGarín y col., 2001 se observó que el extracto acuoso de *A. repens* reduce la respuesta a la acetilcolina este evento puede reflejar una posible reducción de la entrada de calcio a través de canales de calcio operados por el receptor.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el extracto acuoso (0.56, 1.095, 2.09 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con Cloruro de Potasio (KCl 0.98 mM –4.54 mM). El extracto acuoso (0.56, 1.095, 2.09 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con cloruro de calcio CaCl₂ 0.39mM – 1.81mM). De igual forma el extracto acuoso (0.56, 1.095, 2.09 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con serotonina (5-HT 2.23 X10⁻⁶ M-10.25X10⁻⁶ M). La 5HT al ser liberada por las células enterocromafines dan origen a una diversidad de funciones motoras y sensoriales en el tracto gastrointestinal a través de neuronas del plexo submucoso y mientérico, las que responden a la 5-HT a través de una variedad de receptores serotoninérgicos (Bertram, et. al., 1996)

El extracto acuoso obtenido presentó color café, con aspecto chicloso, espuma y un olor parecido al café. Según lo establecido por Calderón (1998) el extracto acuoso de *A. repens* presenta una gran cantidad de saponinas, grupo de glicósidos que contienen la característica de disminuir la tensión superficial y generar espuma abundante, relativamente estable. Las propiedades tenso-depresoras de las saponinas, hace suponer que pueden tener efecto en el caso que nos ocupa. Además en 1998 Zavala y colaboradores publicaron que el extracto acuoso de *A. repens* presentó actividad contra la diarrea provocada en ratas con aceite de castor y sulfato de magnesio sustentando estos antecedentes los resultados encontrados. Por otro lado ve que el extracto acuoso aun es impuro se trabajo con otros extractos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el extracto metanólico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con Cloruro de Potasio (KCl 0.98mM –4.54mM). El extracto metanólico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con cloruro de calcio CaCl₂ 0.39mM – 1.81mM). De igual forma el extracto metanólico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *Alternanthera repens* presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con serotonina (5-HT 2.23 X10⁻⁶ M- 10.25X10⁻⁶ M, lo que sugiere que los receptores serotoninérgicos presentes en el tejido se encuentran mediando la contracción del íleon de rata. El extracto metanólico presentó color verde de consistencia pegajosa, soluble en agua y

efecto inhibitorio en la peristalsis intestinal, reafirmando lo encontrado por Hernández (1996) que trabajó con extracto metanólico de hojas de *A. repens* y observó un efecto inhibitorio sobre la peristalsis intestinal de rata Wistar y que este efecto fue mayor en comparación con el extracto de las otras plantas que trabajó *Hamelia patens*, y *Waltheria americana*. Calderón en 1998 encontró que el extracto metanólico contiene una gran cantidad de alcaloides, compuestos nitrogenados, que se comportan como bases frente a los ácidos, formando sales se conoce que tienen propiedades fisiológicas y toxicológicas, que se ejercen fundamentalmente sobre el sistema nervioso central, azúcares, saponinas compuestos caracterizados desde el punto de vista estructural por presentar glicósidos que contienen la característica de disminuir la tensión superficial y generar espuma abundante relativamente estable, característica observada en el extracto realizado en este trabajo y taninos que tienen la propiedad de precipitar proteínas, utilizados como antidiarreicos, antiséptico, cicatrizantes etc. y en menor proporción glucósidos, quinonas y cumarinas reportadas como poseedores de diferentes efectos biológicos como antibióticos, actividad fototóxica, daño hepático, carcinógeno (Canales, 2000) y como antagonistas del calcio (Méndez, 2000). Con lo antes mencionado es posible que las cumarinas presentes en el extracto sean las responsables de la acción antiespasmódica.

El extracto hexánico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *A. repens* no presentó actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con Cloruro de Potasio (KCl 0.98mM –4.54mM), el extracto hexánico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *A. repens* no presento actividad inhibitoria de la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con Cloruro de Calcio (CaCl₂ 0.39

-1.81mM). De igual forma el extracto hexánico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *A. repens* no presento actividad inhibitoria en la contracción del ileon de rata *in vitro* inducida con Serotonina (5HT .2346 10^{-6} M – 10.256 10^{-6} M). Estos resultados confirman lo planteado por ^bGarín y col. en el 2001 en donde sugieren que el o los principios activos de la planta responsables de la actividad antimicrobiana en *A. repens* son de naturaleza no polar, mientras que los responsables de la actividad espasmolítica son de naturaleza polar. El extracto hexánico presentó color amarillo y consistencia grasosa y no es soluble en agua.

