

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO INCORPORADA A
LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LA RAÍZ DE
Pentalinon andrieuxii Muell. Arg. (Apocynaceae) EN *Artemia salina* Leach

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
U B A L D O H E R N Á N D E Z S O L I S

DIRECTOR:

Q.F.B. JAVIER ALFREDO CARBALLO PEREA

Q.F.B. PATRICIA MELCHOR MACÍAS

MÉXICO D.F.

2004



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.



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO CAMPUS CHAPULTEPEC

México, D.F., 23 de FEBRERO de 2004

C. LIC. ANGELES OCAMPO AGUILAR
Coordinador
PRESENTE

Por este conducto, me permito informarle el nombre de los catedráticos que integrarán el **SÍNODO**
DEL EXÁMEN PROFESIONAL de UBALDO HERNANDEZ SOLIS

cuyo título de trabajo recepcional a sustentar es: EVALUACION BIOLOGICA DE LOS

EXTRACTOS DE LA RAIZ DE Pentalinon andrieuxii Muell, arg.
(APOCYNACEAE) EN Artemia salina Leach.

dentro de la opción de titulación vía TESIS UVM UFM

Vo.Bo.
PARA LA
IMPRESIÓN

NOMBRAMIENTO
EN EL SÍNODO

CATEDRÁTICO

CLAVE

PRESIDENTE	<u>JAVIER A. CARBALLO PEREA</u>	<u>22632</u>
VOCAL	<u>PATRICIA MELCHOR MACIAS</u>	<u>24909</u>
SECRETARIO	<u>AGUSTIN PALMA DE LA CRUZ</u>	<u>022379</u>
1ER. SUPLENTE	<u>ESPERANZA HERNANDEZ KOELIG</u>	<u>22337</u>
2DO. SUPLENTE	<u>SANTIAGO SALAZAR LOPEZ</u>	<u>22283</u>

Esperando gire las instrucciones respectivas al Dpto. de Servicios Escolares, para los trámites que correspondan; reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

COORDINADOR DE



c.c.p. Coord. de Programa
c.c.p. Tesista
c.c.p. Expediente

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme vida y la oportunidad de seguir siempre adelante, así hoy concluir este anhelado trabajo.

A mis padres:

Dedicado especialmente con todo mi amor, agradecimiento, respeto y admiración por brindarme su cariño, comprensión y apoyo incondicional para lograr mis metas. Gracias por ser el ejemplo a seguir.

A mis hermanos:

Con mucho cariño, mi agradecimiento por los consejos que me han brindado a lo largo de mi vida, así como los impulsos en todas mis acciones, por la confianza y entusiasmo que han puesto en mi gracias.

A mi familia:

Especial agradecimiento por estar conmigo en momentos importantes de mi vida. Gracias a ti abuelo que colaboraste directamente en este trabajo.

A la familia Martínez Robledo:

De todo corazón mil gracias por su apoyo y cariño brindado para la realización de este sueño.

A mis amigos: ♡

Por su agradable compañía durante todos estos años y su franca amistad, gracias por las porras, entusiasmo y la aportación de su granito de arena en este trabajo.

Al mtro. Javier Carballo:

Por todas sus aportaciones, enseñanzas, tiempo y dedicación en el proceso de esta tesis.

A la mtra. Patricia Melchor:

Por todo su apoyo y consejos durante la elaboración de este trabajo.

A ustedes y demás maestros todo mi agradecimiento por su ayuda, enseñanza y perseverancia a lo largo de mi vida estudiantil. También agradezco a quienes con sus investigaciones aparecidas en textos que a manera de artículos o monografías apoyaron directa o indirectamente la preparación de mi trabajo.

A la Universidad del Valle de México:

Por su formación, calidez y valores inculcados en esta etapa de mi educación profesional gracias.

La parte experimental de este trabajo fue realizada en los laboratorios de la Universidad del Valle de México, Plantel Chapultepec; bajo la dirección del Q.F.B. Javier Alfredo Carballo Perea y de la Q.F.B. Patricia Melchor Macías.

El trabajo fue presentado en el XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2003, realizado en Cancún Quintana Roo por la Asociación Farmacéutica Mexicana.

ÍNDICE	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Pentalinon andrieuxii</i> Muell. Arg.	4
2.2. Problemática en México por mordedura de serpientes	5
2.3. <i>Bothrops asper</i>	6
2.3.1. Veneno	6
2.3.2. Reacciones anafilácticas	7
2.4. <i>Artemia salina</i> Leach	9
2.4.1. Características biológicas de <i>Artemia salina</i> Leach	9
2.4.2. Reproducción de <i>Artemia salina</i> Leach	10
2.4.3. Usos de <i>Artemia salina</i> Leach	10
III. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general	12
3.2. Objetivos particulares	12
IV. METODOLOGÍA	13
4.1. Recolección e identificación taxonómica de la planta	13
4.2. Investigación bibliográfica	13
4.3. Parte química	13
4.3.1. Obtención de los extractos	13
4.3.2. Fraccionamiento primario del extracto etanólico al 85% de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	14
4.3.3. Fraccionamiento secundario biodirigido del extracto etanólico al 85% de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	15
4.3.3.1. Preparación de la columna cromatográfica	15
4.4. Parte biológica	16
4.4.1. Cultivo de <i>Artemia salina</i> Leach	16

4.4.2. Bioensayo	16
4.4.2.1. Preparación de las concentraciones de los extractos a evaluar	17
4.5. Diagrama general del trabajo experimental	18
V. RESULTADOS	19
5.1. Obtención de un extracto activo	19
5.1.1. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> realizado al extracto etanólico al 85 % de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	20
5.1.2. Bioensayo en <i>Artemia salina</i> realizado al extracto hexánico de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	21
5.2. Fraccionamiento primario del extracto etanólico de la raíz de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	22
5.3. Fraccionamiento secundario biodirigido de las fracciones primarias del extracto etanólico de la raíz de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	22
5.3.1. Bioensayo realizado a la fracción I	25
5.3.2. Bioensayo realizado a la fracción II	26
5.3.3. Bioensayo realizado a la fracción III	27
5.3.4. Bioensayo realizado a la fracción IV	28
VI. DISCUSIÓN	29
VII. CONCLUSIONES	31
VIII. BIBLIOGRAFÍA	32
IX. ANEXOS	35

ÍNDICE DE DIBUJOS

Pág.

1. Hojas de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	4
2. Flor de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	4
3. Fruto de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	4
4. Distribución geográfica de la planta	5
5. Distribución geográfica de <i>Bothrops asper</i>	6
6. <i>Artemia salina</i> Leach	9
7. Huevos de <i>Artemia salina</i> Leach	10
8. Corrimiento de 19 fracciones del fraccionamiento secundario	23
9. Fracciones derivadas de la unión de las segundas fracciones	24

ÍNDICE DE TABLAS

3

Pág.

1. Secuencia de elusión para obtener 24 fracciones del fraccionamiento secundario	15
2. Secuencia de los tubos para el bioensayo	17
3. Resultados de los extractos	19
4. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> del extracto de etanol al 85%	20
5. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> del extracto hexánico	21
6. Fraccionamiento primario de la raíz de <i>Pentalinon andrieuxii</i>	22
7. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> de la fracción I	25
8. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> de la fracción II	26
9. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> de la fracción III	27
10. Porcentaje de mortalidad de <i>Artemia salina</i> de la fracción IV	28

ÍNDICE DE GRAFICAS

3

Pág.

1. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> del extracto etanólico al 85%	20
2. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> del extracto hexánico	21
3. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> de la fracción I	25
4. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> de la fracción II	26
5. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> de la fracción III	27
6. Curva dosis-respuesta en <i>Artemia salina</i> de la fracción IV	28

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En la presente introducción pretendo establecer un diálogo sincero, con quien a partir de ahora habrá de acompañarme a lo largo de estas páginas en una aventura de investigación científica, que inició mucho tiempo antes, incluso de comenzar la carrera, pues el tema del envenenamiento y muerte por mordedura de serpientes ha sido algo, que por mi origen, se ha tornado relevante y cercano a mí, pues, desde pequeño recuerdo la incidencia de percances por mordedura de serpientes en miembros de mi comunidad e incluso de mi familia; por lo que el seguimiento de este tema no puede considerarse un hecho fortuito si no un compromiso con el cual me siento totalmente involucrado. Uno de los factores que me vincula con el tema es el factor geográfico, pues es en la comunidad Plan de Arroyo, Municipio de Francisco Z. Mena, Puebla: en donde desde niño tuve la oportunidad de observar el uso de la planta conocida con el nombre de “*contra bejuco*”, misma que, como parte de este trabajo de investigación fue identificada como *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.

Tomando en cuenta lo anterior, resulta lógico pensar en el cuestionamiento de los métodos de tratamientos tradicionales contra mordeduras de serpientes, cuestionamiento que con la finalidad de allanar al camino de la investigación científica, permita a través de la interacción de los contenidos planteados en los antecedentes, objetivos y metodología, integrar un núcleo de conocimientos científicos plenamente traducibles en conocimientos prácticos.

Como sabemos, en años recientes el reino vegetal ha sido objeto de un renovado interés como fuente de productos naturales con valor medicinal o de precursores útiles para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos; y es precisamente en nuestro país, en

donde se encuentra una gran variedad de plantas utilizadas en medicina tradicional con fines terapéuticos, sin que por ello se hayan realizado estudios sistemáticos y de rigor científico encaminados a comprobar su actividad biológica¹; por lo que si tomamos en cuenta que en la actualidad existen más de cien fármacos comerciales obtenidos de especies vegetales, entenderemos la gran relevancia que cobra el estudio fitoquímico² y que representa en la producción de nuevos agentes medicinales, capaces de cubrir las necesidades de un público demandante.

En cuanto al envenenamiento por mordedura de serpientes, situación en la que el involucrado ve reducirse sus expectativas de sobrevivencia debido a factores que como el medio y la ubicación geográfica, definen la suerte de cada persona inoculada; ya que es justo en función de la distancia y el tiempo de recorrido, que se resuelve en éxito o fracaso el intento de salvar la vida. Si a todo ello agregamos el hecho de que a consecuencia de cualquier esfuerzo físico el veneno se propaga con mayor rapidez a todo el cuerpo, nos daremos cuenta de que en realidad el riesgo de muerte por mordedura de serpiente es muy alto, no solo por las dificultades que implica el acceso al suero como antídoto³, si no por las contraindicaciones que implica el uso del mismo, ya que uno de los problemas más grandes que enfrenta la población inoculada por serpientes, es que el uso de un suero anti-mordedura de serpiente puede producir reacciones tales como: lesiones, choque anafiláctico o reacciones alérgicas extremas, que pueden incluso causar la muerte (Newell J. 2002).

¹ (Actividad biológica): También llamada eficiencia o actividad intrínseca. Es la capacidad de una sustancia química para producir algunas respuestas biológicas a nivel celular o subcelular.

² (Fitoquímico): Es una disciplina que involucra a la química, que permite la identificación y caracterización del metabolito secundario principal de las plantas.

³ (Antídoto): Sustancia que contrarresta el efecto tóxico de otra, ya sea de forma específica o inespecífica.

