

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA.**

CARRERA DE BIOLOGÍA.

TESIS.

ACTIVIDAD ANALGÉSICA DE LA CÍCADA *Dioon edule* Lindley.

Asesor:

Dr. José Guillermo Avila Acevedo.

Alumno:

Arturo Gerardo Vélez Contreras.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice General.

1. Resumen-----	3
2. Introducción -----	4
2.1. Dolor-----	4
2.1.1. ¿Qué es el dolor?-----	4
2.1.2. Causas del dolor -----	4
2.1.3. Vías del dolor-----	4
2.1.4. Evaluación del dolor-----	5
2.2. Fármacos analgésicos-----	7
2.2.1. Clasificación de los analgésicos -----	8
2.2.2. Aspectos generales de los analgésicos -----	8
2.2.2.1 Antiinflamatorios no esteroidales -----	8
2.2.2.2 Antiinflamatorios esteroidales (corticosteroides) -----	10
2.2.2.3 Prostaglandinas -----	11
2.2.2.4 Drogas opióides -----	12
2.2.2.4.1 Opióides agonistas fuertes-----	13
2.2.2.4.2 Opióides agonistas moderados-----	13
2.2.2.4.3 Mezcla de opióides agonistas-antagonistas-----	13
2.2.2.4.4 Opióides antagonistas-----	13
2.2.2.5 Péptidos opióides y receptores -----	14
2.3. Los alcaloides -----	14
2.4. Etnobotánica / Etnomedicina -----	17
2.5. Cícdas-----	19
3. Antecedentes-----	20
4. Justificación-----	21
5. Hipótesis-----	21
6. Objetivos-----	21
7. Material y método-----	22
7.1. Extracción-----	22
7.2. Evaluación de la analgesia -----	22
7.3. Reacciones coloridas-----	23
7.3.1. Prueba de Liebermann-Buchard-----	23
7.3.2. Prueba de Roshenhaim-----	24
7.3.3. Prueba de Salkowski-----	24
7.3.4. Prueba de Cloruro-férrico -----	24
7.3.5. Prueba de Meyer -----	24

7.3.6. Prueba de Dragendorff-----	24
7.4. Evaluación analgésica de la fracción alcaloidal-----	25
8. Diagrama experimental-----	26
9. Resultados y discusión-----	27
9.1. Primera extracción de la cicada <i>Dioon edule</i> -----	27
9.1.1. Rendimiento de extractos-----	27
9.1.2. Efecto analgésico de los extractos de <i>D. edule</i> -----	28
9.2. Segunda extracción de cicada <i>D. edule</i> -----	29
9.2.1. Identificación de grupos funcionales-----	29
9.2.2. Rendimiento de extractos concentrados-----	30
9.2.3. Efecto analgésico de la fracción alcaloidal-----	31
10. Conclusiones -----	33
11. Referencias-----	34

Índice de figuras.

Figura 1. Proceso del dolor-----	5
Figura 2. Intensidad del dolor-----	6
Figura 3. Herbolaria mexicana-----	18
Figura 4. <i>Dioon edule</i> Lindley-----	18
Figura 5. Capacidad analgésica de diferentes extractos de la cicada <i>D. edule</i> -----	27
Figura 6. Efecto analgésico de la fracción alcaloidal de <i>D. edule</i> -----	31

Índice cuadros.

Cuadro 1. Expresión del dolor-----	6
Cuadro 2. Algunos analgésicos y derivados-----	9
Cuadro 3. Acción farmacológica de algunos alcaloides-----	16
Cuadro 4. Clasificación taxonómica de <i>D. edule</i> -----	18
Cuadro 5. Tabla de rendimiento de los extractos (peso/peso)-----	26
Cuadro 6. Pruebas coloridas para alcaloides-----	28
Cuadro 9. Tabla de rendimiento de la fracción alcaloidal (peso/peso)-----	29

1. Resumen

Aproximadamente el 80% de la población mundial depende de un sistema alternativo a la medicina alópata, basado en plantas medicinales, este es el caso de México. Las hojas de algunas cícadas se utilizan en la medicina tradicional para atenuar los dolores de cabeza. Cycadaceae es una familia con 9 géneros y cuenta con más de 100 especies. Ellas se parecen a las palmas en apariencia y hábitat, tienen troncos cilíndricos y corona de muy largas, bastas y plumeadas hojas.

En el presente trabajo se analizó la capacidad analgésica de la cícada *Dioon edule*, las hojas de la planta fueron secadas y mediante maceración con diferentes solventes (hexano, acetato de etilo y metanol) se obtuvieron extractos de diferente polaridad. La evaluación de la analgesia se basó en estimulantes químicos (ácido acético), usando como modelo biológico ratones. El extracto hexánico tuvo efecto analgésico en ratones tratados con ácido acético. Se realizaron reacciones de coloración para identificar los grupos funcionales de los compuestos presentes en el extracto hexánico siendo positivas para la presencia de alcaloides, terpenos y esteroides. Se obtuvo la fracción alcaloidal de la cícada, esta fracción fue usada para evaluar analgesia, los resultados indican que *D. edule* provoca un efecto analgésico, concluyendo que el extracto hexánico y la fracción alcaloidal de la cícada *D. edule* tienen un efecto analgésico debido a la presencia de alcaloides, terpenos y esteroides que pueden ser responsables de esta capacidad.

Palabras clave: alcaloides, analgésico, cícada, *Dioon edule*, dolor.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Dolor.

2.1.1 ¿Que es el dolor?

El comité de taxonomía de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (AIED) define el dolor como "una experiencia sensorial y/o emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial" (Ruiz, 2003).

2.1.2 Causas del dolor.

El dolor que acompaña a la inflamación y a la lesión de los tejidos deriva de la estimulación local de fibras del dolor, incrementado por la sensibilidad a él (hiperalgesia) en parte a causa de una mayor excitabilidad de las neuronas centrales en la medula espinal (Hardman et al, 2007).

2.1.3 Vías del dolor.

La exposición a un estímulo nocivo primario activa las neuronas aferentes y generan potenciales de acción que son conducidos dentro de los nervios dorsales, donde las neuronas producen la sustancia P, glutamato y otros neurotransmisores. Esta estimulación interneuronal, a su vez activa neuronas espinotálamicas contralaterales que transmiten los impulsos del dolor por la vía de ascendencia de la ruta del dolor a la medula, cerebro medio, tálamo, estructuras límbicas y corteza (Figura 1), (Brenner, 2000).

La neurona aferente primaria está constituida generalmente de fibras A δ y fibras C, que son responsables de agudizar el dolor y aliviarlo respectivamente. Los reflejos espinales activados por estas fibras pueden acelerar el declive de un estímulo nocivo antes de que el dolor sea reconocido por las estructuras cerebrales. Las proyecciones a los sensores de la corteza alertan a un individuo de la presencia y localización anatómica del dolor, mientras que las proyecciones para las estructuras límbicas permiten al individuo experimentar un malestar, sufrimiento u otra reacción emocional para el dolor (Brenner, 2000).

La activación de neuronas espinotálamicas en los cordones espinales pueden ser bloqueados por vías inhibitorias ascendentes desde el cerebro medio y por las fibras sensoriales A β surgiendo en tejidos periférico. Estos dos sistemas constituyen las bases neurológicas de una hipótesis del dolor llamada hipótesis de la entrada. Según esta hipótesis, la transmisión del dolor por las neuronas espinotálamicas pueden ser moduladas o entradas, por la activación de otras neuronas y sus neurotransmisores. Esta hipótesis desencadena la búsqueda por sustancias endógenas opióides y eventualmente adelantar al descubrimiento de las encefalinas y otros péptidos opióides y sus receptores (Brenner, 2000).

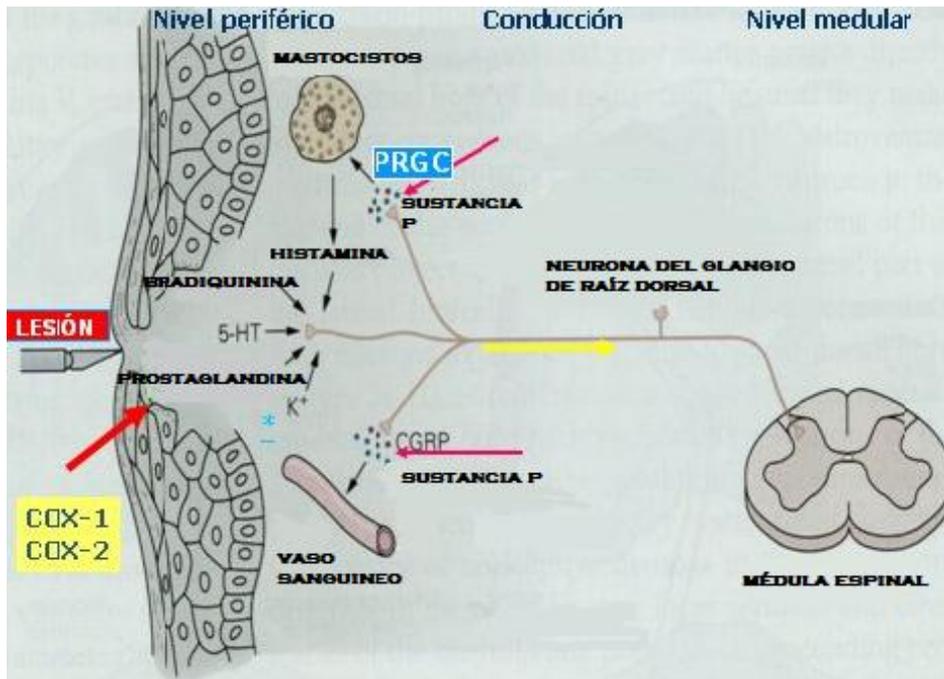


Figura 1. Proceso del dolor.