A partir del extracto metanólico se obtuvieron ocho fracciones obtenidas por cromatografía en columna con diferentes mezclas de diclorometano: metanol, de estas sólo tres: 90:10, 85:15 y 80:20 tuvieron efecto inhibitorio de las contracciones inducida por serotonina y KCl. La fracción de diclorometano 100 no se obtuvo muestra, esto tal vez se deba a que el extracto metanólico es más polar y el diclorometano es menos polar. Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna con diferentes mezclas de diclorometano: metanol 95:05, 75:15, 70:20 presentaron un efecto contrario, es decir, produjeron un efecto contráctil del intestino aislado.

En el presente estudio se encontró que los extractos polares de *Alternanthera repens* reducen las contracciones espontáneas del ileon aislado de rata. Se ha establecido que las contracciones espontáneas del músculo liso intestinal son reguladas por ciclos de despolarización y repolarización. Se generan los potenciales de acción en el pico de despolarización y constituyen una entrada rápida de iones de calcio a través de canales de calcio activados por voltaje (Walsh y Singer, 1980; Brading, 1981). Por consiguiente, es posible que los

extractos polares contengan algunos compuestos que interfieran con la actividad de los canales de calcio. Los extractos polares también disminuyen las contracciones inducidas por serotonina y KCl en el ileon aislado de rata.

En las concentraciones empleadas no se observó que fuera dependiente de la concentración. El efecto fue reversible después de lavar. KCl y serotonina causan despolarización y contracciones tónicas del músculo liso intestinal. Generalmente se acepta que un aumento en la concentración de iones de calcio citoplásmico libre es indispensable para la contracción del músculo liso. La activación de receptores serotoninérgicos del músculo liso longitudinal del intestino delgado produce una frecuencia aumentada de descarga de potenciales de acción y despolarización que resulta en una contracción (Reddy et al., 1995). Considerando que la contracción inducida por serotonina sucede a través de la activación de receptores de 5-HT y la contracción inducida por KCl se debe a un aumento en K^+ y despolarización de fibras de músculo liso, llevando a la entrada aumentada de calcio a través de canales tipo L, operados por voltaje (Gilani et al., 1994). Es decir, los iones de calcio ganan el acceso al citoplasma a través de canales de calcio activados por voltaje u operados por el receptor (Triggle, 1985). Según nuestras observaciones, cuando las preparaciones de ileon de rata aisladas eran recontraídas con serotonina, la relajación inducida por los extractos polares era mayor que en la presencia de acetilcolina utilizada por ^aGarín y col., 2001. Sin embargo, la actividad espasmolítica de los extractos polares no podría atribuirse solamente a algún efecto antagónico puro, ya que el tejido contraído por KCl también fue relajado después de la exposición a los extractos polares.

La respuesta tónica que induce el KCl depende del calcio del medio extracelular y se debe a un aumento en el influjo de calcio a través de la membrana. El efecto inhibitorio de los extractos polares de *A. repens* sobre el componente tónico de la contracción inducida por K^+ puede reflejar una posible reducción de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de calcio operados por voltaje. Además los extractos polares de *A. repens* inhibieron las curvas-concentración - respuesta a $CaCl_2$ en un medio libre de Ca^{2+} .

Por otro lado, en el músculo liso el tono contráctil puede relajarse por los niveles aumentados de monofosfato de adenosina 3',5'-cíclico (AMP cíclico) (Berridge, 1975). Por consiguiente, los extractos polares pueden tener su efecto relajante a través de un aumento en el AMP cíclico independiente de la actividad de cualquier receptor específico, y por lo tanto, una reducción en los niveles de Ca^{2+} .

Con todo lo anterior es necesario seguir con la purificación del compuesto responsable de la actividad espasmolítica y continuar aclarando el posible mecanismo de acción.

7.1.- RESUMEN DE DISCUSIÓN

- ❖ Los resultados de este estudio indican que los extractos acuoso y metanólico y tres fracciones obtenidos de las hojas de *A. repens* inhiben la peristalsis intestinal.
- ❖ El extracto hexánico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *A. repens* no inhiben la peristalsis intestinal.
- ❖ Los extractos acuoso (0.56, 1.095, 2.09 mg/ml) y metanólico (0.245, 0.476, 0.909 mg/ml) de las hojas de *A. repens* relajaron el intestino pre-contraído con cloruro de potasio, o cloruro de calcio o serotonina y redujeron la respuesta al calcio.
- ❖ Los extractos polares y tres fracciones obtenidas de *A. repens* relajaron el intestino pre-contraído con cloruro de calcio, quizá esto se deba en parte a la (s) cumarina. Compuesto que actúan como agente antagonista de los canales de calcio.
- ❖ Las fracciones 95: 05, 75:15, 70:30 (diclorometano: metanol) presentaron un efecto contráctil del intestino aislado.

8.- CONCLUSIÓN

Los extractos polares y fracciones de las hojas de *Alternanthera repens* inhibieron la contracción intestinal inducida por serotonina y cloruro de potasio y evitaron la respuesta contráctil al calcio extracelular. El efecto relajante de los extractos polares y fracciones observado en este trabajo permiten sustentar en cierta medida el difundido uso de esta planta para combatir el dolor de estomago y para detener la diarrea.