El trabajo experimental está diseñado para encontrar la bioactividad de los extractos fragmentados de la planta, mediante el uso de un crustáceo llamado *Artemia salina* Leach, que por sus condiciones de vida es muy fácil de realizar la curva dosis – respuesta y así obtener la concentración letal cincuenta. Esto fue realizado en los laboratorios de la Universidad del Valle de México, Campus Chapultepec.

Solo falta mencionar que aquí se presentan las bases fundamentales para continuar con la titulación⁴ del veneno-extracto, y poder comprobar el uso de la planta *Pentalinon andrieuxii* en la medicina tradicional contra mordedura de serpientes; dicha titulación no es posible realizar debido a la falta de apoyo económico.

Por otra parte, me gustaría reflexionar acerca de los trabajos de investigación en México, ya que no sabemos colaborar en equipo, pues existen múltiples factores negativos como los celos profesionales, que aunados a la crisis económica que se vive en el país frustran los proyectos. Por lo que, para que un gobierno crea en la capacidad y los trabajos no sean interrumpidos, debemos comprometernos a darles un seguimiento hasta lograr respuestas importantes, para lo cual deben unirse las grandes instituciones para distribuirse mejor el trabajo y dar así más apoyo a las pequeñas instituciones. De este modo el presupuesto que se destine a la investigación no será tirado a la basura y obtendremos mejores resultados en beneficio de la comunidad científica estudiantil.

⁴ (Titulación): Proceso en el cual una sustancia se añade de manera cuidadosa a otra hasta que se ha agregado la cantidad estequiométrica.

II. ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

2.1 *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.

Es un pequeño bejuco de la familia Apocynaceae, usualmente leñoso, que llega a medir 6 m de largo, sus hojas son ligeramente alargadas y anchas (Fig. 1). Las inflorescencias son alargadas y escasas, con una garganta lo que las hace parecer trompetas de color amarillo (Fig. 2). Sus frutos son alargados que semejan arcos (Fig. 3) (INI Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana 1994).



Fig.1 Hojas.



Fig. 2: Flor.

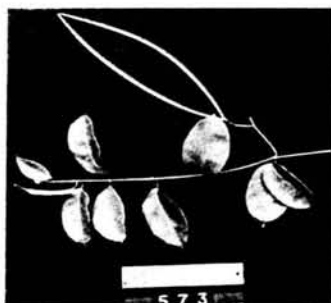


Fig. 3: Fruto.

La planta es conocida comúnmente como bejuco guaco, bejuco de la víbora, contrahierba y su nombre en

náhuatl es “Tziquitummecatl” que quiere decir bejuco con mezquinos (www.semarnat.gob). Es originaria de México, presente en regiones de clima cálido desde el nivel del mar hasta los 30 m de altitud, es cultivada en huertos familiares, se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la Península de Yucatán, Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Puebla (Fig.4) (Rzedowski, J. & G. Calderón de R. 1998).

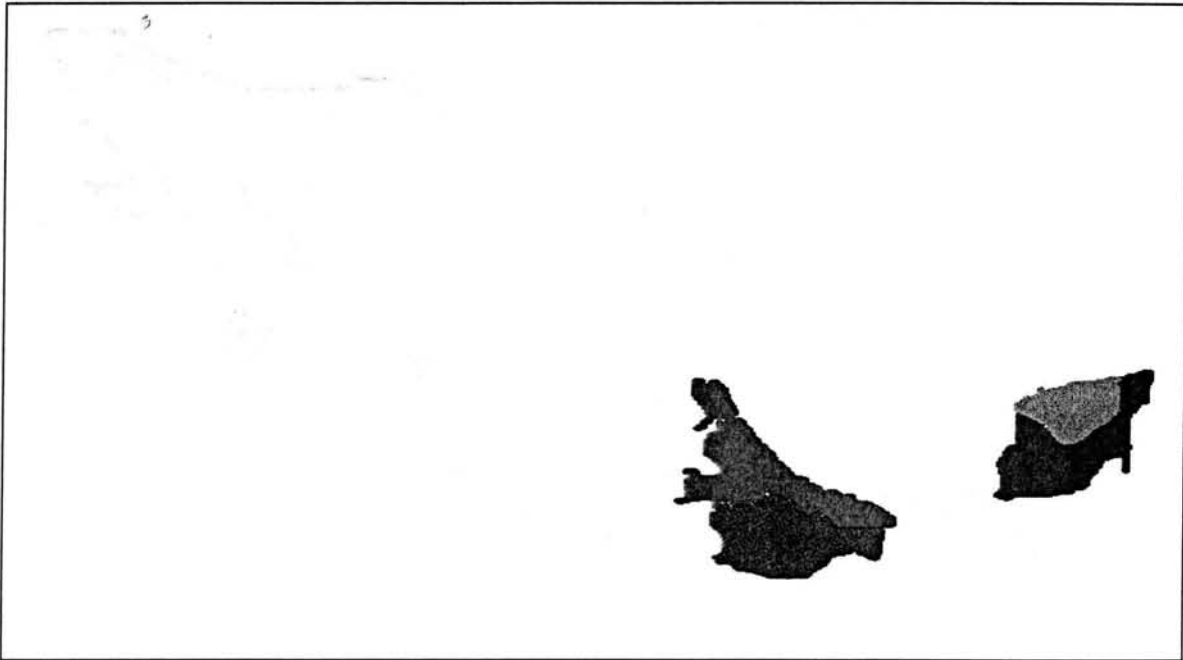


Fig. 4: Distribución geográfica en la república mexicana de la planta *Pentalinon andrieuxii*.

En cuanto a su uso en la medicina tradicional, sabemos que se emplea en el alivio de disturbios nerviosos y dolor de cabeza, así como, en el tratamiento de la leishmaniasis⁵ cutánea conocida como úlcera del chiclero (Borges Argaez. Et-al 2000); la raíz masticada o las hojas frescas a manera de cataplasma⁶ se emplea contra la mordedura de serpientes (Rzedowski, J. & G. Calderón de R. 1998).

2.2 Problemática en México por mordedura de serpientes

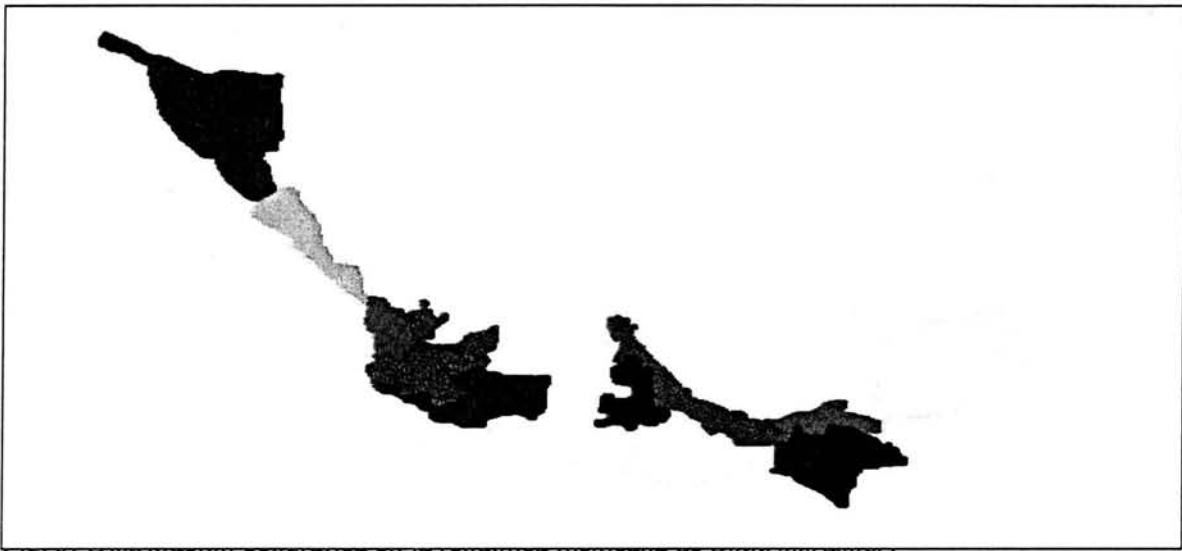
En el IMSS se han reportado 3150 casos de personas mordidas por serpientes en siete años, y en el caso particular del Hospital General de Veracruz, durante el año 2000 se reportaron 11 casos, de los cuales, dos sujetos fallecieron (CITVER).

⁵ (Leishmaniasis): Enfermedad o enfermedades producidas por un microorganismo perteneciente al género de los protozoos *Leishmania*.

⁶ (Cataplasma): es una pasta medicinal que se aplica en cualquier parte del cuerpo.

2.3 *Bothrops asper*

Las serpientes del género *Bothrops* ocupa el primer lugar en importancia médica en el continente americano, por el número y gravedad de los accidentes que provoca (Bogarín G. Et-al 1999), la especie *asper* vulgarmente llamada nauyaca, es la de mayor distribución geográfica en la república mexicana, ubicada en la costa del Océano Pacífico desde el extremo sur de Sonora hasta Michoacán, y por el Golfo de México desde Veracruz y Puebla hasta Chiapas (Fig. 5) (Calderon L. y Lomonte B. 1999).



2.3.1 Veneno

El veneno de *Bothrops asper* es muy potente, caracterizado por tener efectos miotóxico y hemolítico (Borges M., Et-al 2001), el primero se debe a una destrucción de las fibras musculares, así como a la acción de ciertas sustancias contenidas en el veneno sobre las placas neuromusculares, que condiciona en éstas un bloqueo y, por tanto parálisis muscular (Evans J. y Ownby C. 1999). Mientras que el segundo tiene una ruptura de glóbulos rojos que es debida al daño de sus membranas causado por las enzimas proteolíticas y el

complemento⁷; a ello hay que unir el daño mecánico producido sobre los hematíes⁸ por la microtrombosis generalizada que desencadena el veneno, la anemia progresiva resultante agrava el shock y es otra causa que conduce al estado de coma (López Torres M. 1994).

El veneno es una mezcla heterogénea de compuestos biológicos farmacológicamente especializados, contiene alrededor de un 25% de sólidos totales de los cuales, entre un 35% y un 90% están constituidos por proteínas y polipéptidos de alto peso molecular, responsables de la mayoría de los efectos farmacológicos; el resto de los componentes, entre un 10 a un 15% lo forman sustancias orgánicas de bajo peso molecular como carbohidratos, péptidos, aminoácidos libres, aminas, nucleótidos, así como también compuestos inorgánicos (Valledor de Lozaga A. 1994).

2. 3. 2 Reacciones anafilácticas

Además de la toxicidad que entrañan los venenos de los ofidios⁹, existe la posibilidad de que desencadenen una reacción anafiláctica en determinadas personas sensibles. Estas son una respuesta anómala y desmedida del organismo de ciertas personas sensibilizadas a las proteínas contenidas en el veneno o en los sueros antivenenosos, no reconocidas como propias del sistema inmunitario y rechazadas por este. Según la

⁷ (Complemento): Sistema funcional compuesto por veinte proteínas, sus respectivos receptores y otras moléculas reguladoras, que constituye un componente importante del sistema inmunitario natural. Existen dos vías de activación del sistema del complemento: la denominada vía clásica y la vía alternativa. Además de la lisis celular, el sistema del complemento participa en otras muchas acciones biológicas, como la fagocitosis o la quimiotaxis.