<http://www.mednet.cl/link.cgi/Medwave/Cursos/1654>

2.1.4 Evaluación del dolor.

Se ha llevado a la necesidad de evaluar el dolor en grados de intensidad, expresión y tipo. Esta evaluación tiene como objetivo diagnosticar la causa, comprender el impacto, identificar apropiadamente el dolor, estrategias de alivio y evaluar su eficacia (Briggs, 2010).

El tratamiento exitoso del dolor es una tarea dinámica que comienza con la detección de la causa y magnitud del dolor. La intensidad del dolor experimentado por el paciente a menudo se describe en términos de una escala visual análoga (EVA) con descripciones en palabras que van desde no dolor "0" hasta dolor extremo "10" (Figura 2), (Katzung, 2005).

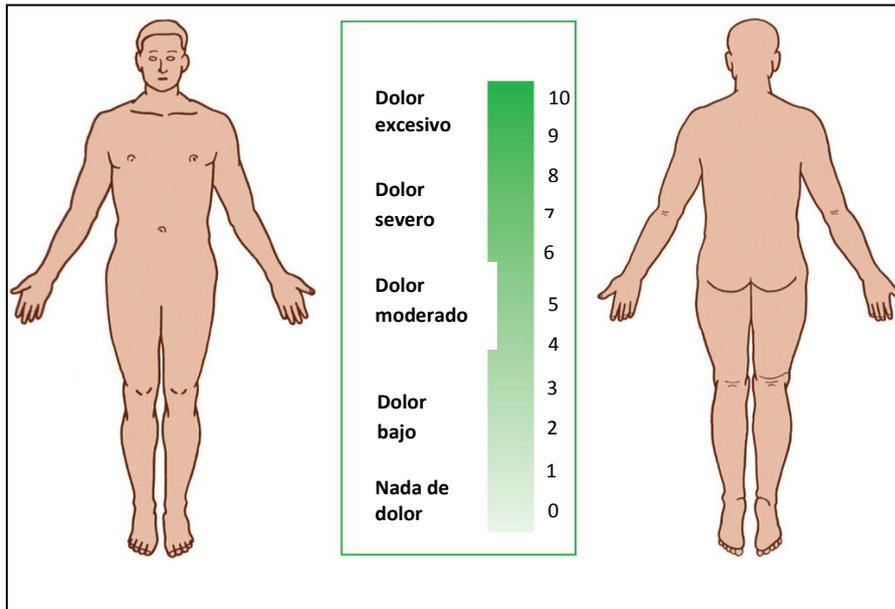


Figura 2. Intensidad del dolor, tomado de Katzung, 2005.

Se puede usar una escala similar a la anterior con niños y con pacientes que no pueden hablar, esta escala ofrece cinco rostros que van desde el sonriente “no dolor” hasta el llanto “dolor máximo” (Cuadro 1) (Katzung, 2005).

Cuadro 1. Expresión del dolor (Katzung, 2005).

LA EXPRESIÓN DE DOLOR:

Vocalizaciones - los informes verbales del dolor (llorando, gimiendo, gritando).

Movimiento - movilidad reducida, fricción, protección o inmovilización del área del dolor, los espasmos musculares, cojeando.

Expresiones facial - una mueca de dolor, muecas, fruncir el ceño.

Humor y el comportamiento - angustia, ansiedad, depresión, irritabilidad, la agresión, la reducción de la función cognitiva, disminución del apetito, falta de sueño, confusión.

En el dolor severo, la administración de analgésicos comúnmente se considera parte fundamental de todo plan de manejo. Debe determinarse la vía de administración (oral, parental, neuraxial); la duración de la acción del medicamento, el efecto máximo (máxima actividad intrínseca), duración del tratamiento, el potencial de aparición de efectos indeseables y las experiencias anteriores del paciente (Katzung, 2005).

Para facilitar la selección de una apropiada medicación ya sea analgésico o anestésico, los pacientes son usualmente cuestionados para describir su dolor en términos de intensidad, duración y localización. En algunos casos, los pacientes se quejan de dolor intenso, agudo y punzante. En otros casos describen un dolor pesado, quemante y achaques. Estos dos tipos de dolor son transmitidos predominantemente por diferentes tipos de neuronas. El dolor puede ser además distinguido en base si éste tiene un origen somático, visceral o neuropático. El dolor somático es a menudo bien localizado en una zona dermal específica, subcutánea o tejido músculo esquelético. El dolor visceral es originario en el tórax o estructura abdominal, es a menudo mal localizado y puede ser referido para estructuras somáticas. Por ejemplo, el dolor cardíaco es frecuente referirlo al mentón, cuello, hombro o brazo. El dolor neuropático es usualmente causado por daño nervioso, como resultado de la compresión nerviosa o inflamación. El dolor neuropático es característico, por ejemplo de neuralgia trigeminal (tic doloroso) y neuralgia postherpética (Brenner, 2000).

2.2 Fármacos analgésicos.

Aunque la utilización de plantas y minerales para restablecer la salud perdida, modificar la conducta, etc., se conoce desde la antigüedad, los medicamentos con el sentido y forma en que los conocemos actualmente son relativamente recientes y más concretamente, de los últimos 60 años (Avendaño, 2001).

El arsenal terapéutico del que actualmente dispone la humanidad se ha desarrollado a partir de un pequeño número de compuestos químicos que se consideran prototipos, que en química farmacéutica se denomina "cabezas de serie". En la búsqueda o diseño de éstos, así como en sus modificaciones, se puede llegar a compuestos más eficaces y con menos efectos secundarios (Avendaño, 2001).

Existen tres categorías generales de fármacos que pueden ser administrados para aliviar o prevenir el dolor (Brenner, 2000):

- Los analgésicos. Son usualmente administrados por vía oral o parentalmente y son capaces de aliviar el dolor sin causar la pérdida de conciencia.
- Los anestésicos generales. Son agentes que son administrados por inhalación o parentalmente causando la pérdida de conciencia durante la cirugía.
- Los anestésicos locales. Son aplicados tópicamente o inyectados en la zona donde se origina el dolor, y previenen la transmisión de los impulsos de dolor al cordón espinal y cerebro.

Los analgésicos son fármacos capaces de aliviar el síntoma del dolor, especialmente el de tipo somático, así como provocar descenso de temperatura (rápido y neto) en sujetos febriles. Muchos de ellos actúan también como

antiinflamatorios. Actúan deprimiendo el tálamo óptico (uno de los centros de las sensaciones dolorosas) y además sobre el centro hipotalámico de la termorregulación (Ruiz, 2003).

2.2.1 Clasificación de los analgésicos.

Basándose en el mecanismo de acción, los analgésicos pueden ser clasificados como analgésicos opioides o analgésicos no opioides (Brenner, 2000).

Los analgésicos no opioides actúan principalmente en tejido periférico para inhibir la formación de impulsos de dolor por estímulos nociceptivos, y ejerciendo sus efectos por la vía de inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Brenner, 2000).

Los analgésicos no opioides son caracterizados por (Ruiz, 2003):

- a) No ser inductores del sueño.
- b) Ser inoperantes frente a determinados dolores (viscerales).
- c) No provocar tolerancia ni dependencia.

En adición a lo revisado de dolor, la mayoría de los analgésicos no opioides también exhiben una significativa acción antiinflamatoria y antipirética, y se dividen en antiinflamatorios no esteroideos y antiinflamatorios esteroideos (Brenner, 2000).

Los analgésicos opioides en contraste, actúan principalmente en el cordón espinal y cerebro para inhibir la neurotransmisión del dolor (Brenner, 2000).

Los analgésicos opioides son caracterizados por (Ruiz, 2003):

- a) Ser hipnoinductores.
- b) Actuar sobre todo tipo de dolor.
- c) Producir tolerancia y dependencia.

2.2.2 Aspectos generales de los analgésicos.

2.2.2.1 Antiinflamatorios no esteroideos.

Los antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos son un grupo heterogéneo de compuestos, a menudo sin relación química (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comparten algunas acciones terapéuticas y efectos adversos. El compuesto prototípico sería el ácido acetil salicílico (aspirina) y en algunos señalamientos se le conoce como “fármacos similares a la aspirina” pero el nombre más usado es el de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) (Hardman et al, 2007).

Los AINES comprenden una larga familia de fármacos débilmente acidificadas de quien resultan los efectos farmacológicos (Brenner, 2000). El principal mecanismo de acción que estos compuestos es la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) (Hardman et al, 2007). El bloqueo es diferente dependiendo del tipo de AINES (Ruiz, 2003). La COX es una enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de prostaglandinas originadas del ácido araquidónico y otros 20 ácidos grasos. El ácido araquidónico es

liberado a partir de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa A₂, una enzima que es activada por trauma físico y varios estímulos químicos (Brenner, 2000).

La inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas por los AINES, depende únicamente de que el analgésico llegue a la enzima prostaglandina sintetasa (COX), y por esto que la distribución y la farmacocinética de cada agente tienen gran importancia en la actividad del analgésico (Hardman et al, 2007). Por ejemplo, la aspirina (AAS) acetila de manera irreversible la COX, junto con algunas subclases estructurales de los analgésicos (Cuadro 2), incluidos algunos derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno), derivados del ácido acético (indometacina) y ácidos fenólicos (piroxicam), todos los cuales compiten en forma irreversible con el ácido araquidónico (AA) que sirve de sustrato en el sitio activo de la COX-1 y la COX-2 (Hardman et al, 2007).