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, A. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social. México Pp: 4-32.
- AGUILAR, A., CAMACHO, R. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuadros básicos y aparatos y sistemas del cuerpo humano. Instituto Mexicano del Seguro Social. 213p.
- ANUARIO DE ESTADÍSTICAS. Estados Unidos Mexicanos. Edición 1999 INEGI.
- ANUARIO ESTADÍSTICO. Estados Unidos Mexicanos. Edición 2000 INEGI.
- ANUARIO ESTADÍSTICO. Estados Unidos México. Edición 2002 INEGI.
- ARGUETA, V. A., CANO, A. L. M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. 1ª. Edición. Biblioteca de la medicina tradicional mexicana. México. Pp: 139-142; 261-278.
- BARASTEGUI, A. 1984. Farmacología. Editorial Espaxs. Barcelona. Pp: 139-140.
- BENNINGTON, J., M. 1991. Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico. Editorial Médica Panamericana. Argentina. Pp: 99, 396, 418.
- BERRIDGE, M. 1975. The interaction of cyclic nucleotides and calcium in control of cellular activity. Advanced Cyclic Nucleotides. Reserches. 6:1,98.
- BERTRAM, G., KATZUNG, M. D. 1996. Farmacología Básica y Clínica. Editorial Manual Moderno. México. Pp: 323-328

- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA. 2003. [En red] biologia.iztacala.unam.mx
- CABRERA, L. G. 1981. Plantas curativas de México. 2ª. Edición. Libro-Mex. México. 230p.
- CALDERÓN, M. G. 1998. Aspectos etnobotánicos, químicos y microbiológicos de *Alternanthera repens*. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Biológicos. Instituto Politécnico Nacional. México.
- CANALES, M. G. 2000. Actividad antibacteriana de la planta *Alternanthera caracasana* HBK (tianguis). Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- CARVAJAL, P., A. 1990. Plantas que curan plantas que matan. Editorial Pax. México. Pp: 30-41
- ESPIGA, M., G. 2004 Central de Asturias. Dpto. de Medicina. Universidad de Oviedo. [En red] - .lasalud.com.
- FATCHI, M., FARIFTCH, F.,FATCHI, Z. 2004. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. Journal of Ethnopharmacology. 91. 321-321.
- FLORES Y TRONCOSO, F. De A. 1982. Historia de la medicina en México desde la época de los indios hasta la presente. Editorial Facsimilar. Instituto del Seguro Social. México. 1:93-250.

- ^aGARÍN, A. M. E., SEGURA, C. D., SOTO, H. M., VALENCIA, T. G. 2001 XV Congreso Mexicano de Botánica. Actividad Antibacteriana y Espasmolítica de extractos de *Alternanthera repens* (L.) Kuntze. México.
- ^bGARÍN, A. M. E., VALENCIA, T. G. SEGURA, C. D., IBARRA, I. D. 2001. Reducción de la fuerza de contracción del íleon y efecto antimicrobiano de extractos de *Alternanthera repens* (L.) Kuntze. Productos Naturales Perspectivas Biotecnológicas. Universidad Autónoma de Metropolitana. 5: 26-33.
- GILANI, A., H., ZAMAN, M., LATEFF, A. 1994. Hypotensive and spasmolytic activities of crude extract of *Cyperus scariosus*. Archives of Pharmacology Reserch. 17(3): 145-149.
- GUYTON, A., HALL, J. 1998. Tratado de Fisiología Médica. Interamericana McGraw-Hill. México. Pp: 103-112.
- HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. 1999. Bioactivity in plants: the link phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 30 (12):3864-3874.
- HARPER, A., MURRIA, K. R., MAYES, P. M., RODWELL, W. V. 1992. Bioquímica de Harper. 12ª. Edición. Manual Moderno. México. Pp: 643-647.
- HERNÁNDEZ, Z. A. 1996. Estudio de la actividad antidiarreica de diferentes extractos de *Hamelia patens*, *Alternanthera repens* y *Waltheria americana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- JAMES, M. 2004. Native, from Navasota Flora. (whole plant) [En red] - www.botany.cs.tau.edu