⁸ (Hematíes): Célula sanguínea anucleada, también denominada glóbulo rojo, de color rosado y de forma redondeada u oval, con un diámetro aproximado de 7 μm , cuya misión fundamental es la captación de oxígeno y su transporte a los tejidos.

⁹ (Ofidios): Son reptiles, de cuerpo alargado, sin miembros locomotores y tienen los párpados soldados a la piel (sin movilidad) translúcidos en una amplia mayoría, se ubican dentro del grupo *Ophidia*, del griego que significa ofidios y su sinónimo en latín es *Serpentum Serpientes*.

clasificación de Gell y Goombs, las reacciones anafilácticas o de hipersensibilidad¹⁰ se dividen en cuatro tipos, dos de los cuales se pueden dar a consecuencia de la mordedura por serpientes (Abas A. Lichtman A. Pober J.1999).

Estas son, hipersensibilidad inmediata¹¹ e hipersensibilidad tardía.¹² En la primera, la reacción antígeno-anticuerpo se produce sobre anticuerpos fijos a células, las cuales liberan histamina y otras sustancias, causantes de vasodilatación, hipertensión arterial, shock y broncoespasmo. El estado de shock se traduce clínicamente por un descenso del nivel de conciencia y un coma progresivo. El shock anafiláctico se diferencia de los demás tipos de shock porque hay una buena e incluso aumentada perfusión cutánea y por ello el enfermo no está pálido. El otro tipo de reacción, que no se produce inmediatamente o pocas horas después, si no tras varios días e incluso semanas, puede entonces hacerlo como una enfermedad del suero, ya que los inmunocomplejos antígenos-anticuerpos circulan libremente por la sangre y precipitan en los pequeños vasos sanguíneos, atrayendo el complemento y originando vasculitis, o glomerulonefritis si estos depósitos de inmunocomplejos se producen en la red capilar de los glomérulos renales (López Torres M. 1994).

¹⁰ (Hipersensibilidad): Estado de sensibilidad exagerada. Estado alérgico en el que un organismo reacciona frente a determinados agentes de forma más enérgica que en una situación ordinaria. Esta hipersensibilidad se pone en marcha por mecanismos de inmunidad humoral y/o celular.

¹¹ (Hipersensibilidad inmediata): Cuando el antígeno se une a las moléculas de inmunoglobulina IgE previamente fijadas a la superficie de estas células, se produce una rápida liberación de una gran variedad de mediadores que, en conjunto, permiten un aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso bronquial y visceral, e inflamación local.

¹² (Hipersensibilidad tardía): Es una forma de reacción inmunitaria mediada por células en las que la célula efectora final es el fragocito mononuclear activado. Las células T activadas por el antígeno secretan citoquinas que ejercen varios efectos.

2.4 *Artemia salina* Leach

Para estudios de extractos de productos naturales se utiliza un bioensayo basado en *Artemia salina* Leach para la detección de toxicidad aguda en 24 horas, es una de las pruebas más utilizadas por ser económica, fácil de ejecutar, método sensible altamente reproducible (Colegate Steven, Molyneux, 1993).

El bioensayo de la *Artemia salina* Leach es usado para evaluar diferentes actividades farmacológicas de las plantas en donde los compuestos son bioactivos a dosis mas bajas que la toxicologica, desde su introducción en 1982 esta prueba se ha usado *in vivo* para comprobar y guiar el fraccionamiento de los extractos, los valores menores de 1,000 ppm se consideran bioactivos (Lear Bohlin Bruñí Jan. 1998).

2.4.1 Características biológicas *Artemia salina* Leach

La *Artemia salina* Leach (Fig. 6), es un pequeño crustáceo de más de dos centímetros de longitud, catalogado como el más primitivo insecto, por su constitución fisiológica simple, cuya tasa de reproducción es casi constante. Tiene como



Fig. 6: *Artemia salina* Leach.

preferencia un hábitat de alta salinidad como medio ecológico de defensa contra sus depredadores, pero fisiológicamente se adapta a medios de menor salinidad con facilidad, posee el mejor sistema de osmorregulación que existe en el reino animal, para mantener la composición del líquido corporal constante en un medio extremo, también produce pigmentos respiratorios muy eficientes para resistir bajos niveles de oxígeno (Villar Ochoa C. A. 2000).

2. 4. 2 Reproducción de *Artemia salina* Leach

El crustáceo puede permanecer en el quiste durante varios años hasta que se den las condiciones necesarias para la eclosión, después de la cual se desarrolla normalmente. Llega a la madurez a los 14 días y vive más de 6 meses, las hembras ponen huevos que según las condiciones ambientales, están provistos de una membrana o corteza muy gruesa (Fig. 7), la cantidad de huevos en cada puesta oscila entre 50-200 y ocurre cada 4-6 días según la especie (Colegate Steven, Molyneux. 1993).



Fig. 7: Huevos de *Artemia salina* a 100 aumentos.

La mayoría de las poblaciones son bisexuales, los machos tienen dos penes cuando son adultos, una hembra puede cambiar de un tipo de reproducción a otro; la ovovivípara, es cuando nacen nauplios vivos y la ovípara, cuando ponen huevos, esto demuestra que su sistema inmunológico se desarrolla rápidamente, así como su instinto de conservación en condiciones adecuadas de salinidad, temperatura, alimento natural, oxígeno, pH, entre otros (Villar Ochoa C. A. 2000).

2. 4. 3 Usos de la *Artemia salina* Leach

Es la primera técnica utilizada para obtener la letalidad *in vivo* utilizando un crustáceo diminuto, la mayoría de los trabajos han sido con el nauplio salido del cascarón, aunque la inhibición de los huevos también se ha estudiado (Meyer B. 1982).

Es un bioensayo¹³ natural simple, por medio del cual se determina la concentración letal cincuenta (CL₅₀) en ppm¹⁴, de los componentes activos de extractos, en un medio

¹³ (Bioensayo): Determinación de la acción o de la concentración de una sustancia por medio de la respuesta biológica observada en las células, los tejidos o los animales.

salino. Los camarones salinos han sido utilizados en ensayos o en análisis de residuos de pesticidas, micotoxinas, anestésicos, toxinas dinoflagelares, toxinas en ambiente marinos, compuestos químicos en muestras ambientales, toxinas naturales presentes en alimentos, productos farmacéuticos, toxicidad del aceite (Meyer B. 1982). Esto se debe a que la larva de este crustáceo es altamente sensible a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas (Cannell R. 1998).

¹⁴ (Partes por millón): Expresión de concentración que se refiere a miligramos (10^{-6} g) por gramo de solución.

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

- Evaluar la actividad en *Artemia salina* Leach de las fracciones del extracto de *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.

3.2 Objetivos particulares:

- Identificar y clasificar taxonómicamente la planta.
- Buscar y seleccionar el material bibliográfico.
- Recolectar y deshidratar el material vegetal.
- Obtener los extractos etanólico y hexánico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.
- Evaluar la actividad de los extractos etanólico y hexánico en *Artemia salina* Leach.
- Llevar a cabo el fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico de la raíz *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.
- Llevar a cabo el fraccionamiento secundario biodirigido en columna cromatográfica de las fracciones primarias activas, obtenidas a partir del extracto etanólico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg.
- Detectar las fracciones activas mediante el bioensayo de toxicidad para *A. salina* Leach.
- Aplicar los procedimientos de cromatografía en capa fina para cada fracción y separar las mezclas.

IV. METODOLOGÍA

IV. METODOLOGÍA

4.1 Recolección e identificación taxonómica de la planta

La planta fue identificada en el Herbario Medicinal del IMSS del Centro Médico Nacional Siglo XXI por el Biol. Santiago Xololpa Molina y la M. en C. Abigail Aguilar Contreras.

En el mes de abril se colectó aproximadamente 1 Kg de la raíz libre de tierra, de una planta adulta, la cual se fragmentó y se puso a secar a temperatura ambiente durante una semana.

4.2 Investigación bibliográfica

Mediante un calendario de actividades a seguir, se hace una recopilación documental, en diferentes centros de información, como visitas a bibliotecas, hemerotecas, internet, entrevistas a personas que han sido mordidas por serpientes, en hospitales de la región, en el Instituto Nacional de Higiene y en el Herbario Medicinal del IMSS en el Centro Médico Nacional Siglo XXI.

4.3 Parte química

4.3.1 Obtención de los extractos¹⁵

La maceración¹⁶ de la raíz se efectúa utilizando hexano y etanol al 85% por separado (Castro, O. Et-al 1999). En dos matraces bola de fondo plano colocar 70 y 79 g respectivamente, de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* finamente picada a la que se le adicionan 250 mL del solvente indicado. La raíz se deja 7 días macerando (Kuklinsky C. 2000).

¹⁵ (Extractos): son preparados obtenidos por concentración parcial o total de los líquidos extractivos. Hay diferentes tipos de extractos según la concentración del principio activo respecto a la droga original o según su consistencia.

¹⁶ (Maceración): técnica de extracción en la que el material vegetal está en contacto con un volumen dado durante un periodo de tiempo determinado.

Se filtra por gravedad en un embudo de tallo corto utilizando papel filtro watman. Para obtener el extracto libre de solventes, se evapora en rotavapor Büchi R-114, (Villar del Fresno A. 1999). A estos dos extractos se les determina su toxicidad en *A. salina* Leach como se indica en la prueba biológica (Colegate Steven 1993). Se analizan los extractos por cromatografía en capa fina¹⁷ (CCF) y se revelan por medio de la lámpara de luz ultravioleta y con yodo (Harris D. 1991).

4. 3. 2 Fraccionamiento primario del extracto etanólico al 85% de *Pentalinon andrieuxii*

El extracto de etanol al 85% de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* obtenido previamente, se fracciona de manera preliminar mediante el proceso de partición entre cloroformo-agua (1:1) en dos ocasiones con 100 mL cada vez, utilizando el embudo de separación, descartando la fase acuosa. La fase orgánica se concentra en el rotavapor y se obtiene el peso del residuo, el cual se etiqueta como fracción número 1. Posteriormente, esta fracción se somete a una partición con 100 mL de una mezcla de metanol al 90%-hexano (1:1). Las fracciones obtenidas se concentran mediante el empleo del rotavapor. La fracción metanólica se etiqueta como fracción 2 y la fracción hexánica como fracción 3. Se obtiene el peso de las tres fracciones. Analizar las fracciones por CCF (Issaq H. 2002).

¹⁷ (Cromatografía en capa fina): Técnica en la cual la fase estacionaria se encuentra depositada en una placa de vidrio o de plástico. Se coloca una gota de solución problema cerca del borde inferior de la placa. Este mismo borde se pone en contacto con el solvente, que asciende por capilaridad a través de la fase estacionaria.

4. 3. 3 Fraccionamiento secundario biodirigido del extracto etanólico al 85% de

Pentalinon andrieuxii

4. 3. 3. 1 Preparación de la columna cromatográfica¹⁸

Pesar 20 g de gel de sílice por cada gramo de la fracción a cromatografiar y se reserva la octava parte de esta cantidad para adsorber la muestra. La muestra a cromatografiar disolverla apropiadamente y realizar la adsorción de la misma adicionando la sílice reservada, evaporar completamente el disolvente. Suspender la sílica gel pero ahora en una mezcla de hexano-acetato de etilo (8:2) y agregarla a la columna de manera uniforme, posteriormente aplicar la muestra adsorbida a la columna (Walton H y Rerres J. 1978). El proceso de elusión se efectúa de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1: Secuencia de elusión para obtener las 24 fracciones del fraccionamiento secundario.