Cuadro 2. Algunos analgésicos y derivados, tomado de Ruiz, 2003.

Derivados Ácido Salicílico
—Ácido acetil salicílico (AAS)
—Salicilatos: sodio, metilo y etilo
—Ácido gentísico y resorcílico
Derivados de Amina
—Acetanilida
—Fenacetina
—Acetaminofeno (Paracetamol)
Derivados Pirazol
—Antipirina, Aminopirina, Dipirona
—Fenilbutazona, Oxifonbutazona
Derivados Ácido Antranílico
—Ácido mefenámico
—Flufenámico
Derivados Ácido fenilisopropilacético
—Naproxeno
—Ibuprofeno
—Ketoprofeno

Los AINES además actúan para inhibir la proliferación de células B y T por mecanismos que no implican la inhibición de la COX y formación de prostaglandinas. Por ejemplo, los AINES pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios por inhibición de la señal de transducción de la proteína G y la activación de fosfolipasa C en leucocitos y por eso disminuyen la adhesión de células en el tejido inflamado (Brenner, 2000).

Gran parte de los AINES se absorben de manera rápida y completa en la vía gastrointestinal y alcanzan concentraciones máximas en 1 a 4 hrs. La presencia de alimentos tiende a retrasar la absorción sin modificar la concentración máxima (Hardman et al, 2007).

Hay una serie de síntomas en el dolor que no son explicables por esta teoría y se postulan otras hipótesis alternativas como (Ruiz, 2003):

- Modificación de la conformación de la proteína G en su unión con mediadores excitadores.
- Modulación de la síntesis de glutamato en las neuronas aferentes.
- Regulación del receptor NMDA (receptor NMDA: receptor ionotrópico de glutamato, un neurotransmisor que actúa como componente prioritario en la plasticidad neuronal y memoria).

Además de compartir muchas actividades terapéuticas, los AINES tienen en común algunos efectos adversos indeseables. El más frecuente es la propensión de éstos a inducir úlceras gástricas o intestinales, que a veces se acompañan de anemia por la pérdida hemática resultante. Otros efectos adversos de estos productos, que resultan del bloqueo de la síntesis de prostaglandinas endógenas y tromboxano A₂, incluyen perturbaciones de la función plaquetaria, prolongación de la gestación con el trabajo de parto espontáneo, cierre prematuro del conducto arterioso persistente y cambios en la función renal.

2.2.2.2 Antiinflamatorios esteroidales (corticosteroides)

Los corticosteroides se encuentran en la actualidad dentro de los medicamentos de mayor uso para muchas enfermedades, debido a su capacidad para ejercer efectos sobre casi todos los sistemas y a la diversidad de sus acciones (Hardman et al, 2007).

Los corticosteroides y sus derivados sintéticos biológicamente activos difieren en sus actividades metabólicas (glucocorticoides). Los glucocorticoides son potentes supresores de inflamación. Estos pueden evitar o suprimir la inflamación en respuesta a múltiples fenómenos incitantes, entre ellos, estímulos radiantes, mecánicos, químicos, infecciosos e inmunitarios. Aunque el uso de glucocorticoides como antiinflamatorios no ataca la causa fundamental de la enfermedad, la supresión de la inflamación posee enormes utilidad clínica (Hardman et al, 2007).

Los glucocorticoides inhiben a la fosfolipasa A₂ (la inhibición de la fosfolipasa A₂ disminuye la liberación del ácido graso precursor y, con ello, la síntesis de todos los metabolitos derivados), pero al parecer tal acción la efectúan de manera indirecta al inducir la síntesis de un grupo de proteínas llamadas anexinas (anteriormente llamadas lipocortinas), que modulan la actividad de fosfolipasa A₂. Sin embargo, los glucocorticoides regulan la expresión de COX-2, pero no la de COX-1. Por todo lo expresado, es concebible que la dosis terapéuticamente eficaces de glucocorticoides como antiinflamatorios guarden una relación más estrecha con su potencia para suprimir la expresión de COX-2 inducida por citocina, en comparación con su potencia para inhibir a la fosfolipasa (Hardman et al, 2007).

La importancia de estos inhibidores de COX-2 en particular representar un proceso importante en el tratamientos de trastornos inflamatorios, y se han vuelto productos de enorme interés como agentes para evitar o tratar otros trastornos que se acompañan de sobreexpresión de COX-2, como el cáncer de colon (Hardman et al, 2007).

2.2.2.3 Prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PGs) son una familia de sustancias de naturaleza hormonal que se sintetizan en varios lugares del cuerpo y que intervienen en multitud de procesos fisiológicos. Participan, por ejemplo, en el control del tono muscular, la contracción del útero, y en los mecanismos de agregación de las plaquetas (Ruiz, 2003). A las familias de las prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares se llaman eicosanoides porque derivan de ácidos grasos esenciales de 20 carbonos que contienen tres, cuatro o cinco dobles ligaduras (Hardman et al, 2007). La mayor biosíntesis de los eicosanoides es regulada de manera precisa y surge en reacción a muy diversos estímulos físicos, químicos y hormonales (Hardman et al, 2007).

Las PGs además juegan un rol importante en el desarrollo del dolor, inflamación y fiebre. Las PGs sensibilizan los nervios sensoriales para una estimulación nociceptiva y por eso amplifican la formación de un impulso del dolor. Ellas además promueven la inflamación de tejido por estimulación de células inflamatorias a través de quimiotaxis, causando vasodilatación e incremento en la permeabilidad capilar y edemas (Brenner, 2000).

La fiebre, definida como la elevación de la temperatura corporal por encima de los 37°C, a menudo es resultado por una alteración del mecanismo termoregulatorio del hipotálamo. Las toxinas bacterianas y otros pirógenos estimulan la producción de citocinas por parte de los leucocitos, estas citocinas incrementan la síntesis de PGs en

el área preoptica del hipotálamo. Las PGs actúan entonces en la incrementación térmica del cuerpo por encima de los 37°C (Brenner, 2000).

Las PGs al participar en la patogenia de la inflamación y la fiebre, reforzaron la sugerencia de que la inhibición de la biosíntesis de estos autacoides podía explicar las acciones clínicas de los AINES (Hardman et al, 2007). Todos los AINES alivian la fiebre por la inhibición de la síntesis de PGs en el hipotálamo, pero estos fármacos no son capaces de reducir la temperatura corporal por debajo de lo normal (Brenner, 2000).

Las PGs tienen establecidos los siguientes puntos de importancia: 1) todos los tipos de células mamíferas estudiadas tienen enzimas microsomales para la síntesis de PGs. 2) las PGs siempre se liberan cuando las células sufren daños, y se han detectado en mayores concentraciones en los exudados inflamatorios. Las células no almacenan PGs y por ello su liberación depende de la biosíntesis de novo. 3) todas las drogas tipo aspirina inhiben la biosíntesis y la liberación de las PGs en todas las células estudiadas (Hardman et al, 2007).

2.2.2 4 Drogas opióides.

Los opiáceos son fármacos derivados del opio, y comprende los productos naturales morfina, codeína, tebaína y muchos congéneres semisintéticos derivados de ellos. La palabra opio que deriva de opos, la palabra griega jugo; la droga derivaba del jugo de la amapola de opio, (*papaver somniferum*) (Hardman et al, 2007).

Las drogas opióides pueden ser clasificadas como agonistas puros, mezcla agonista-antagonista o antagonistas puros (Brenner, 2000).

Basándose en su eficacia clínica, los agonistas puros pueden ser caracterizados como fuertes o moderados agonistas. En modelos de experimentación del dolor, todos los agonistas puros ejercen el mismo efecto analgésico maximizado (Brenner, 2000).

En los humanos, los opióides agonistas fuertes son tolerados cuando son tomados en dosis suficientes para aliviar el dolor severo. Como siempre, los opióides moderados pueden causar efectos de intolerancia si son tomados en dosis suficientes para aliviar el dolor que es severo. Por esta razón, los agonistas moderados son administrados en dosis submaximizadas para el tratamiento del dolor leve a moderado, y usualmente los agonistas moderados se toman en combinación con analgésicos no opióides para incrementar la efectividad clínica (Brenner, 2000).

Las combinaciones opióides agonistas-antagonistas son drogas analgésicas que tienen combinaciones parciales de agonistas y antagonistas, con una actividad

antagonista y un variado grado de afinidad para el diferente subtipo de receptor opióide (Brenner, 2000).

Los antagonistas puros no tienen efectos analgésicos. Son usados para contrarrestar los adversos efectos de opióides tomados en sobredosis (Brenner, 2000).

2.2.2.4.1 Opióides agonistas fuertes.

Los opióides agonistas fuertes incluyen a drogas de origen natural como la morfina, y drogas sintéticas como el fentanil, meferidina y metadona. Estas drogas tienen efectos analgésicos equivalentes pero difieren en sus propiedades farmacocinéticas, efectos adversos y usos (Brenner, 2000).

2.2.2.4.2 Opióides agonistas moderados.

Los opióides agonistas moderados son menos potentes que los opióides agonistas fuertes. Porque estos no producen una analgesia general al ser medicados y son bien tolerados por los pacientes, los agonistas moderados son empleados en dosis submaximizadas, casi siempre en combinación con un analgésico no opióide. Una dosis combinada bien establecida contienen como producto uno de los opióides agonistas moderados y acetaminofen, aspirina o ibuprofeno, son disponibles para el tratamiento de la modulación del dolor (Brenner, 2000).

