



Universidad Nacional Autónoma De México

Facultad De Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación Farmacológica de los Extractos de yoyote
(*Thevetia sp*) en Corazón Aislado y Perfundido Mediante el
Método Langendorff

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
TERESITA DEL NIÑO JESÚS OCHARÁN AMEZCUA

Director: Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez

Asesor: Q. María Guadalupe Miranda Jimeno

México D.F., 14 de marzo del 2005

m341308



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

AL DISTINGUIDO JURADO:

Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ

Q. MA. GUADALUPE MIRANDA JIMENO

QFI. ESTELA VALENCIA PLATA

M EN C RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

QFB. LETICIA CECILIA JUÁREZ

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN CONJUNTO.

LAB. L-311 DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
"IGNACIO CHAVEZ" SS.

ÍNDICE

	Pag.
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Enfermedades Cardiovasculares	3
2.1.1. Anatomía y Fisiología del Corazón Sano	4
2.1.2. Mecanismo de la Contracción Cardíaca	7
2.1.3. Insuficiencia Cardíaca Congestiva	9
2.1.3.1. Signos y Síntoma	10
2.1.3.2. Tratamientos	10
2.2. Plantas Medicinales	12
2.2.1. Usos Tradicionales	13
2.2.2. Modos de Empleo	13
2.2.3. Métodos de Extracción de Principios Activos Presentes en Fuentes Vegetales	14
2.3. Yoyote (<i>Thevetia sp</i>)	16
2.3.1. Descripción Botánica	16
2.3.2. Composición Química	18
2.3.3. Usos en la Medicina Tradicional	19
2.3.4. Toxicidad	19
2.3.5. Proceso de Extracción	19

2.4. Métodos de Evaluación de Fármacos con Actividad	
Cardiovascular	20
2.4.1. Generalidades	20
2.4.2. Métodos <i>In Vivo</i>	21
2.4.2.1. Corazón en Rana	21
2.4.2.2. Corazón en Tortuga	21
2.4.3. Métodos <i>In Vitro</i>	22
2.4.3.1. Corazón en Rana	22
2.4.3.2. Corazón Aislado y Perfundido Según Langendorff	23
2.5. Técnicas Analíticas	27
2.5.1. Cromatografía en Capa Fina	27
2.5.2. Identificación Cualitativa	27
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV. OBJETIVOS	30
V. HIPÓTESIS	31
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	32
6.1. Población de Estudio	32
6.2. Criterios	32
6.2.1. De Inclusión	32
6.2.2. De Exclusión	32
6.2.3. De Eliminación	32
6.3. Variables de Estudio	33

6.4. Material y Equipo	33
6.4.1. Material de vidrio	33
6.4.2. Reactivos	33
6.4.3. Equipo	35
6.4.4. Recursos varios	35
6.5. Método	35
6.5.1. Extracción	35
6.5.2. Identificación	36
6.5.3. Evaluación farmacológica	37
VII. RESULTADOS	39
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS	53
IX. CONCLUSIONES	56
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Fig.1. Esquema representativo del intercambio iónico necesario para la contracción	7
Fig. 2. Estructura molecular de la digoxina	10
Fig. 3. Yoyote (<i>Thevetia Thevetioides</i>)	16
Fig. 4. Estructura de Tevetina A y B	18
Fig. 5. Vista frontal del corazón	24
Fig. 6. Esquema del método Langendorff	26
Fig. 7. Placas cromatográficas que muestran la elución de los extractos de yoyote y el estándar de tevetina	40
Fig. 8. Placas cromatográficas que muestran la elución de los extractos de yoyote y el estándar de tevetina al ser revelados con ácido tricloroacético	42
Fig. 9. Placa cromatográfica de los extractos etanólico y metanólico	44
Fig. 10. Efecto de los extractos de <i>Thevetia thevetioides</i> sobre el músculo cardiaco	46
Fig. 11. Efecto de los extractos de yoyote sobre la presión intraventricular izquierda	48
Fig. 12. Efecto de los extractos de semilla de yoyote sobre la resistencia vascular coronaria	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Resultados de los extractos obtenidos en los diferentes sistemas de extracción	39
Tabla 2. Resultados del estudio cromatográfico realizado a los extractos en el sistema etanol/acetato de etilo (1:1 v/v)	41
Tabla 3. Resultados de la prueba para glicósidos cianogénicos con ácido tricloroacético	42
Tabla 4. Estudio cromatográfico de los extractos	43
Tabla 5. Resultados de la evaluación de la miscibilidad de los extractos	45
Tabla 6. Evaluación farmacológica preliminar de los Extractos mediante el método Langendorff	45
Tabla 7. Efecto de los extractos de <i>Thevetia thevetioides</i> sobre presión intraventricular izquierda	47
Tabla 8. Efecto de los extractos de <i>Thevetia thevetioides</i> sobre la resistencia vascular coronaria	50

ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo	Kg	kilogramos
<i>ad libitum</i>	libre suministro de agua	m	metros
ADP	difosfato de adenosina	μ L	microlitros
ATP	trifosfato de adenosina	μ m	micrómetros
AV	aurículoventricular	μ M	micromolar
Ca ²⁺	ion calcio	mL	mililitros
cm	centímetros	mm	milímetros
CL ₅₀	concentración letal media	mmHg	milímetros de mercurio
ccf	cromatografía en capa fina	mM	milimolar
d.C.	después de Cristo	mV	milivoltios
DE ₅₀	dosis efectiva media	min	minutos
DL ₅₀	dosis letal media	nm	nanómetros
DT ₅₀	dosis tóxica media	nmoles	nanomoles
EDTA	etilendiamino tetracetato sódico	⁻ OH	ion hidroxilo
EUA	Estados Unidos de América	pH	potencial de iones hidrógeno
g	gramos	PII	presión intraventricular izquierda
°C	grados Celcius	RA	reactivo analítico
Hz	Herzt	RVC	resistencia vascular coronaria
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	SA	sinoauricular
ip	intraperitoneal	SNC	sistema nervioso central
iv	intravenosa	<i>sp</i>	especie
K ⁺	ion potasio	UI	unidades internacionales
Na ⁺	ion sodio	UV	ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia cardíaca congestiva es una enfermedad que aqueja a millones de personas en todo el mundo, con un nivel de mortandad muy elevado (40% del total de las muertes), para tratar este problema existen diversos tratamientos farmacológicos, siendo la digoxina el fármaco mas empleado en la terapéutica, la cual posee ciertos efectos secundarios, así como un margen de seguridad muy estrecho, debido a esto se realizan día con día estudios con el fin de encontrar nuevas y mejores sustancias que compitan con la digoxina en efecto terapéutico, así como en un margen de seguridad mas amplio.

Es en este campo de estudio donde se origina la inquietud por evaluar el yoyote, una planta utilizada por nuestros ancestros desde hace varios cientos de años, de la cual se ha visto, tiene diversos usos populares entre los que destaca un efecto farmacológico del tipo digitálico, siendo ésta la razón del desarrollo del presente trabajo.

Por otra parte el yoyote contiene un sinnúmero de componentes los cuales tienen diferentes efectos en el organismo como cicatrizante, contra úlceras y tumores, específicamente es el efecto cardiotónico el que es motivo de estudio.

Para evaluar el efecto sobre el corazón se utiliza el modelo de órgano aislado según Langendorff, el cual permite determinar el efecto íntegro sobre el músculo cardíaco sin la influencia de otros órganos, como lo son el hígado y el riñón. Bajo este modelo es posible determinar el efecto terapéutico, la eficacia, la eficiencia, la potencia y el efecto tóxico de las sustancias de prueba, así como la realización de estudios biohemodinámicos y bioquímicos de los activos en estudio, en éste caso, los extractos de yoyote.

Dentro de los estudios a realizar, se determinará el o los sistemas de extracción mas adecuados para el tipo de activo que se desee obtener, el cual deberá ser un procedimiento sencillo, económico y eficaz que ofrezca buen rendimiento, así como una buena calidad del producto de interés. Para ello se utilizarán diversos procedimientos extractivos, realizando paralelamente un estudio cromatográfico en capa fina que permita la identificación de los componentes en estudio mediante sistemas de revelado cromatográfico específicos que garanticen la evaluación del componente deseado.