No. de cambio de polaridad	Fracciones secundarias	Disolvente	Proporción
1	1 – 4	Hexano-AcOEt	8:2
2	5 – 8	Hexano-AcOEt	5:5
3	9 – 12	AcOEt	10
4	13– 16	AcOEt –MeOH	9.5:5
5	17 – 20	AcOEt –MeOH	5:5
6	21 – 24	MeOH	10

Recolectar 4 fracciones de 30 mL aproximadamente por solvente. Una vez obtenidas las fracciones hacer cambio de polaridad de acuerdo a la tabla 1. Concentrar las fracciones y analizarlas por CCF y reunir aquellas que poseen características

¹⁸ (Cromatografía en columna): La elusión de los diferentes componentes de la mezcla se realiza por gravedad. La columna se dispone verticalmente y se deposita la muestra en la parte superior y se hace fluir la fase móvil hacia abajo la elusión se lleva a cabo hasta que se han recogido todos los componentes de la mezcla en las distintas fracciones. Es posible ir variando la composición de la fase móvil hasta que se produce la completa elusión de los componentes.

cromatográficas similares. Detectar los grupos de fracciones secundarias que concentran la mayor actividad biológica, mediante la determinación de toxicidad en *A. salina* como se indica más adelante en la prueba biológica (Colegate S. 1993).

4. 4 Parte biológica

4. 4. 1 Cultivo de *Artemia salina* Leach

En una pecera, colocar una división vertical que separe una tercera parte de su capacidad, sin que esta división llegue completamente al fondo de la tina, dejando aproximadamente 0.5 cm de separación. Por otra parte pesar 19 g de sal de mar “Instant Ocean” y agregarla a la tina por cada 500 mL de agua destilada, adicionar unas gotas de solución anticloro para acuario y mezclar perfectamente. Verter esta agua de mar artificial en la pecera. Durante 30 minutos calentar el agua a 28°C y oxigenar con una bomba para pecera, después de este tiempo suspender la oxigenación y el calentamiento. Adicionar 50 mg de huevecillos de *A. salina* Leach en la división más pequeña de la pecera, y proteger esta área de la luz cubriéndola con papel aluminio. Cerca de la pecera, colocar una lámpara de escritorio para iluminar la parte descubierta de la tina, y mantenerla prendida por 48 horas para la incubación del crustáceo. Durante este proceso, calentar y oxigenar el agua cada 10 horas durante 20 minutos. A las 48 horas se verán las larvas de *A. salina* Leach que han eclosionado, nadando en la parte descubierta de la tina. Verter con mucho cuidado el agua con las larvas en un frasco transparente, evitar que no pasen huevecillos, lo que facilitará el conteo al realizar el bioensayo (Villar Ochoa C. A. 2000).

4. 4. 2 Bioensayo

Preparar 50 mL de agua de mar y oxigenar por 40 minutos. Preparar y rotular los tubos de ensayo del 1 al 6 y control (Colegate S. 1993).

4. 4. 2.1 Preparación de las concentraciones de los extractos a evaluar

Solución A: Pesar 20 mg de muestra y disolver en 2 mL del solvente apropiado.

Solución B: 0.5 mL de la solución A y aforar a 5 mL con el disolvente apropiado.

Solución C: 0.5 mL de la solución B y aforar a 5 mL con el disolvente apropiado.

Solución D: Pesar 10 mg de muestra y disolver en 2 mL del solvente apropiado.

Solución E: 0.5 mL de la solución D y aforar a 5 mL con el disolvente apropiado.

Tabla 2: Secuencia de los tubos para el bioensayo.

Soluciones	TUBOS					
	1	2	3	4	5	Control
Sol. A (mL)	0.5	-----	-----	-----	-----	-----
Sol. B (mL)	-----	-----	0.5	-----	-----	-----
Sol. C (mL)	-----	-----	-----	-----	0.5	-----
Sol. D (mL)	-----	0.5	-----	-----	-----	-----
Sol. E (mL)	-----	-----	-----	0.5	-----	-----
Evaporar el solvente						-----
Medio salino (mL)	1	1	1	1	1	1
Larvas de <i>A. salina</i> Leach	10	10	10	10	10	10
Concentración final (μ g/mL)	1000	500	100	50	10	-----
Aforar cada tubo a 5 mL con medio salino						

Incubar durante 24 horas, posteriormente hacer el conteo de larvas muertas.

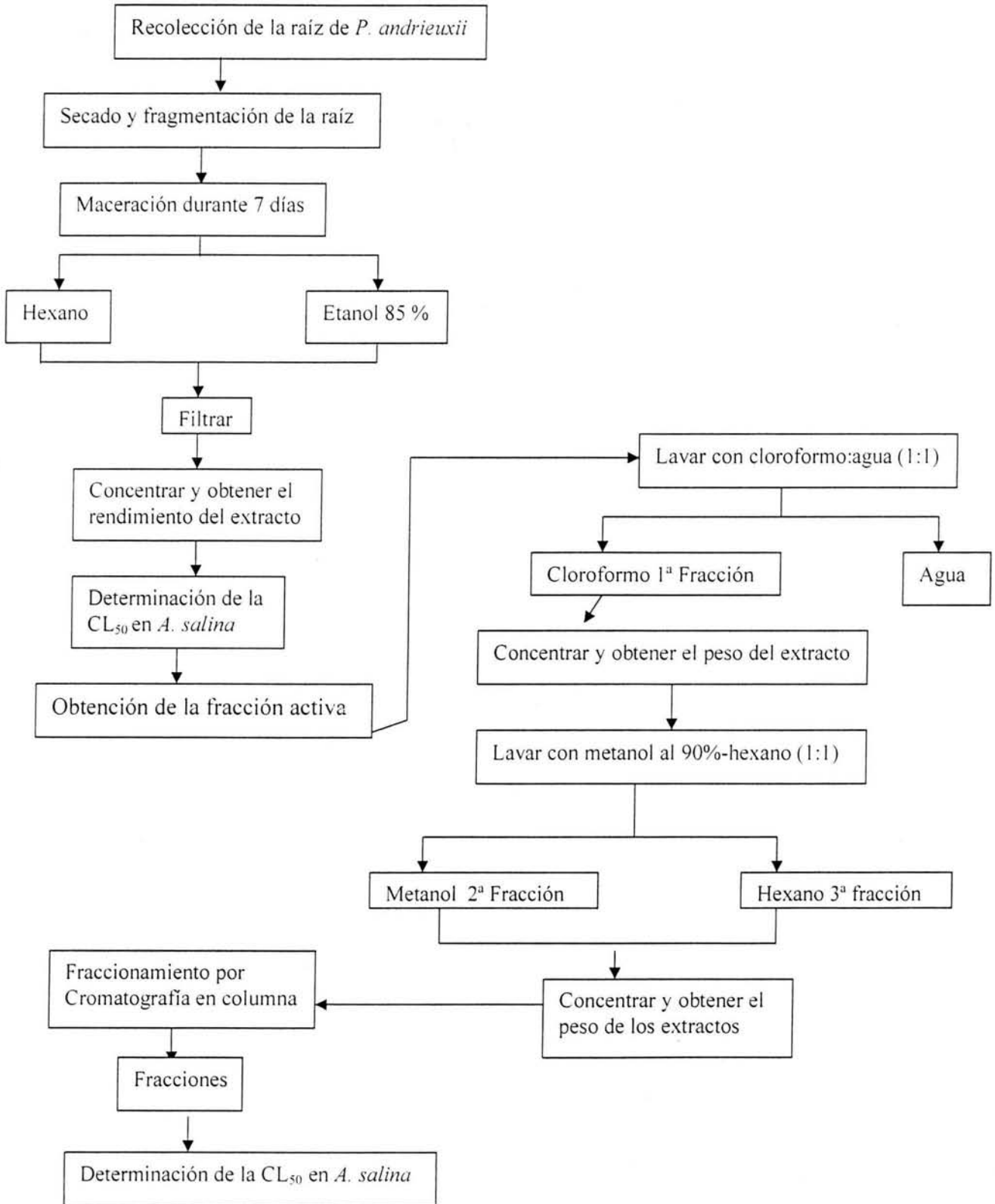
El ensayo se realiza por triplicado.

Determinar la concentración letal media¹⁹ mediante la curva dosis - respuesta²⁰

¹⁹ (CL₅₀, Concentración letal media): Es la dosis necesaria para producir la muerte en 50 por 100 de los individuos.

²⁰ (Curva dosis-respuesta): Es la representación gráfica que expresa la relación entre la dosis administrada y la respuesta obtenida. La representación puede ser lineal o semilogarítmica. Descripción de la curva dosis-respuesta: potencia, pendiente, efecto máximo.

4.5 Diagrama general del trabajo experimental



V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1 Obtención de un extracto activo

Se obtuvieron dos extractos, el primero de etanol al 85% que fue de color café, con un 20% de rendimiento, el segundo extracto de tipo hexánico mostró un color verde claro y un rendimiento de 1.53%.

Tabla 3. Resultados de la extracción.

Características	Extracto	
	Etanol al 85 %	Hexano
Color	Café	Verde claro
Peso	25.86 g	2.19 g
Rendimiento	20.43 %	1.53 %
Rf ²¹	0.86	0.72

²¹ (Rf = relación al frente): Es característica de la cromatografía en capa fina en donde el movimiento de cada sustancia en un determinado sistema es característico y puede ser un dato valioso en la identificación de la misma; representa la distancia recorrida por el compuesto, en relación a la distancia recorrida por la fase móvil por lo que sus valores oscilarán entre 0 y 1.

5. 1. 1 Bioensayo en *Artemia salina* realizado al extracto etanólico al 85 % de *Pentalinon andrieuxii*

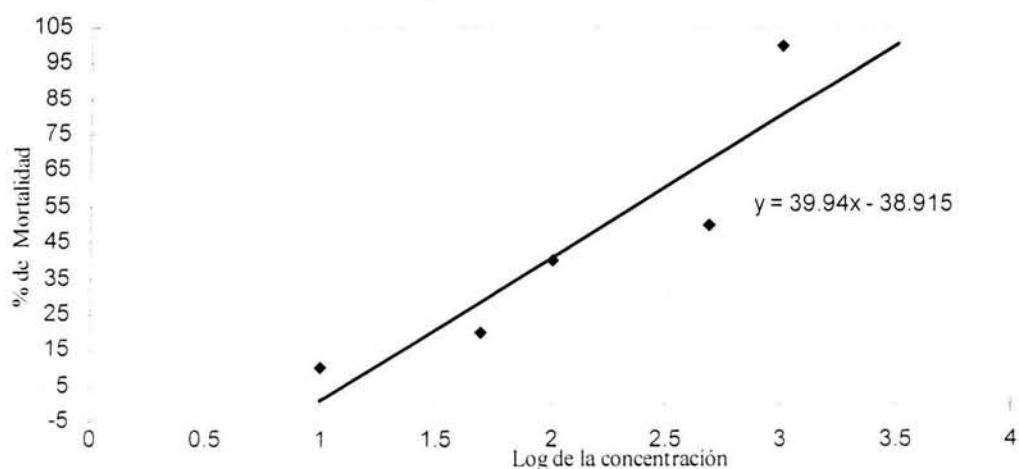
El porcentaje de mortalidad del extracto en etanol al 85% de las diferentes concentraciones empleadas, se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* del extracto de etanol al 85%.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	10	100
500	2.69	5	50
100	2	4	40
50	1.69	2	20
10	1	1	10

En la gráfica 1 se presenta el comportamiento del Log de la concentración-respuesta mostrado por el extracto etanólico al 85 %, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9080 y una $CL_{50} = 165.95 \mu\text{g/ mL}$.