2.2.2.4.3 Mezcla de opióides agonistas-antagonistas.

La mezcla de opióides agonistas-antagonistas son drogas que muestran una parcial actividad agonistas o antagonistas para los receptores μ y presentan una actividad agonistas o antagonistas para los κ receptores. Unos ejemplos son el buprenorfina, butorfanol, nalbufina y pentazocina (Brenner, 2000).

2.2.2.4.5 Opióides antagonistas.

La naloxona y la naltrexona son competitivos receptores opióides antagonistas que pueden rápidamente revertir los efectos de la morfina y otros opióides agonistas. Los antagonistas tienen dos usos clínicos primarios: el tratamiento de sobredosis de opióides y la prevención y el tratamiento de la dependencia y adicción de los opióides. Naltrexona ha sido usado en el tratamiento de la dependencia al alcohol (Brenner, 2000).

La naloxona y la naltrexona son químicamente análogos de la morfina, tienen una estructura larga sustituyendo en la cima un átomo de nitrógeno, y esta sustitución previene la formación de bandas entre la droga y el receptor que son requeridas para la actividad agonista (Brenner, 2000).

Se sabe bien que los opióides, como la heroína y la morfina, ejercen sus efectos al imitar sustancias naturales, llamadas péptidos opióides endógenos o endorfinas (Hardman et al, 2007).

2.2.2.5 Péptidos opióides y receptores.

Se sabe que durante siglos los extractos de opio a partir de la amapola han sido usados para aliviar el dolor y tratar la diarrea. Durante el siglo 19, la morfina fue obtenida a partir del opio, y sus efectos farmacológicos fueron caracterizados y cuantificados. Después los receptores opióides fueron identificados como sitios específicos para la morfina y otros opióides agonistas unidos en orden para obtener sus efectos farmacológicos. La presencia de receptores esterosselectivos de morfina en el tejido cerebral indica la probabilidad de un endógeno ligado para estos receptores, y esta ventaja eventualmente ayudo para el descubrimiento de las tres mayores familias de péptidos opióides: encefalinas, endorfinas y dinorfinas (Brenner, 2000).

Los péptidos opióides son derivados a partir largos precursores proteínicos que están extensamente distribuidos en el cerebro (Brenner, 2000). Esos precursores, preproopiomelanocortina, preproencealina y preprodinorfina, están codificados por tres genes correspondientes. Cada precursor queda sujeto a complejas divisiones y modificaciones después de la traducción, lo que da por resultado la síntesis de múltiples péptidos activos. Los péptidos opióides comparten la secuencia amino terminal común de Tir-Gli-Gli-Fe (Met o Leu), que se ha denominado motivo de opióides. Este va seguido por varias extensiones C-terminal que producen péptidos que varían de 5 a 31 residuos. El principal péptido opióide derivado de la proopiomelanocortina (POMC) es la β -endorfina (Hardman et al, 2007).

Las endorfinas y dinorfinas son péptidos largos, mientras que las encefalinas son pequeños péptidos conteniendo cinco aminoácidos. En cada encefalina, cuatro de los cinco aminoácidos son los mismos, y el quinto puede ser metionina o leucina. Por lo tanto, los dos tipos de encefalinas son llamadas met-encefalina y leu-encefalina (Brenner, 2000).

Los receptores opióides han sido clasificados como receptor mu (μ), receptor delta (δ) o receptor kappa (κ), basándose en la afinidad relativa que mostraron con ligandos experimentales. Como siempre el uso clínico de los analgésicos opióides tiene una limitante selectiva por los subtipos de opióides receptores. El receptor μ se presenta a mediar más los efectos farmacológicos de la morfina y otros opióides fuertes agonistas, mientras que el receptor κ son mas activados por de la mezcla de opióides agonistas-antagonistas (Brenner, 2000).

2.3 Los alcaloides.

Los alcaloides comprenden una amplia clase de metabolitos secundarios en las plantas, en el conteo actual se tienen más de 7,000 tipos. El término "alcaloide" quiere decir "sustancia semejante al álcali". Un alcaloide típico es un producto básico de la

planta poseyendo un nitrógeno generalmente contenido en un anillo heterocíclico y exponiendo una marcada actividad farmacológica (Daniel, 2006).

La naturaleza alcalina de los alcaloides es debida al nitrógeno. Los alcaloides pueden contener un solo átomo de N, como la atropina, o puede tener hasta 5, por ejemplo en la ergotamina. El nitrógeno puede producirlo un amino primario (RNH_2), tal es el caso de la mezcalina; un amino secundario (R_2NH), en citocina; un amino terciario, (R_3N), por ejemplo en fisostigmina; o como un ión amonio cuaternario ($\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$) donde se encuentra el clorhidrato de tubocurarina. Excepto en compuestos amonio cuaternarios, el átomo de N posee electrones libres, que vuelve a los alcaloides alcalinos de acuerdo a la teoría de Lewis. El grado de basicidad varía desde leve a moderado hasta fuerte, dependiendo la posición del N en el esqueleto y de otros grupos funcionales. En el citoplasma celular, los alcaloides existen como cationes de las sales de varios ácidos orgánicos (Daniel, 2006).

Aparte del carbono, hidrógeno y nitrógeno, los alcaloides pueden contener también oxígeno. Casi todos son incoloros; exceptuando a la berberina y a la serpentina, que son amarillos y la sanguinarina, que es café – rojizo. Los alcaloides son usualmente insolubles en agua, o parcialmente solubles, pero son solubles en éter, cloroformo (CHCl_3) y otros solventes relativamente no-polares. Sus sales, formadas por tratamiento con ácidos, son solubles en agua pero insolubles en solventes no-polares. Esta propiedad es usada en la extracción, purificación y cuantificación de alcaloides. Los alcaloides pueden ser precipitados fuera de su solución acuosa o ácida por un número de sustancias como el ácido pícrico y el ácido tánico. Casi todos los alcaloides pueden ser sintetizados químicamente (Daniel, 2006).

La mayoría de los alcaloides se producen en las plantas, aunque algunos pocos también son sintetizados en los animales. Estudios presentes indican una dispersión restringida de alcaloides entre algunas plantas. Por ejemplo, la mayoría de las gimnospermas contienen alcaloides. De las angiospermas: las monocotiledonias generalmente no producen alcaloides, con algunas excepciones como la colchicina en la familia Liliaceae, a diferencia de las dicotiledonias, en donde se incluyen la mayoría de los alcaloides encontrados en las familias: Fabaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Berberidaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Menispermaceae y Loganiaceae. Los alcaloides están totalmente ausentes en algunas familias. Usualmente los alcaloides con estructuras complejas son característicos de algunas familias de plantas específicas (Daniel, 2006).

Las plantas usualmente producen una serie de alcaloides que pueden diferenciarse únicamente por ligeras características físicas y químicas. En las plantas, los alcaloides pueden ser sistémicos, por ejemplo, distribuidos a todo lo largo de la planta, o restringidos a órganos específicos como raíces (*Aconita*, *Belladonna*), rizomas y raíces (*Ipecac*, *Hydrastis*), tallos y cortezas (*Chinchona*), hojas (*Hyoscyamus*, *Belladonna*), frutos (*Conium*) o semillas (*Nuxvomica*, *Areca*) (Daniel, 2006).

Desde una revisión químico-taxonomía, los alcaloides están divididos dentro de las siguientes tres clases (Daniel, 2006):

1. Alcaloides verdaderos.

Ellos tienen un nitrógeno en el esqueleto del anillo heterocíclico derivado de un amino biogénico, formado por la descarboxilación de un aminoácido.

2. Protoalcaloides.

Estos son derivados de aminoácidos o aminas biogénicas, producidas por una serie de metilaciones, pero carecen de nitrógeno heterocíclico. El nitrógeno puede estar presente en un lado de la cadena alifática, como en la colchicina.

3. Pseudoalcaloides.

Estos compuestos básicos contienen nitrógeno, pero el esqueleto de carbón es derivado de un mono-, di- o tri- terpeno, esteroides, o acetatos derivados de polímeros.

La clasificación de los alcaloides está usualmente basada en su estructura química. La complejidad estructural maneja rangos desde monocíclicos a heptacíclicos. Esto se debe a esqueletos comunes encontrados en los alcaloides como el indol, la isoquinina, la piridina, la piperidina, la purina, el pirrol, la pirrolidina y los esteroides (Daniel, 2006).

Los probables aminoácidos precursores de los alcaloides son (Daniel, 2006):

- a) Ortinina, en la bioformación de alcaloides como tropano y pirrolidina.
- b) Lisina, en la biosíntesis de alcaloides como piperidina y lupina.
- c) Fenilalanina y tirosina, en el anabolismo de alcaloides y protoalcaloides como isoquinolina.
- d) Triptófano, en la biosíntesis de alcaloides tipo indol y quinolina.

Los alcaloides pueden tener una o más de las siguientes funciones:

- a) Como productos no tóxicos excretados de compuestos tóxicos.
- b) Como reserva de nitrógeno para nutrientes
- c) Como protectoras, con la existencia de venenos para parásitos y defoliadores.
- d) Como reguladores de crecimiento.

- e) Crean basicidad, ayudando a mantener un balance iónico en la planta para sustituir bases minerales.
- f) Como fuente de diversos fármacos para el humano (Cuadro 3).

Cuadro 3. Acción farmacológica de algunos alcaloides (Daniel, 2006).