- LOPATEGUI, C., E. 2004. [En red] -www.saludmed.com
- LOZOYA, M., LOZOYA, X., GONZÁLEZ, J., MARTÍNEZ, M. 1990. Efecto producido por la fracción de alcaloides de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuitle) sobre el reflejo peristáltico del ileon del cobayo. Archivos de Investigación Médica. México. 21(2): 171-14.
- LOZOYA, X., BECERRIL, G., MARTÍNEZ, M. 1990. Modelo de perfusión intraluminal del ileon de cobayo *in vitro* en el estudio de las propiedades antidiarréicas (Psidium guayaba) Archivos de Investigación Medica. 21(2): 155-162.
- TAPIA-PÉREZ., M., E., TAPIA-CONTRERAS., R., CEDILLO-RIVERA. L., OSUNA, M. MECKES. 2003. Screening of Mexican Medicinal Plants for Antiprotozoal Activity-Part II. Pharmaceutical Biology. 41(3):180-183
- MÉNDEZ, D. M. 2000. Extractos de plantas medicinales con propiedades relajantes sobre la musculatura lisa del ileon de cobayos. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- MURAD, F. 1990. Drugs used for the treatment of angina. The pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman and Gilman's. 8ª. Edición. Pergamom Press. 774p.
- REDDY, H., WATSON, N., FORD, A., EGLIN, R. 1995. Characterization between M₂ receptors and α -adrenoceptor subtypes in guinea-pig isolated ileum. British Journal of Pharmacology. 114:49-56.
- REYES, S. J., L., JARAMILLO, J. F. 1990. Manual de ejercicios experimentales de farmacología. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México.

- RZEDOWSKI, J., RZENDOWSKI, G., 1990. Flora fanerogámica del Valle de México. México. Pp: 144-146; 387p.
- SONOKO, R., G., SPERANZA, C., PIZZA, N. DE TOMMASI. 1999. Triterpenos saponinas from *Alternanthera repens*. Phytochemistry. 51: 1043-1047. ➤
SONOKO, R., G., SPERANZA, C., PIZZA, N. DE TOMMASI. 1999. Triterpenos saponinas from *Alternanthera repens*. Phytochemistry. 51: 1043-1047.
- TASCÓN, R. 1997. Contribución al estudio de la Flora de San Nicolás Totoloapan. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- TRIGGLE, D.,J. 1985. Calcium ions and respiratory smooth muscle function. British Journal of Clinical Pharmacology. 114:49:56.
- TORTORA, G. J., ANOGNOSTAKOS, N. P. 1989. Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial Harla. México. Pp: 246-251.
- SECRETARIA DE RELACIONES EXTERIORES. 2003. [En red] www.sre.gob.mx
- WALSH, Jr., SINGER, J., J. 1980. Calcium action potentials in single freshly isolated smooth muscle cells. Americans journal of Physiology. 239: C162-C174
- ZAVALA, M. A., PÉREZ, S. VARGAS, R. Y PÉREZ, R. M 1998. Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens* . Journal of Ethnopharmacology. 61:41-47.

10.-GLOSARIO

ANTAGONISTA: Fármaco que al interactuar con otro disminuye alguno de los efectos de este último. Sustancia que tiende a anular acción de otra (agonista) por unión competitiva a los mismos receptores.

ANTIBACTERIANA: Se refiere a la concentración al agente antibiótico necesario para producir cambios morfológicos en las bacterias. Productos químicos que destruyen o inhiben el crecimiento bacteriano en concentraciones sin peligro significativo para el huésped; en consecuencia pueden ser empleados como agentes quimioterapéuticos para prevenir y tratar las afecciones bacterianas.

DIAFORETICO: Efecto provocado por hierbas medicinales que aumentan las secreciones sudorativas. Transpiración excesiva, sudoración.

DIARREA: Se define como la presencia de heces acuosas, poco compactas y frecuentes se caracteriza por la evacuación frecuente de heces acuosas, lo que provoca una escasa absorción de agua y nutrientes. Puede ir o no acompañada de dolor, debilidad, náuseas, vómitos, espasmos abdominales (retortijones), fiebre o pérdida de apetito. Se considera una condición crónica (continua o prolongada) cuando este tipo de heces se presentan durante más de 4 semanas.

DIURÉTICO: Agente o medicamento que tiene la acción de aumentar la excreción de electrolitos y volumen de agua de orina. Agente que aumenta la velocidad de formación de orina en el organismo.

ESPASMOLITICO: Sustancia que impide los espasmos de los órganos huecos como el estómago, la vesícula biliar y la vejiga urinaria, evitando cólicos.

EXTRACTO: Es una forma de obtener principios activos de plantas o animales, consiste en poner a la planta o al animal con algún disolvente, así el principio activo pasa de la planta o animal al solvente de manera que se obtenga un extracto líquido.

GASTROENTERITIS: Diarrea infecciosa aguda de origen bacteriano, viral o parasitaria. Inflamación aguda de la mucosa del estómago y del intestino, caracterizada por anorexia, náuseas, diarrea, vómitos, dolor abdominal y debilidad.

PERISTALSIS: Movimiento y contracción del intestino que permite el progreso del bolo digestivo.

RECEPTOR: Son componentes moleculares específicos de un sistema biológico con los cuales los medicamentos interactúan para producir cambios en la función del organismo.