Gráfica 1: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* del extracto etanólico al 85%



5. 1. 2 Bioensayo en *Artemia salina* realizado al extracto hexánico de *Pentalinon andrieuxii*

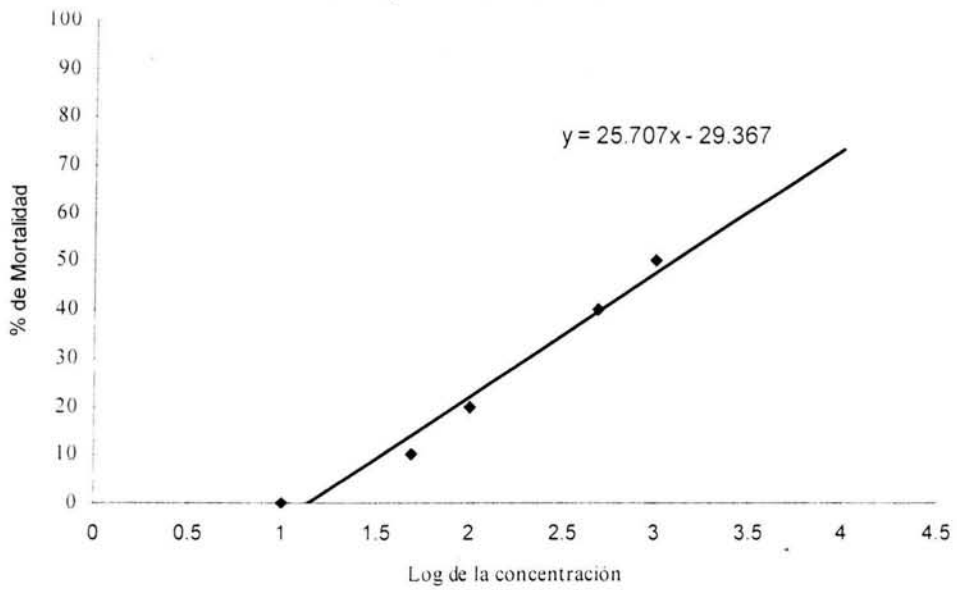
En la tabla 5 se presenta el porcentaje de mortalidad del extracto en hexano en función de las diferentes concentraciones empleadas.

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* del extracto hexánico.

Concentración µg/mL	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	5	50
500	2.69	4	40
100	2	2	20
50	1.69	1	10
10	1	0	0

El comportamiento del Log de la concentración-respuesta mostrado por el extracto hexánico se presenta en la gráfica 2, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9885 y una $CL_{50} = 1202.26 \mu\text{g/mL}$.

Gráfica 2: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* del extracto hexánico



5.2 Fraccionamiento primario del extracto etanólico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii*

La fracción 1 fue obtenida de la separación de cloroformo-agua (1:1), siendo la parte cloroformica un peso de 2.39g esta fracción se llevo a otra separación con metanol al 90%-hexano (1:1), donde se obtuvieron las fracciones 2 y 3, la fracción 2 es la de metanol la cual tuvo un peso 5.6g mientras que la fracción 3, la de hexano tuvo un peso de 0.57g.

Tabla 6. Fraccionamiento primario de la raíz de *Pentalinon andrieuxii*.

	Fracción		
	1	2	3
Rendimiento en gramos	2.39	5.61	0.57
Rf	0.65	0.81	0.71

5.3 Fraccionamiento secundario biodirigido de las fracciones primarias del extracto etanólico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii*

A la fracción 2 (metanólica) del fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico primario de la raíz de *P. andrieuxii*, se le realizaron diferentes cambios de polaridad de acuerdo a la tabla 1. De cada disolvente se obtuvieron 4 fracciones de 30 mL aproximadamente.

La siguiente placa cromatográfica es solo de 19 fracciones de las 24 obtenidas, debido a que se eliminaron las 5 primeras por no tener presencia al ser revelada con la lámpara de luz ultravioleta y reafirmada con yodo.

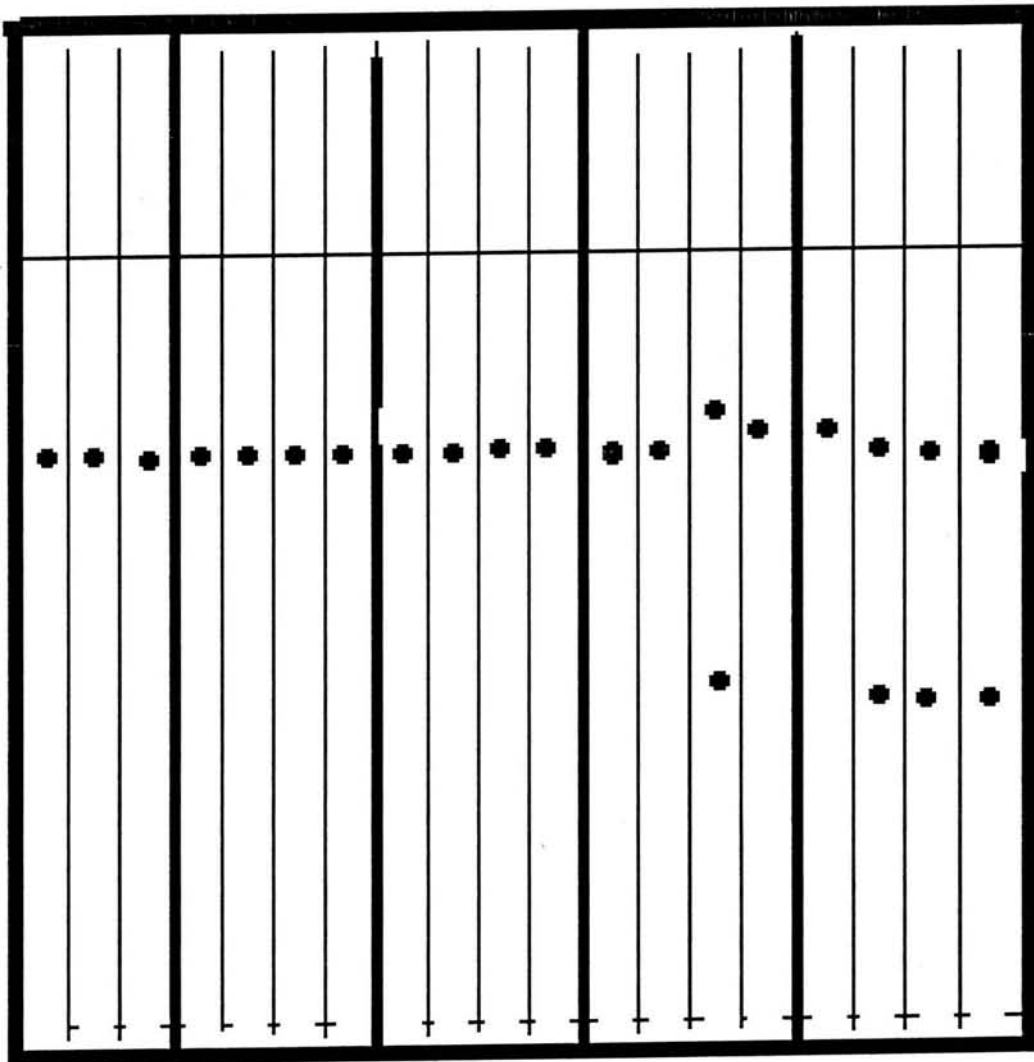


Figura 8. Corrimiento de las 19 fracciones del fraccionamiento secundario.

Se unieron de la 6 -17 para formar ahora la fracción I, la 18 es la fracción II, la 19-20 es la fracción III, mientras que la fracción IV es de 21-24. Teniendo finalmente cuatro fracciones a las que se les realizó nuevamente una CCF, que fue revelada con la lámpara de luz ultravioleta y luego con yodo.



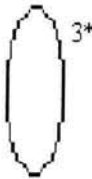
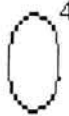



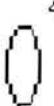
I	II	III	IV
			
			

Figura 9. Fracciones derivadas de la unión de las segundas fracciones.

Las fracciones I, II, III y IV indican las fracciones finales que se evaluaron en *A. salina* y que se corrieron en CCF, de las cuales se obtuvieron 2 manchas después de la elusión por cada mancha representada, los números 1 a la 4 y 1* a la 4*, se les determinó su espectro en infrarrojo (IR) que se presentan en el anexo.

5.3.1 Bioensayo realizado a la fracción I

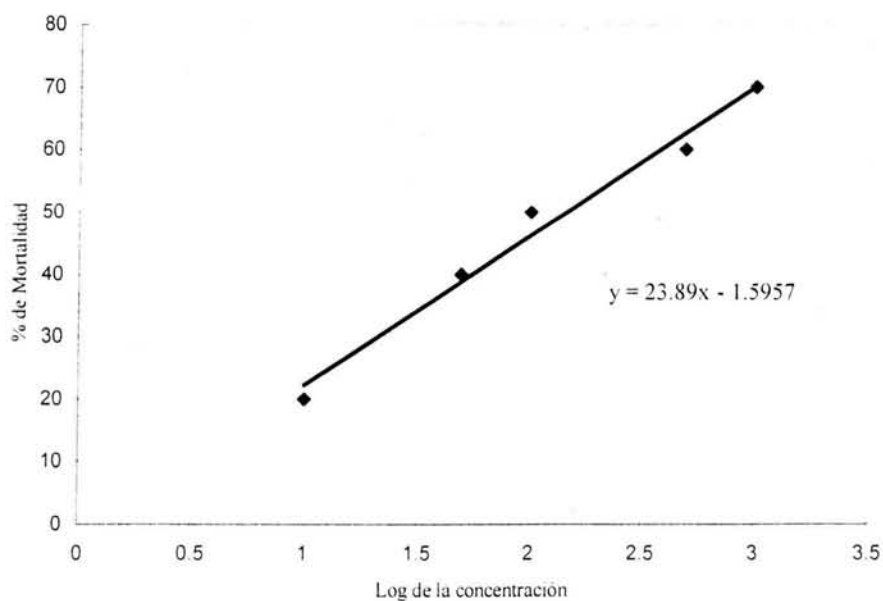
El porcentaje de mortalidad de la fracción I en función de las diferentes concentraciones empleadas se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* de la fracción I.