Alcaloide	Acción farmacológica	Fuente natural
Morfina y codeína	Analgésicos y narcóticos	Papaveraceae
Emetina	Eméticos	<i>Uragoga ipecacoanha</i>
Brucina	Anestésicos centrales	<i>Strychnos nux-vomica</i>
Cocaína	Anestésicos locales	<i>Erythroxylum coca</i>
Pilocarpina	Mióticos	Pilocarpus
Hidrastina	Antihemorrágicos	<i>Hydrastis canadensis</i>
Atropina	Antiespasmódicos	<i>Atropa belladonna</i>
Pelletierina	Vermífugas	<i>Punica granatum</i>
Yohimbina	Afrodisiacos	<i>Pausinystalia yohimbe</i>
Efedrina	Anti-hipotensos	<i>Ephedra distachya</i>
Reserpina	Anti-hipertenso	Rauwolfia serpentina
Quinina	Reprime ataques cardiacos	<i>Chinchona officinalis</i>
Tubocurarina	Paralizante muscular	<i>Chondrodendron tomentosum</i>
Camptotocina	Agentes antitumorales	<i>Camptotheca acuminata</i>

2.4 Etnobotánica / Etnomedicina.

Es indudable que el hombre prehistórico conocía los efectos benéficos o tóxicos de muchas sustancias vegetales y animales, no obstante, la mayoría eran inútiles o perjudiciales (Katzung, 2005).

La cultura china, japonesa, india y nativa americana (norte y sur) tenían un sistema tradicional basado en la medicina herbolaria (Ebadi, 2002). Más del 80% de la población mundial depende de un sistema alternativo a las medicinas alópatas, basándose en las plantas. Excepto por la homeopatía, las actividades curativas de las plantas son evaluadas por sus componentes químicos. Con un estimado de 70000 plantas usadas en la medicina (Daniel, 2006).

En la India, la medicina herbal es parte de su cultura desde la antigüedad, aunque todavía es usada extensamente por el sistema de medicina Ayurvedica (Ebadi, 2002). En el caso del Ayurveda, son utilizadas más de 2000 plantas para curar diferentes malestares (Daniel, 2006). En China y Japón, el uso de los remedios

herbales es oficialmente promovido por el ministerio gubernamental y está incluido en su sistema nacional de salud (Ebadi, 2002). En el caso de China, dependen de 5757 plantas enlistadas en la “enciclopedia de la tradición china en sustancias medicinales”. El sistema coreano y japonés incluyen también una larga lista de plantas medicinales (Daniel, 2006).

En la medicina desarrollada en Mesoamérica en la etapa pre-colombina encontramos ejemplos variados de este empirismo, la más de las veces cubierto de ideas mágico-religiosas. Por lo que corresponde a la medicina Náhuatl han sido dichos aspectos mágico-religiosos los más comentados por los cronistas e historiadores que fueron dejando pasar hechos de observación que seguramente consideraron no eran capaces los antiguos mexicanos de realizar (Viesca, 1978).

Alejado de la influencia teológica y mágica, el “ticitl” libro náhuatl original dejó una observación del fenómeno médico. Las obras de Fray Bernardino de Sahagún y el códice Badiano, considerados como unos de los ejemplos más directos de la medicina náhuatl. Un grupo de hombres de la sociedad náhuatl que dejaron ejemplos de visión realista en su época fueron los médicos, llamados “buenos médicos” por Sahagún. El médico suele curar y remediar las enfermedades; el buen médico es un buen conocedor de las propiedades de las yerbas, piedras, arboles y raíces, experimentando en las curas, también tiene por oficio saber conocer los huesos, purgar, sangrar, sajar al enfermo, dar puntos y al final libar de las puertas de la muerte (figura 3) (Viesca, 1978).

Los médicos aztecas no solo curaban dolencias físicas, sino básicamente “calmaban angustias”. Para que estos hombres pudieran ayudar al enfermo espiritualmente, tuvieron que haber desarrollado una capacidad de observación muy sutil que los llevara a distinguir una enfermedad física de una espiritual (Viesca, 1978).

Mientras que la medicina moderna toma el panorama de que la mente y el cuerpo son entidades separadas, sin embargo, los avances de la medicina moderna puede complementar a la medicina herbal y viceversa (Ebadi, 2002). Utilizando todas estas plantas para el bienestar humano, se tiene sin duda, el concepto de la medicina herbal o fitoterapia (Daniel, 2006).

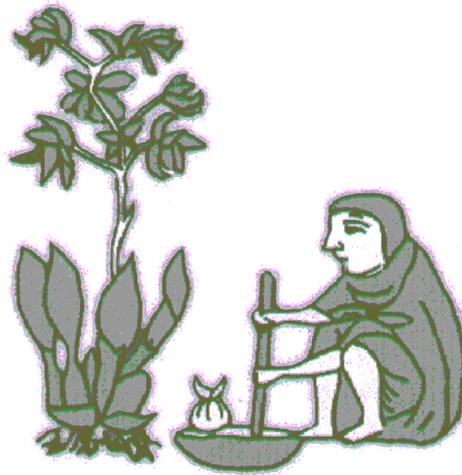


Figura 3. Herbolaria mexicana.

<http://investigacion.izt.uam.mx/maph/>

2.5 Cícadas.

La división Cycadophyta tiene una familia con 9 géneros y cuenta con más de 100 especies (cuadro 4). Ellas se parecen a las palmas en apariencia y hábitat. Tienen troncos cilíndricos y corona de muy largas, bastas y plumeadas hojas. Por esta razón, estas plantas son a menudo confundidas con palmas (figura 4) (Liener, 1969).

Las cícadas tienen órganos reproductores masculino y femenino en plantas separadas, conservan el esperma móvil característico de plantas inferiores. Las cícadas son nativas de los trópicos y subtrópicos, aunque se extienden a las áreas de Australia y Japón (Liener, 1969).



Figura 4. *Dioon edule* Lindley

http://www.about-garden.com/images_data/2825-dioon-edule-cycad.jpg

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *D. edule*

DIVISIÓN	Cycadophyta
CLASE	<i>Cycadopsida</i>
ORDEN	Cycadales
SUB ORDEN	Zamiineae
FAMILIA	Zamiaceae
SUB FAMILIA	Encephalartoideae
GENERO	<i>Dioon</i>
ESPECIE	<i>Dioon edule</i>
NOMBRE COMÚN	Chamal, palma de Teresita, quiotamal.

Las cícadas a menudo sobreviven cuando otros cultivos tienden a destruirse a causa de incendios y por lo tanto pueden servir como una fuente de alimento alternativo. Entre la gente que tiende a usar las cícadas como fuente de alimento, usa regularmente el método de hidrólisis para eliminar las toxinas de la planta, que es de la siguiente manera: las semillas y tallos son cortados a pequeñas piezas y remojadas en agua por varios días; después son secadas y molidas hasta volverlas harina (Klaassen, 2001). Las cícadas son ricas en almidón, que se encuentra en raíz, tronco y semillas, todas ellas tienen una larga historia como fuente de alimento o bien, medicinal (Levetin y McMahon, 2006).

Se tienen reportes de envenenamiento debido al consumo de estas plantas (Keeler, 1983). La cícasina (ácido α -amino- β -metil-aminopropiónico) y la β -metilaminoalanina (BMAA) son distintas toxinas que se encuentran en las cícadas. La cícasina es un glicósido carcinogénico y neurotóxico; BMAA es un aminoácido no proteico que también es neurotóxico (Levetin y McMahon, 2006).

La cícasina es aislada como un principio tóxico, otros azoxiglicósidos son las neo-cícasinas A, B, C, y E. Todos estos compuestos son glicósidos de la misma aglicona, metilazoximetanol (MAM) y agentes neurotóxicos y carcinógenos. El MAM es liberado desde estos glicósidos en cícadas por la acción de una β -glicosidasa, el MAM es un compuesto inestable que se degrada espontáneamente en cantidades equimolares de nitrógeno gaseoso, metanol, y formaldehído (Keeler, 1983).

La actividad de MAM parece actuar directamente en el núcleo celular, particularmente en las divisiones celulares, mientras que la acción neurotóxica de la planta parece dirigirse a los campos distales de los axones terminales (Keeler, 1983).

La cícasina es un carcinógeno conocido, este es el glicósido de metilazoximetanol. La acción primaria de la cícasina es la metilación del ADN, resultando en un extenso rango de efectos como la inactivación del sistema enzimático a la esclerosis lateral amiotrópica (Klaassen, 2001).

3. ANTECEDENTES.

En la medicina tradicional esta planta es usada como agente analgésico, siendo usada en infusiones (Levetin y McMahon, 2006).

Las cícadas son también, usadas en rituales de Sudáfrica, como la cícada morfaka (*Encephalartos transvenosus*) que es reverenciada por la gente balobedu de la provincia de Limpopo en el sur de África. Mientras que los caudillos subterráneos de la cícada *Stangeria eriopus* son usados por varios grupos étnicos de África para propósitos mágicos, donde se elabora una infusión del tallo de esta cícada con otras

plantas. De esta mezcla se rocía alrededor de sus casas para ahuyentar los malos espíritus. Esta misma cícada es también usada en la medicina tradicional como emético, pero la sobreexplotación amenaza las poblaciones de esta especie (Vovides y Pérez, 2005).

La planta de la especie *Dioon edule* es usada en el estado de Nuevo León para curar la neuralgia mediante el cocimiento de las semillas. Esta especie se encuentra en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz y otros estados (Martínez, 1996).

Las cícadas se usan ornamentalmente. Las frondas se utilizan en pequeña escala como adorno en las iglesias en períodos de festividades religiosas. Antiguamente las semillas se empleaban como fuente de harina. La testa vacía de las semillas emite un chillido particular cuando se le ata un hilo y se gira en círculo, se les denomina "rezumbadores" y son usados como juguetes por los niños (Vovides et al., 1983).