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	7	70
500	2.69	6	60
100	2	5	50
50	1.69	4	40
10	1	2	20

En la gráfica 3 se presenta el comportamiento del log de la concentración-respuesta mostrado por la fracción I, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9903 y una $CL_{50} = 141.25 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Gráfica 3: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* de la fracción I



5.3.2 Bioensayo realizado a la fracción II

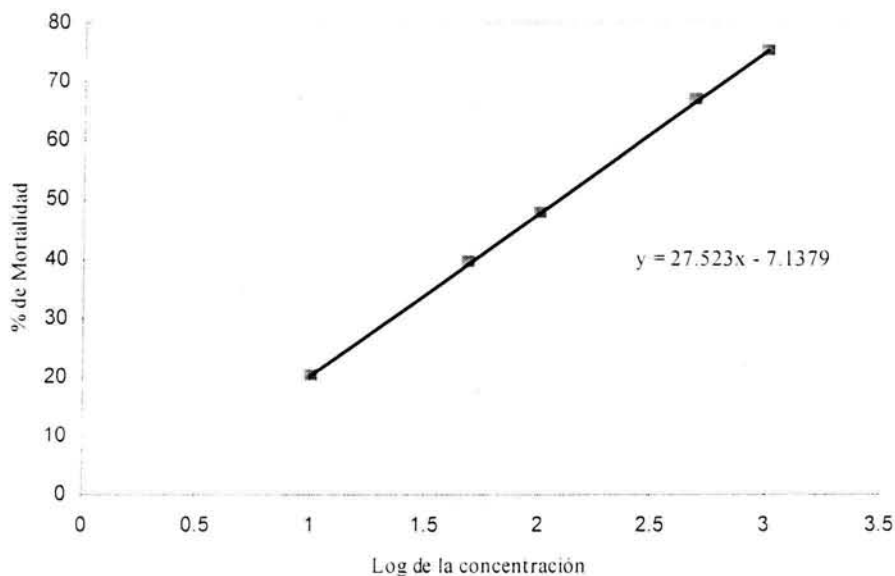
En la tabla 8 se presenta el porcentaje de mortalidad de la fracción II en función de las diferentes concentraciones empleadas.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* de la fracción II.

Concentración $\mu\text{g}/\text{mL}$	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	8	80
500	2.69	6	60
100	2	5	50
50	1.69	4	40
10	1	2	20

El comportamiento del Log de la concentración-respuesta mostrado por la fracción II, se presenta en la gráfica 4, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9814 y una $CL_{50} = 119.12 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Gráfica 4: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* de la fracción II



5. 3. 3 Bioensayo realizado a la fracción III

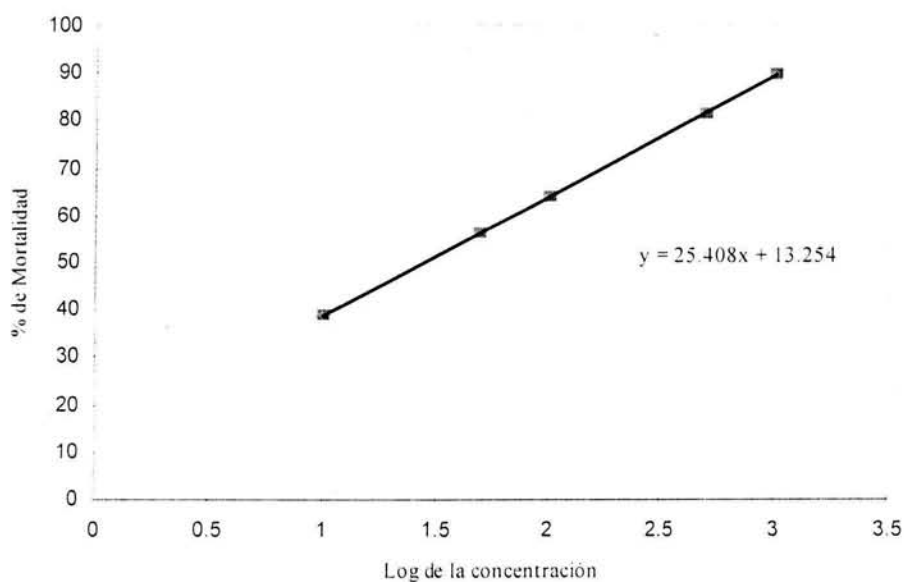
El porcentaje de mortalidad de la fracción III en función de las diferentes concentraciones empleadas se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* de la fracción III.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	9	90
500	2.69	8	80
100	2	7	70
50	1.69	5	50
10	1	4	40

En la gráfica 5 se presenta el comportamiento del Log de la concentración-respuesta mostrado por la fracción III, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9770 y una $CL_{50} = 27.54 \mu\text{g/ mL}$.

Gráfica 5: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* de la fracción III



5. 3. 4 Bioensayo realizado a la fracción IV

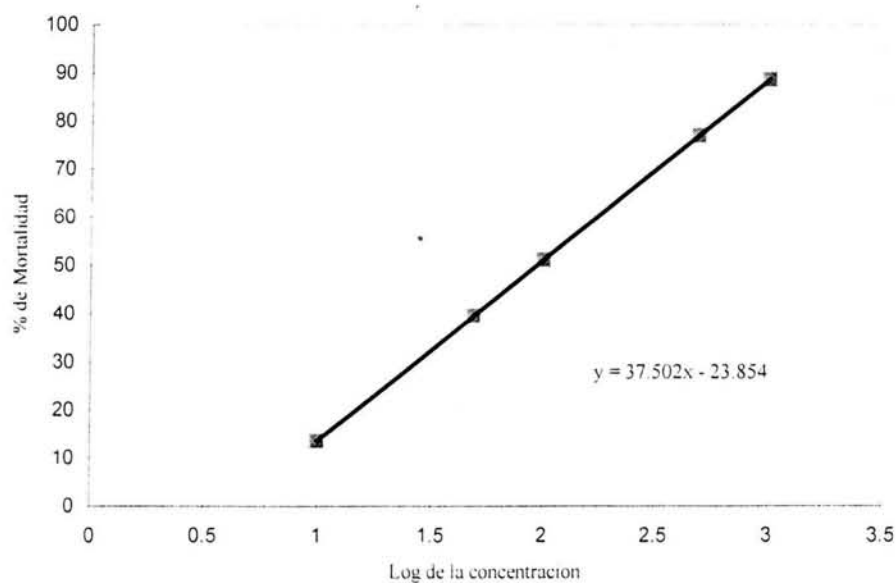
En la tabla 10 se presenta el porcentaje de mortalidad de la fracción IV en función de las diferentes concentraciones empleadas.

Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* de la fracción IV.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Log de la concentración	Media de mortalidad	% de mortalidad
1000	3	9	90
500	2.69	7	70
100	2	6	60
50	1.69	4	40
10	1	1	10

El comportamiento del Log de la concentración-respuesta mostrado por la fracción IV, encontrando un coeficiente de correlación lineal de 0.9805 y una $CL_{50} = 91.20 \mu\text{g/mL}$.

Gráfica 6: Curva dosis-respuesta en *Artemia salina* de la fracción IV



VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la clasificación taxonómica de la planta se tuvieron algunos problemas, ya que fue difícil conseguir la flor, debido a que solo florece en una vez al año durante el mes de junio; y puesto que el trabajo no se inició si no hasta bien entrado el mes de septiembre, hubo que esperar prácticamente un año para la recolección y preparación del material suficiente.

En el primer paso se trabajó con dos extractos, el etanólico y el hexánico; el primero fue con el que se continuó trabajando ya que tuvo la mayor actividad y el mayor rendimiento siendo la $CL_{50} = 165.95 \mu\text{g/mL}$ y 20.43% de rendimiento comparado con el segundo $CL_{50} = 1202.26 \mu\text{g/mL}$ y 1.53% de rendimiento, este último fue descartado este último, debido a que su CL_{50} es mayor de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

En la segunda parte, se llevó el extracto etanólico a una separación cloroformo-agua (1:1), en la que posteriormente el extracto de la parte clorofórmica pesó 2.39g. La fase orgánica se separó con metanol al 90 %-hexano (1:1), de aquí se continuó trabajando con la fracción metanólica ya que su peso fue mayor que la hexánica 5.61g y 0.71g respectivamente. La fracción 2 pesaba más que la 1, esto es debido a que la muestra es soluble en agua y difícil de extraer, por lo que contribuyó al peso.

La fracción de mayor actividad fue la III con una $CL_{50} = 27.54 \mu\text{g/mL}$, luego la fracción IV con una $CL_{50} = 91.2 \mu\text{g/mL}$, en tercer lugar se tiene a la fracción II con una $CL_{50} = 119.12 \mu\text{g/mL}$, y por último está la fracción I con una $CL_{50} = 141.25 \mu\text{g/mL}$.

En la fracción III que proviene de la fracción secundaria 18, se encontró una gran luminosidad que fue característica solo de esta.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Al término de la cromatografía en columna se obtuvieron 24 fracciones, de las cuales se eliminaron las seis primeras debido a que no se observó la presencia del producto por CCF, las 19 restantes se unieron de acuerdo a como se visualizaron en la placa cromatográfica, quedando unidas de la siguiente manera y representados como las fracciones I, II, III, IV mismas que se evaluaron en *A. salina*, y se corrieron en CCF y revelado en la luz ultravioleta y yodo, de las cuales se obtuvieron 2 manchas por fracción, a la fracciones de la 1 a la 4 y de la 1* a la 4*, a las que se les determinó su espectro de infrarrojo.

Todos los espectros de infrarrojo son muy parecidos, se pueden observar la presencia de enlaces $C_{sp^3} - H$.

Las larvas de *A. salina* son los organismos ideales para las pruebas de toxicidad que se les realizan a los extractos de las plantas o a compuestos químicos, hoy en día la *A. salina* es el único crustáceo que esta disponible para estas pruebas (Foster 1984).

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo la identificación taxonómica de la planta conocida comúnmente como “*contra bejuco*”, cuyo nombre científico es *Pentalinon andrieuxii* Muell. Arg., a la cual se le determinó la actividad biológica en el crustáceo *Artemia salina* graficando la curva dosis – respuesta para obtener la CL_{50} .

Se realizaron dos extracciones de la planta, una con etanol al 85% y otra con hexano, la primera tuvo el mayor rendimiento al registrar un 20.43%; así como también la mayor actividad biológica con una $CL_{50} = 165.95 \mu\text{g/mL}$.

Haciendo una cromatografía en columna del extracto etanólico se obtuvieron 24 fracciones. utilizando la CCF para unir las fracciones semejantes se obtuvieron cuatro fracciones finales, de las cuales la más activa fue la III con una $CL_{50} = 27.54 \mu\text{g/mL}$.