4. JUSTIFICACIÓN.

Las semillas de las cícadas han sido utilizadas como alimento suplementando la dieta de las personas en épocas de escasez de alimentos. De las semillas se prepara harina que puede ser almacenada para su consumo posterior.

Paradójicamente, también han sido utilizadas como insecticida o veneno para controlar fauna nociva (roedores) que afectan a los plantíos. Actualmente, su mayor uso es como plantas de ornato por su belleza. En México, las hojas de algunas cícadas se utilizan para decorar iglesias durante las festividades religiosas y en la medicina tradicional para atenuar los dolores de cabeza. Sin embargo no existen estudios que avalen a esta especie con propiedades medicinales

La pregunta científica es la siguiente: ¿La cícada *D. edule* tendrá efecto analgésico? , si es así ¿de qué naturaleza serán los principios activos?

5. HIPÓTESIS.

Los extractos de *D. edule* actuarán como analgésico en un modelo experimental usando ratones y los principios activos serán de naturaleza alcaloidal.

6. OBJETIVOS.

General

- Evaluar el efecto analgésico de los extractos obtenido a partir de las hojas de *D. edule*.

Particulares.

- Obtener de las hojas de *D. edule* los extractos de diferente polaridad.
- Evaluar la actividad analgésica de los extractos en un modelo biológico.
- Realizar una serie de reacciones coloridas para identificar los grupos funcionales de los compuestos.
- Aislar la fracción alcaloidal que presente el efecto analgésico de *D. edule*.

7. MATERIAL Y MÉTODO.

7.1 Extracción.

La especie *D edule* se recolectó del jardín botánico de la FES Iztacala. De la porción de las partes aéreas (hojas), se realizó la extracción mediante la técnica de percolación utilizando disolventes de diferente polaridad: baja (hexano), media (acetato de etilo) y alta (metanol). Los extractos se concentraron a presión reducida a través del rotavapor al vacío. Para determinar el porcentaje de rendimiento de cada extracto, se dejaron secar a temperatura ambiente con el fin de eliminar el exceso de disolvente. La fórmula para la determinación del porcentaje de rendimiento es la siguiente:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso planta seca}}{\text{peso del extracto}} \times 100\%$$

7.2 Evaluación de la analgesia.

Con el fin de estudiar la actividad analgésica de los extractos se utilizan pruebas antinocicepticas, que se basan en la aplicación de un estímulo externo doloroso (algésico), y la aparición de cambios típicos, observables, en la conducta del animal, en el sentido de escapar de la situación experimental; se denomina umbral doloroso a la intensidad del estímulo mínimo para provocar dolor expresado por una respuesta nociceptica. No se puede asegurar en estas pruebas que el animal “sienta” la sensación dolorosa de la misma manera que el ser humano (Velasco et al, 2004).

Se pueden considerar dos tipos de técnicas (Velasco et al, 2004):

-de estímulos superficiales: placa caliente

-de estímulos profundos: test peritoneal

Los analgésicos no narcóticos son más activos en la prueba de estímulo profundo con sustancias químicas (Velasco et al, 2004).

Sustancias químicas administradas a animales vivos (Velasco et al, 2004):

- Intraarteriales: bradicinina.
- Inyección en la pata de la rata: levadura de cerveza, carragenina, formaldehído.

- Implantación subcutánea de bolas de algodón.
- Inyección intraperitoneal en ratón (ácido acético).

En este trabajo se decidió usar la inyección intraperitoneal de ácido acético, por su facilidad de manejo y por que los extractos de la planta no tienen un origen opióide.

Para la evaluación analgésica se usaron ratones machos de la cepa DC1 de 25 a 30 g, los lotes experimentales se distribuyeron de la siguiente manera: un grupo control negativo, sólo tratado con Tween 20 (0.1 mL /10 g), un grupo control positivo, tratado con indometacina (0.1 mg /10 g), gpo. 3 extracto hexánico (1.5 mg /30 g), gpo. 4 ext. acetato de etilo (1.5 mg /30 g) y gpo. 5 ext. metanólico (1.5 mg /30 g) todos los grupos fueron con una "n" de 10 (Litter, 1988).

Los extractos fueron disueltos en Tween 20 para su administración en los animales, por vía subcutánea, dejando un tiempo de 30 minutos para su biotransformación. Posteriormente se les inyectó por vía intraperitoneal el ácido acético (0.6 mg /10 g) al 0.06%, Para el registro de la actividad analgésica, se registro el número de contorsiones de los ratones en cada lote experimental en un lapso de tiempo de 20 minutos. Para concluir, se realizó un análisis de varianza de un factor y la prueba de LSD (Litter, 1988).

7.3 Reacciones coloridas.

Para conocer la naturaleza de los grupos funcionales de los compuestos presentes en el extracto que resultó con actividad analgésica, se procedió a realizar una serie de reacciones coloridas al extracto activo:

7.3.1 Prueba de Liebermann-Buchard (triterpenoides y esteroides).

Se mezcla 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrían a 0°C y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Una porción de este reactivo se pone en contacto con la sustancia o su solución clorofórmica. Si hay formación de colores azul, verde, rojo, anaranjado, etcétera, los que cambian con el tiempo, la prueba es positiva. El orden y tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 minutos) tiene cierto valor diagnóstico; así, una coloración amarilla después de 15 minutos, corresponde a C-14-metilo y una Δ^7 insaturación. La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugados, que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización o por isomerización (Domínguez, 1988). El color es debido al grupo hidroxilo (- OH) de colesterol que reacciona con los reactivo y que aumenta la conjugación de la insaturación en el anillo fundido adyacente.

7.3.2 Prueba de Roshenhaim (dienos nucleares).

Una solución clorofórmica de la sustancia se pone en contacto con ácido tricloroacético al 90 % en agua. Si hay dienos nucleares reales o potenciales se forma un color violeta que cambia a azul después de 20 minutos (Domínguez, 1988).

7.3.3 Prueba de Salkowski (flavonoides).

Similar a la de Liebermann-Buchard, la muestra (1-2 mg) en 1 mL de cloroformo se pone en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), hay colores amarillos o rojo cuando da positivo para flavonoides. El color resulta de la formación de dobles enlaces adicionales o bien a partir de la condensación de dos moléculas de colesterol para formar biesteroides (Domínguez, 1988).

7.3.4 Prueba de cloruro-férrico (fenoles).

Se usa una disolución al 1% de cloruro de hierro ($FeCl_3$) que ha sido neutralizada con hidróxido de sodio (NaOH) hasta que se forme una pequeña precipitación de oxihidroxido de hierro (III) ($FeO(OH)$). La mezcla se filtra antes de ser usada. La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la disolución neutra de cloruro: una coloración transitoria o permanente (púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol. Los fenoles forman un complejo con Fe (III), que es intensamente coloreado he de ahí el color verde o azul (Domínguez, 1988).

7.3.5 Prueba de Mayer (alcaloides).

Se disuelven 136 g de cloruro mercuríco ($HgCl_2$) en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio (KI) en 10 ml de agua, se juntan las dos soluciones y sé aforan a 100 mL. A una solución en agua o metanol (CH_3OH) de la muestra, previamente acidulada, con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico se añaden unas gotas del reactivo, da positivo por la aparición de precipitado (Domínguez, 1988).

7.3.6 Prueba de Dragendorff (alcaloides).

Esta prueba consiste en adicionar unas gotas del extracto sobre la placa cromatográfica y agregar sobre la muestra unas gotas de la solución de Dragendorff. El resultado es positivo cuando la muestra se torna de color rojo cobre (Domínguez, 1988). Estas reacciones (Mayer y Dragendorff) se fundamenta en la capacidad que tienen los alcaloides de combinarse con metales pesados: bismuto, mercurio, tungsteno o yodo. Se realizan después de una extracción previa y consisten como norma general en una precipitación de los alcaloides (Bruneton, 1991).

7.4 Extracción de alcaloides.

Debido a que en las pruebas coloridas dieron positivo para alcaloides, se decidió obtener la fracción alcaloidal. Para ello se aprovecho la naturaleza básica del nitrógeno presente en este tipo de compuestos. La metodología fue la siguiente:

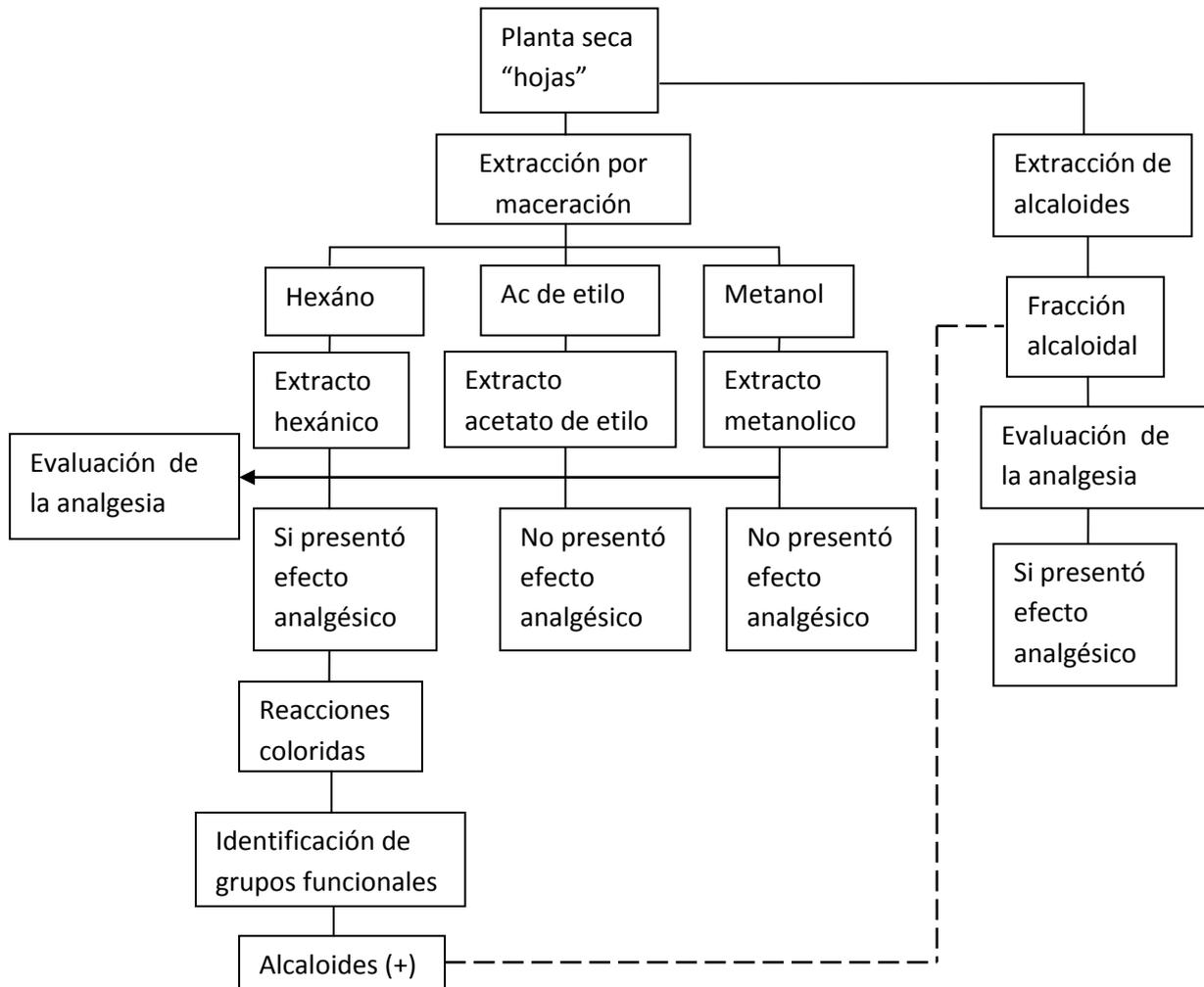
Las hojas de la planta *D. edule* (73.9 g) fueron extraídas con MeOH. El residuo fue acidificado con H₂SO₄ al 2.5% (a pH 1), removiéndose las impurezas con polvo de Zn (6.6 g) a temperatura ambiente y realizando un filtrado. La solución ácida fue lavada con CHCl₃, el residuo se volvió una base con NH₄OH (a pH 10) y extraído con CHCl₃ para obtener 0.160 g de la fracción alcaloidal.

La fracción alcaloidal obtenida se dejó secar a temperatura ambiente, para eliminar el disolvente y determinar su porcentaje de rendimiento.

7.5 Evaluación analgésica de la fracción alcaloidal.

El método para la evaluación analgésica fue usando un estimulante químico (ác. acético), manejado los grupos de la siguiente forma; (n=6 por grupo), los lotes experimentales se distribuyeron en un grupo control negativo (Tween 20), un grupo control positivo (Indometacina), grupo experimental (fracción alcaloidal 50 mg/ Kg), donde, finalmente se recabaron los datos y se hizo el análisis estadístico usando el análisis de varianza para el diseño con un factor y la prueba de LSD (Litter, 1988).

8. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1 Primera extracción de la cícada *D. edule*.

9.1.1 Rendimiento de extractos.

El extracto que obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento fue el metanólico que es de polaridad alta, en el cual se pueden encontrar compuestos polares como: antocianinas, flavonoides, taninos y glucósidos. Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado sobre la investigación fitoquímica de las hojas de *Cycas circinalis* y *C. revoluta*, en el cual, en su extracto metanólico identificaron un nuevo biflavonoide llamado tetrahidroisoginkgetina y 15 compuestos más (Moawad et al, 2010). Por otro lado el extracto hexánico de polaridad baja tuvo el menor porcentaje de rendimiento, en este extracto se pueden encontrar alcaloides, esteroides, ceras y terpenos alifáticos (cuadro 5).

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos obtenido de *D. edule* (peso/peso).

EXTRACTO	PESO (g)	% RENDIMIENTO
Cícada	103.5	100
Hexánico	0.389	0.376
Ac. Etilo	1.727	1.66
MeOH	5.368	5.18
Residuo	0.187	0.180

9.1.2 Efecto analgésico de los extractos de *D. edule*.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad analgésica se muestra en la figura 5, donde se observa que los ratones tratados con el vehículo presentaron el mayor número de contorsiones con 45 ± 6 , lo que indica nula actividad analgésica, mientras que los organismos tratados con indometacina (control positivo) tuvieron la menor media de contorsiones con 13 ± 5 , lo anterior concuerda con los trabajos realizados con antiinflamatorios no esteroidales como el evaluado en contra del dolor provocado en el intestino de ratas (Leite et al, 2004). El análisis estadístico mostró que el extracto hexánico tuvo de contorsiones una media de 21 ± 6 , no existen diferencias significativas con los resultados obtenidos en los ratones tratados con indometacina, debido a ello se puede afirmar que el extracto hexánico presenta efecto analgésico en ratones tratados con ácido acético. El análisis estadístico demostró que el extracto metanólico y el extracto de acetato de etilo si tuvieron una diferencia significativa con respecto a los resultados de la indometacina.

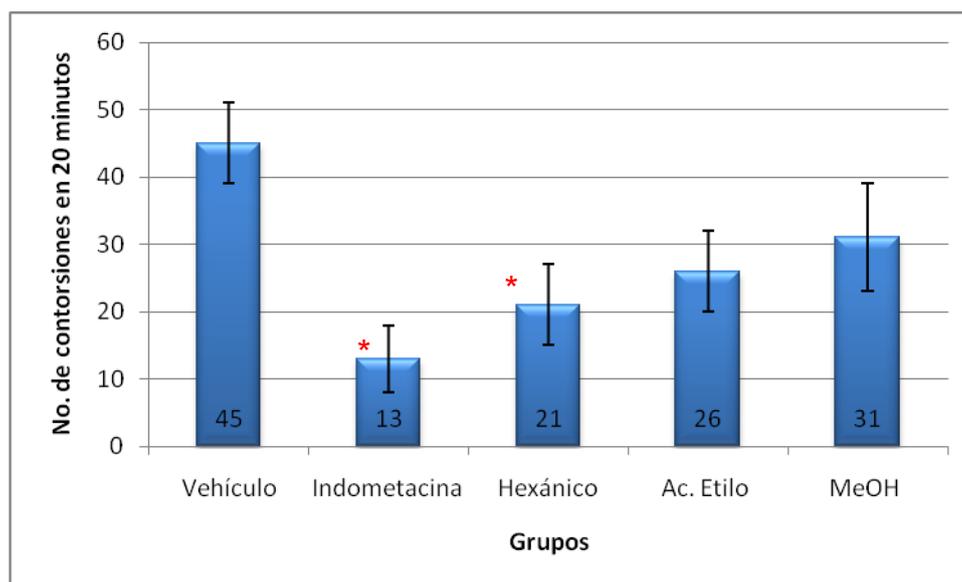


Figura 5. Capacidad analgésica de diferentes extractos de la cícada *D. edule*. $n=10$, \bar{X} de repeticiones y \pm E.E.M. ($p>0.05$). Diferencia significativa con respecto al vehículo (*).

9.2 Segunda extracción de cícada *D. edule*.

Se realizó la segunda extracción con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto hexánico para identificar sus grupos funcionales, mostrando la presencia de alcaloides, posteriormente la obtención de la fracción alcaloidal y un bioensayo de analgesia con la fracción alcaloidal.

9.2.1 Identificación de grupos funcionales.

De acuerdo a la serie de reacciones coloridas realizadas al extracto hexánico de la cícada *D. edule* se detectaron grupos funcionales de diferente naturaleza (cuadro 6). La prueba de Liebermann-Buchard dio positivo para di y triterpenos además de esteroides. Algunos de estos compuestos pueden tener efecto como antiinflamatorio, lo que concuerda con el trabajo de terpenoides de *Euphorbia fischeriana*, donde el diterpeno prostatina de esta planta tiene un efecto analgésico con el método del ácido acético (Qing et al, 1998). Las pruebas para alcaloides Mayer y Dragendorff fueron positivas, sugiriendo que algún o algunos alcaloides presentes en el extracto hexánico pueden ser los causantes de la analgesia (Guzmán, 2008). Las reacciones coloridas de Roshenhaim y cloruro-férrico fueron negativas indicando que no hay dienos nucleares y fenoles respectivamente en el extracto hexánico. Es posible que los fenoles presentes en la cícada *D. edule* estén en forma de glucósidos o que contengan ácidos carboxílicos dentro de su estructura y por lo tanto sean más polares que el solvente (metanol) y por lo tanto no se extraigan.

Cuadro 6. Pruebas coloridas para la determinación de grupos funcionales del extracto activo de *D. edule*.