El extracto etanólico de la planta *Pentalinon andrieuxii*, será estudiado en una segunda parte de este proyecto; por lo que se recomienda comprobar la actividad “*in vivo*” como antídoto contra mordeduras de serpientes, del extracto, haciendo una titulación veneno-extracto en ratones como lo marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) u otras fuentes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abas A. Lichtman A. Pober J. "Inmunología celular y molecular", Interamericana McGraw – Hill, tercera 3ra España: 341-347 (1999).
2. Borges Argaez. Et-al. "Bioactive metabolites from Yucatecan medicinal plants". *Phytochemicals and phytopharmaceuticals*: 332 –341 (2000).
3. Borges M., et-al. "Neutralization of proteases from *Bothrops* snake venoms by the aqueous extract from *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)". *Toxicon* **39**: 1863-1869 (2001).
4. Bogarín G. et-al. "Neutralización, by a monospecific *Bothrops Lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms". *Toxicon* **37**: 551-557 (1999).
5. Calderon L. y Lomonte B. "Inhibition of the myotoxin activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115 –129". *Toxicon* **37**: 683 – 687 (1999).
6. Cannell R.. "Methods in biotechnology natural products isolation". Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA **4**: 1-89 (1998).
7. Castro, O., Gutiérrez, J.M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M & Umaña, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes:Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop* **47**: 605-616 (1999).
8. Chemical Abstracts. Vol. 132 No. 24: 908 –909 (2000).
9. Centro de Información Toxicológica de Veracruz (CITVER) Mordeduras de serpientes.

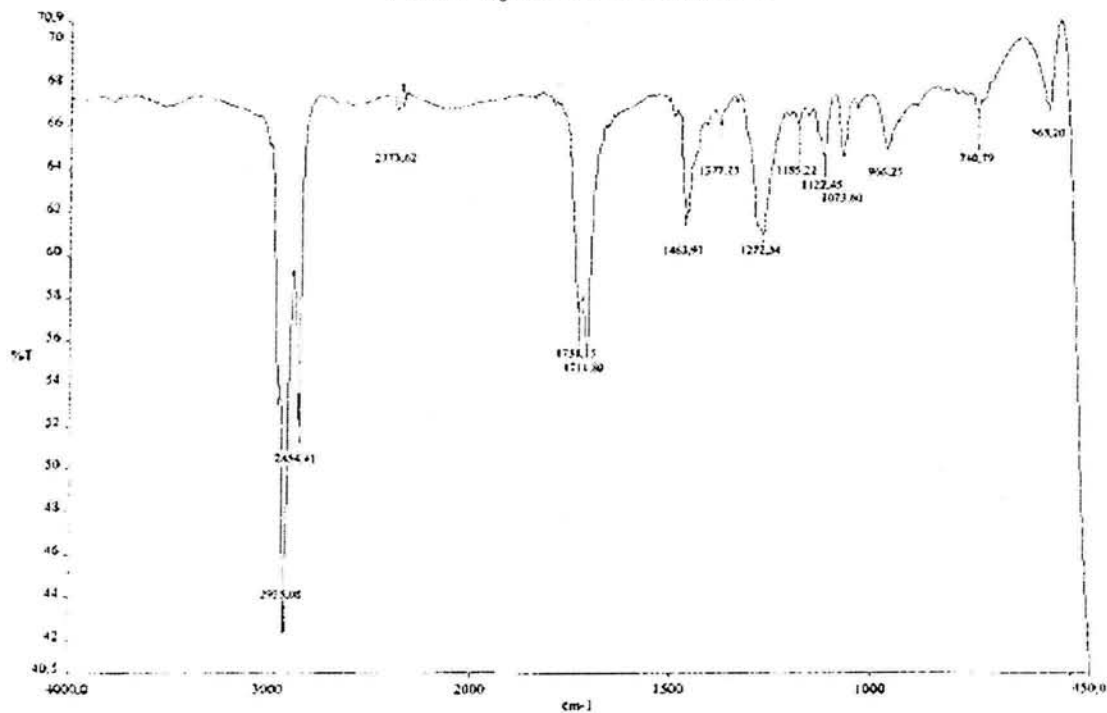
10. Colegate Steven, Molyneux. "Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination". Boca raton ann arbor, USA: 442-456 (1993).
11. Evans J. y Ownby C. "Neutralization of edema, hemorrhage and myonecrosis induced by North American crotalid venoms in simulated first-aid treatments". *Toxicon* **37**: 633-650 (1999).
12. Foster G. "A quantitative structure-activity relationship between partition coefficients and the acute toxicity of naphthalene derivatives in *Artemia salina* naiplii". *Aquatic toxicology* **5**: 245-54.
13. Harris Daniel. "Quantitative chemical analysis". 3^a ed. Freeman and company, USA: 603 – 692 (1991).
14. Instituto nacional indigenista Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana Tomo **1** (1994).
15. Issaq Haleem. "A century of separation science". Mercel dekker USA: 5–7 (2002)
16. Kuklinsky Claudia. "Farmacognosia estudios de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural". Omega, Barcelona: 32 – 48 (2000).
17. Lear Bohlin Bruñi Jan. "Bioassay methods in natural product research and drug development". Kluwear academic publisher, USA **4**:37-50 (1998).
18. López Torres M. "Arácnidos y serpientes venenosas". Trillas. México: 37-51 (1994)
19. Meyer B. "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". *Medicinal plant research medica* **45**: 31-4 (1982).
20. Newell J. "Remedios antiguos y nuevos contra las serpientes". *Revista Info Médica. Educación para la salud*. **13**: 36 – 37. (2002).

21. Rzedowski, J. & G. Calderón de R. Apocynaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fasc. 70. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Mich: 64 (1998).
22. Valledor de Lozaga A. "Envenenamiento por animales, animales venenos y urticantes del mundo". Díaz de los Santos S.A. España: 51 (1994).
23. Villar Ochoa C. A. La Artemia salina y su importancia en la producción camaronera. AquaTIC 1 (2000).
24. Villar del Fresno Angel. "Farmacognosia General". Síntesis Farmacia, España: 83-97 (1999).
25. Walton H y Rerres J. " Análisis químico e instrumental" Reverté, España: 323 –347 (1978).
26. <http://www.revistaaquatic.com>.
27. www.drpez.com/drali1.htm.
28. www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/pentalinon_andrieuxii.htm.
29. <http://www.qui.una.py>. Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Químicas.