Prueba	Resultado
Liebermann-Buchard	(+)
Roshenhaim	(-)
Mayer	(+)
Dragendorff	(+)
Salkowski	(+)
Cloruro-férrico	(-)

9.2.2 Rendimiento de extractos concentrados.

La cicada *D. edule* tuvo un peso seco de 73.9 g (100%) mientras que el extracto hexánico tuvo un porcentaje de rendimiento de 3.03%, que fue mayor al conseguido en la primera extracción debido que se extrajo de manera exhaustiva la fracción alcaloidal fue de 0.216% (cuadro 7), cantidad suficiente para realizar los bioensayos de analgesia.

Cuadro 7. Tabla de rendimiento de la fracción alcaloidal (peso/peso).

EXTRACTO	PESO (g)	% RENDIMIENTO
Cícada	73.900	100
Hexánico	2.240	3.030
Fracción alcaloidal de la planta seca	0.160	0.210

9.2.3 Efecto analgésico de la fracción alcaloidal.

En la figura 6 se muestran los resultados del bioensayo de analgesia de la fracción alcaloidal. El control negativo presentó una media de 39 ± 8 . Los ratones tratados con indometacina tuvieron una media de 9 ± 4 y los organismos tratados con fracción alcaloidal presentaron media de 18 ± 4 . Con base al análisis estadístico, el vehículo no tuvo un efecto analgésico significativo. La indometacina provocó un efecto analgésico significativo en ratones estimulados con ácido acético. La fracción alcaloidal presentó actividad analgésica, sin embargo, de acuerdo a este análisis existe una diferencia significativa entre la fracción alcaloidal y la indometacina, siendo mayor el efecto del fármaco puro.

Dado que el extracto hexánico no mostró diferencia significativa con la indometacina, se deduce que algunos alcaloides junto con los esteroides y terpenoides presentes en la cícada *D. edule*, provocaron el efecto analgésico resultante en el primer bioensayo de analgesia inducida con el ácido acético, por lo que, la fracción alcaloidal en la que se eliminaron estos compuestos sea menor su actividad. Es probable que los resultados del primer bioensayo se deban a un efecto sinérgico entre alcaloides, terpenos y esteroides. Esta afirmación se ve respaldada en los resultados de las pruebas coloridas, ya que en el ensayo de Liebermann- Buchard, dio positivo para esteroides y terpenoides. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Spessoto y col. (2003) en donde al evaluar la actividad analgésica de *Miconia rubiginosa* encontraron que tanto el extracto hexánico, cloruro de metilo y etanólico presentaron actividad, identificando por cromatografía de gases los siguientes compuestos esteroideos y triterpenos: α -amyrina, β -amyrina, lupeol y β -sitosterol en el extracto hexánico, los cuales producen la actividad analgésica (Spessoto et al, 2003).

En trabajos posteriores se recomienda usar en la prueba de analgesia una concentración mayor a la de 50 mg de fracción alcaloidal y la extracción de los esteroides y terpenos en el extracto hexánico.

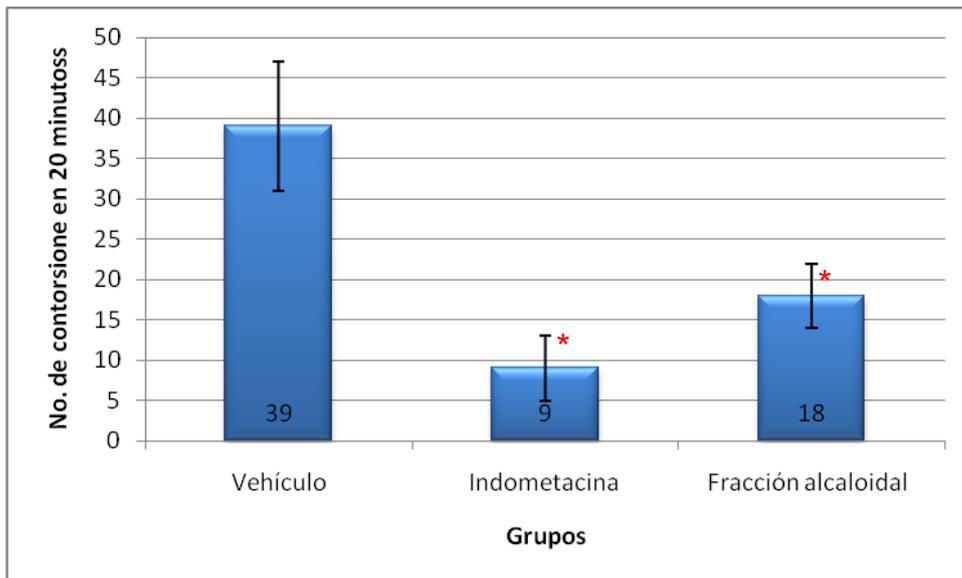


Figura 6. Efecto analgésico de la fracción alcaloidal de *D. edule*. $n=10$, \bar{X} de repeticiones y \pm E.E.M. ($p>0.05$). Diferencia significativa con respecto al vehículo (*).

10. CONCLUSIONES

- Las hojas de *D. edule* presentaron actividad analgésica.
- La mayoría de los compuestos extraíbles con solventes son de naturaleza polar.
- El extracto hexánico presento la mayor actividad analgésica y contiene esteroides, terpenos, flavonoides y alcaloides.
- La fracción alcaloidal presento menor actividad que el extracto hexánico.
- El efecto analgésico observado se debe a que existe sinergia entre los alcaloides, esteroides y terpenos.
- Este trabajo contribuye al estudio de las propiedades farmacológicas de las cícadas, más específicamente de la familia Zamiaceae.

11. REFERENCIAS

- Avendaño L. C. 2001. Introducción a la química farmacéutica. Mc Graw-Hill Inc. 2da. Edición. España. 25 pp.
- Brenner G. M. 2000. Pharmacology. Saunders Company. Estados Unidos, 242-251, 319-324 pp.
- Briggs E. 2010. Valoración y expresión del dolor. Edit. Art and Science. Estados Unidos.
- Bruneton J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acribia S.A. España. 359, 360 pp.
- Daniel M. 2006. Medicinal Plants "Chemistry and Properties". Science Publishers, Estados Unidos. 9-11 pp.
- Domínguez X. A. 1988. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. 217, 218 pp.
- Ebadi M. 2002. Pharmacodynamic basis of Herbal Medicine. CRC Press. Estados Unidos. 10 pp.
- Hardman J. y Limbird L. 2007. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª edición. Ed. Mc Graw Hill. México. 557, 571, 617, 681, 686 pp.
- Guzmán E. 2008. Caracterización química y farmacológica de los alcaloides de Heimia salicifolia por sus propiedades antihipertensoras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. UNAM. FES Iztacala. 32 pp.
- http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/plantas/cicadas/cicadas_1.html (febrero 2010).
- http://www.ecologia.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/26_Vovides.pdf (febrero 2010).
- Katzung B. G. 2005. Farmacología básica y clínica. 9ª. Edición. Manual moderno. México. 3, 504 pp.
- Keeler R. F. y Tu A.T. 1983. Plant and toxins, Vol 1. Marcel Dekker, Inc., Estados Unidos, 463-467 pp.
- Klaassen, C. D. 2001. Toxicology. The basic science of poisons. 6ª edición. Mc Graw-Hill, Estados Unidos, 558, 1071-1072 pp.
- Leite A. Z., Sipahi A., Damião A., Garcez A. T., Buchpiguel C. A., Lopasso F. P., Lordello M. L., Agostinho C. L. y Laudanna A. A. 2004. Effect of a selective nonsteroidal anti-inflammatory inhibitor of cyclooxygenase-2 on the small bowel of rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 37 (3): 333-336.

- Levetin E. y McMahon K., 2006, Plants and society. 4^a edición. Mc Graw Hill. Estados Unidos. 152-153 pp.
- Liener I. E. 1969. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic prees, Inc, Estados Unidos, 159-165 pp.
- Litter M. 1988. Farmacología experimental y clínica. 7^a. edición. Editorial El Ateneo. Argentina. 356, 357 pp.
- Martínez M. 1996. Las plantas medicinales de México. 6^a edición. Librería y Ediciones Botas, México. 409, 410 pp.
- Moawad A., Hetta M., Ziawiony J. K., Jacob M. R., Hifnawy M., Marais J. P. J., Ferreira D. 2010. Phytochemical investigation of *Cycas circinalis* and *Cycas revolute* leaflets: moderately active antibacterial biflavonoids. *Planta medica*. 76 (8): 796-802.
- Ruiz M. 2003. Manual de farmacia práctica. Manuales Major. España. 93,113-115 pp.
- Qing-Gao Ma, Wen-Zi Liu, Xiao-Yun Wu, Tian-Xi Zhou, Guo-Wei Qin. 1997. Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*. 44 (4): 663-666.
- Spessoto M. A., Ferreira D. S., Crotti A. E., Silva M. L., Cunha W. R. 2003. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*. 10 (6-7): 606-609.
- Velasco A., Gonzalez J. L. 2004. Curso práctico de farmacología. Manual de laboratorio. Secretariado de publicaciones e intercambio editorial. 4ta. Edición. España. 179, 180, 184 pp.
- Viesca T. C. 1978. Estudios sobre etnobotánica y antropología médica. Editorial Libros de México. México. 11-15 pp.
- Vovides A. P., John D. Rees and Vázquez T. M. 1983. Flora de Veracruz. Zamaceae. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Xalapa. México. Fascículo 26. 11-16 pp.
- Vovides A. P. y Pérez F. M. 2005. The ceremonial use of the threatened “espadaña” cycad (*Dioon merolae*, Zamaceae) by a community of the central depression of Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. México. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/577/57707809.pdf>.