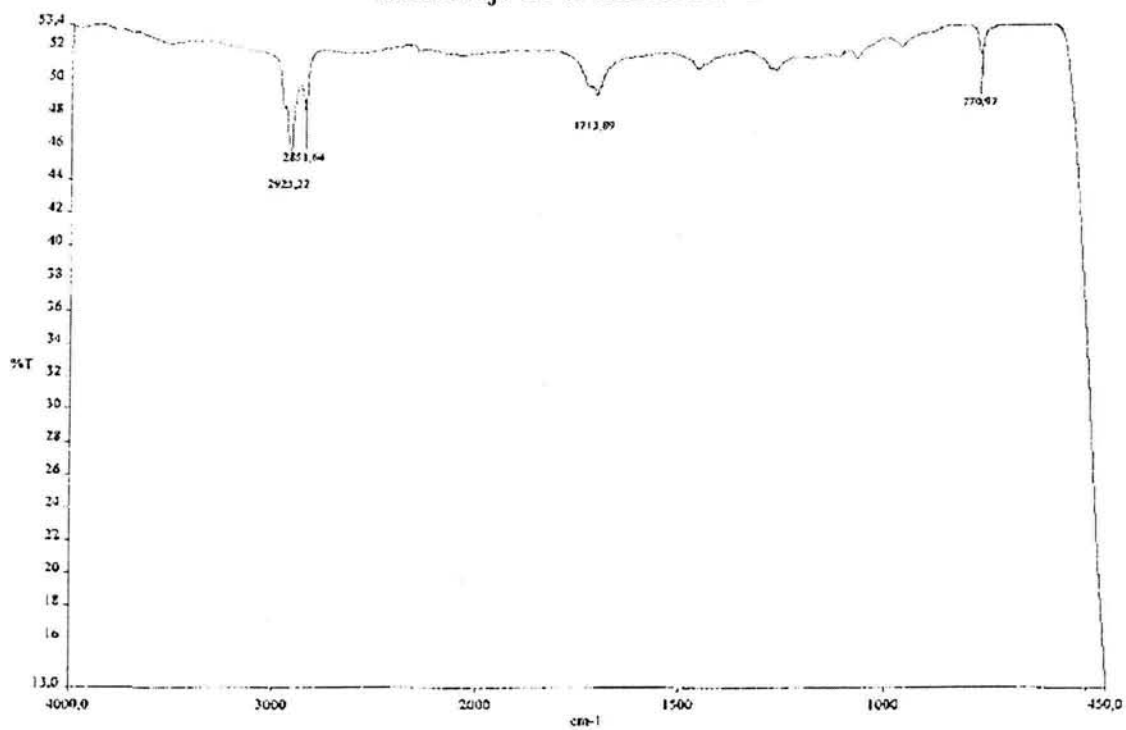
IX. ANEXOS

IX. ANEXOS

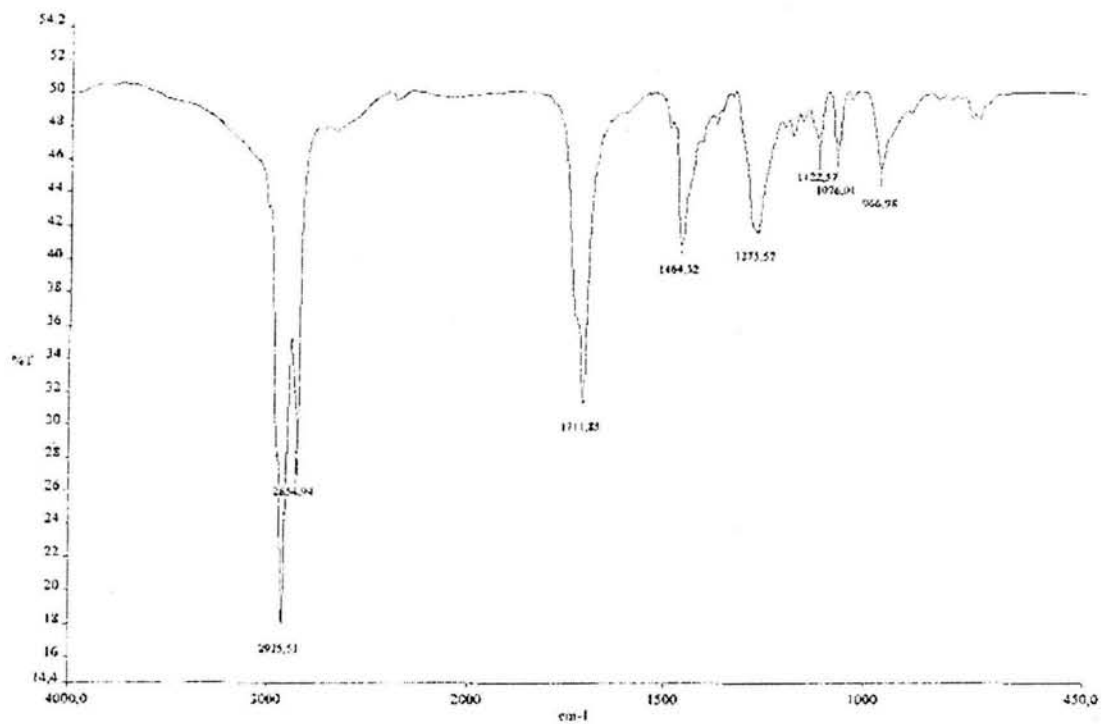
Infrarrojo de la fracción I. 1



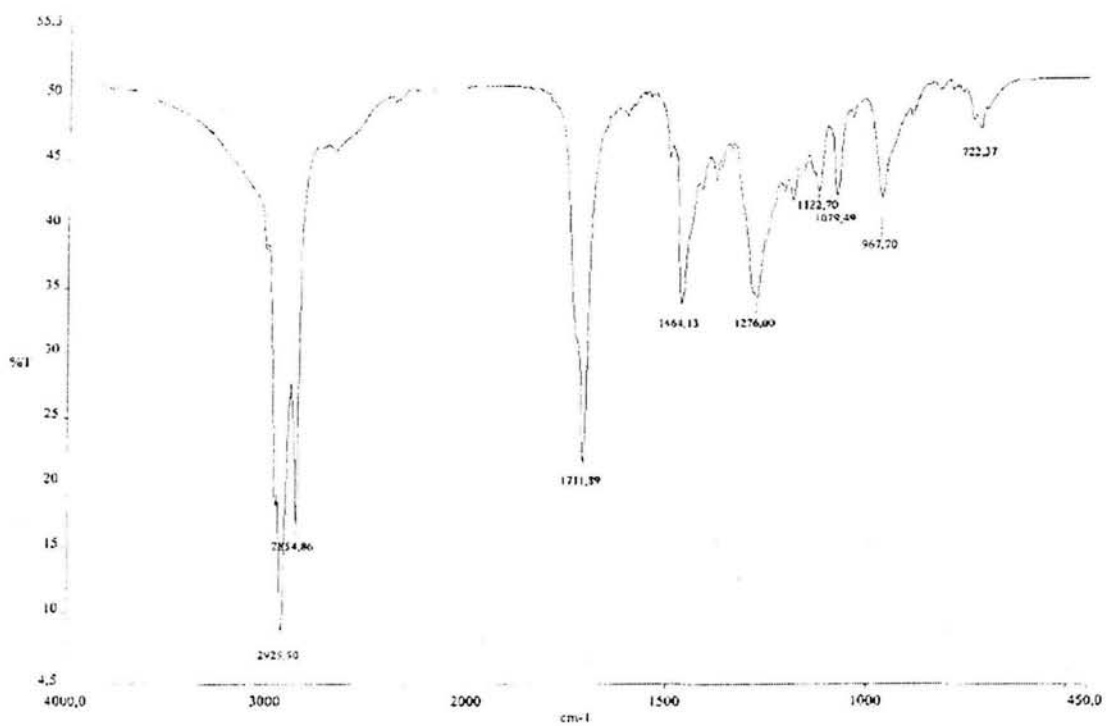
Infrarrojo de la fracción I. 1*



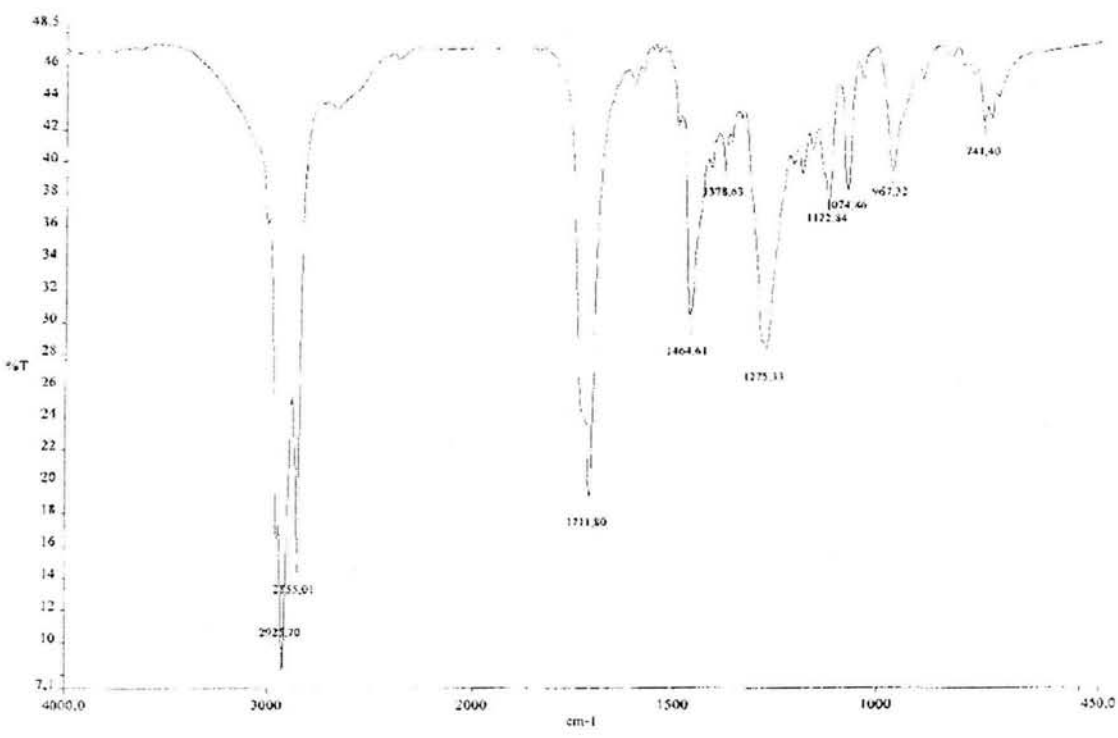
Infrarrojo de la fracción II. 2



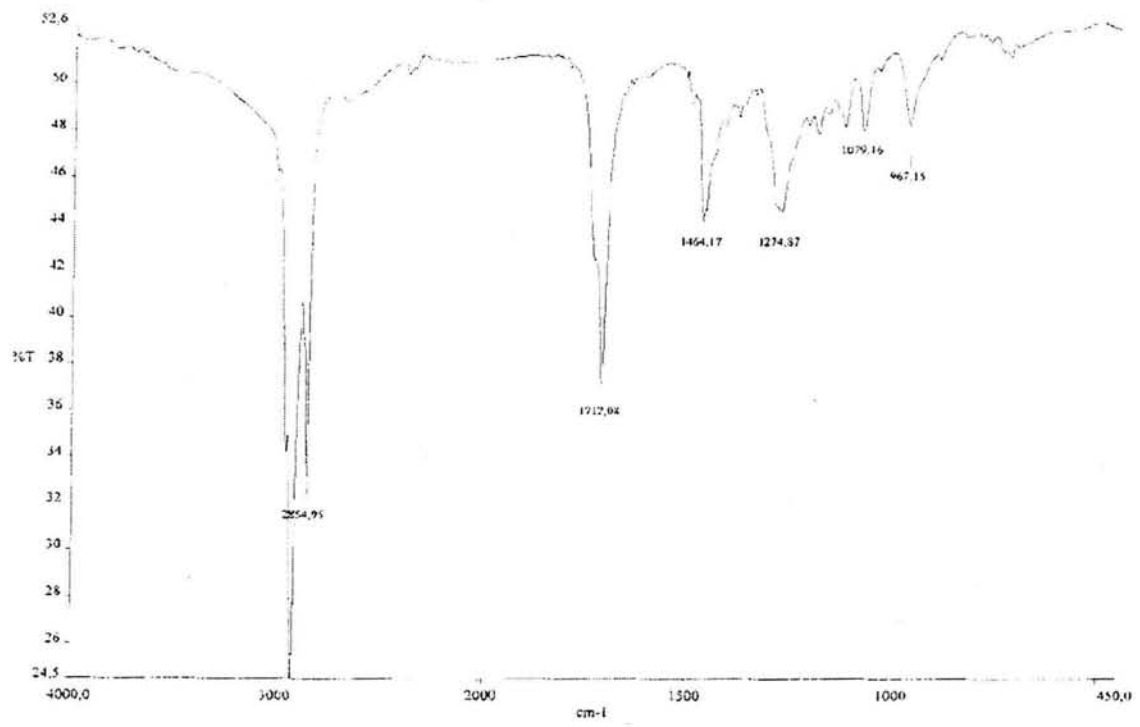
Infrarrojo de la fracción II. 2*



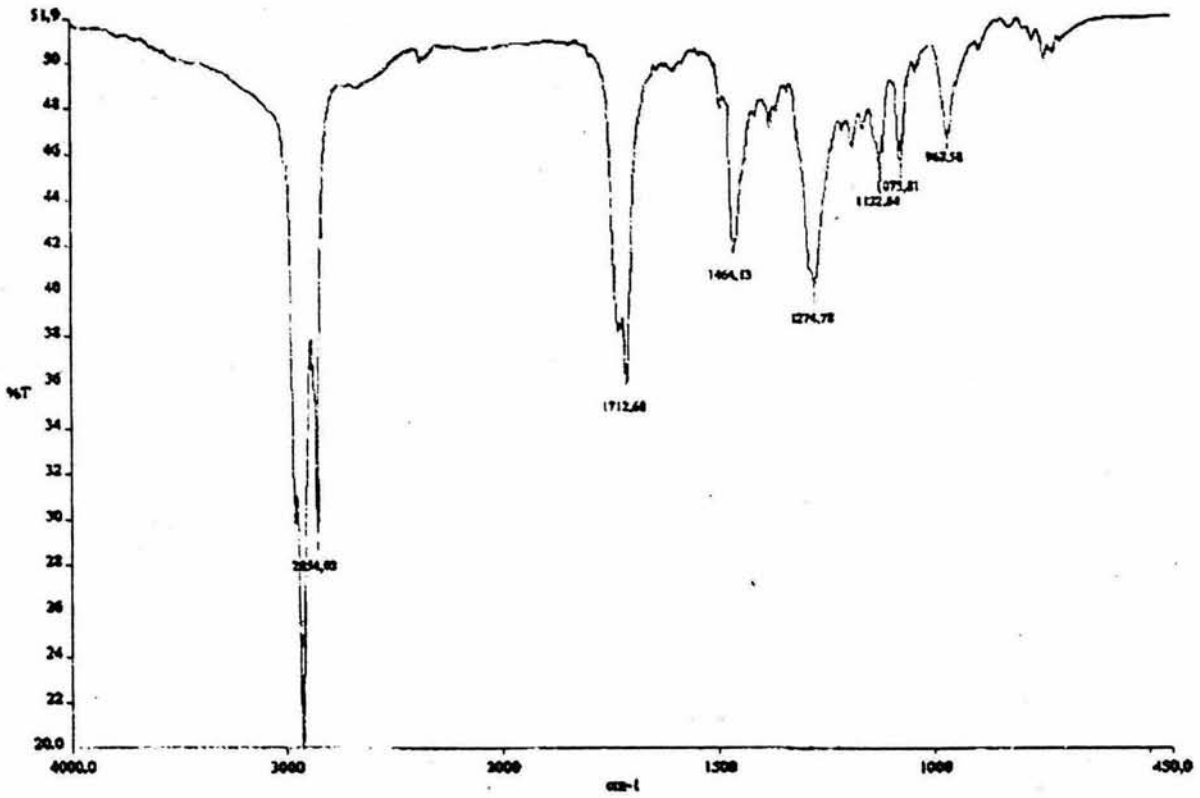
Infrarrojo de la fracción III. 3



Infrarrojo de la fracción III. 3*



Infrarrojo de la fracción IV. 4



Infrarrojo de la fracción IV. 4*