Identificado el extracto que contiene la sustancia o sustancias que generan el efecto deseado será posible el desarrollar técnicas que permitan aislar y purificar adecuadamente el o los activos del yoyote para en un futuro desarrollar líneas de investigación que permitan llevarlos a la terapéutica en humanos en la insuficiencia cardiaca congestiva.

Así mismo se reforzaran las técnicas de estudio aprendidas durante la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, reafirmando los conocimientos teórico-prácticos de diversas asignaturas en el ámbito farmacognosta, así como, farmacológico, poniendo a prueba la capacidad para resolver problemas, así como la habilidad de encontrar soluciones y respuestas que permitan, bajo el diseño de estrategias, aportar un beneficio en pro de la ciencia y por la ciencia misma en beneficio de la humanidad.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Enfermedades Cardiovasculares

Una de las principales causas de muerte se refiere a las enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular, entre las cuales pueden citarse a las siguientes: hipertensión e hipotensión arterial, infarto al miocardio, arritmias e insuficiencia cardíaca. Es muy importante diagnosticar y dar el tratamiento adecuado a tales enfermedades, ya que es posible que en cuestión de minutos una persona sin tratamiento y cuidados presente un cuadro muy severo de consecuencias graves e irreversibles, e incluso llegue a la muerte.^{10, 11, 30}

La Organización Mundial de la Salud estimó que las enfermedades cardiovasculares representaban la causa más frecuente de mortalidad en el ámbito mundial. Asimismo reconoce que la epidemia de las enfermedades cardiovasculares avanza rápidamente en países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo. En México, este grupo de enfermedades constituye un problema de salud pública, las enfermedades del corazón constituyen la primera causa de muerte y anualmente ocurren cerca de 70,000 defunciones por este motivo, 26,000 por enfermedades cerebrovasculares y 44,070 por enfermedad isquémica del corazón, siendo 24,102 hombres y 19,965 mujeres. La enfermedad arterial aterosclerótica, que es causante de isquemia del miocardio, encéfalo y otros órganos, es la principal causa de muerte en los países desarrollados, con una mortalidad de más del 40% de todas las muertes en EUA. En este país la hipertensión arterial sistémica afecta a un número estimado de 25 millones de adultos presentándose, además, una incidencia actual de enfermedad cardíaca congénita de 25 mil casos al año. Adicionalmente cada año, más de 650 mil personas mueren debido a un infarto al miocardio, en donde más de dos tercios de las muertes ocurren en los primeros minutos después de que comienza el infarto. Estos problemas son consecuencia de una combinación del tipo de vida actual, en donde impera una mala alimentación con un elevado contenido de sal y grasas, además de una condición física deficiente, ya que no se dedica el tiempo necesario a alguna sesión de ejercicios y, principalmente, a la vida acelerada y estresante.^{11, 30, 35}

2.1.1. Anatomía y Fisiología del Corazón Sano

El aparato circulatorio mantiene en constante movimiento al medio circulante (sangre), que esta en íntimo contacto con las células que forman los tejidos. Está integrado por el corazón y los vasos sanguíneos (arterias, venas, capilares, arteriolas, entre otras), siendo el corazón el órgano central del aparato circulatorio. Consiste de tejido muscular hueco, dividido en cuatro cavidades, dos aurículas y dos ventrículos, sus contracciones mantienen la sangre en movimiento. Anatómicamente, se encuentra alojado en el tórax, en un espacio que limitan los dos pulmones y que recibe el nombre de mediastino, por encima del diafragma, delante de la columna vertebral y por detrás del esternón. El corazón normal de un hombre joven pesa aproximadamente 270 g, mide 10 cm de alto, 10.5 cm de ancho y 6 cm de espesor, aproximadamente, aunque estas dimensiones pueden variar según el volumen anatómico, nivel energético, sexo, entre otras variables. Tiene la forma de un cono, cuya base se encuentra hacia arriba y a la derecha, y el vértice se encuentra hacia abajo a la izquierda y adelante. El impulso de éste contra la pared torácica se siente en el espacio intercostal entre la quinta y sexta costillas a unos 8 cm a la izquierda de la línea medioesternal. Lo mantienen en posición los grandes vasos que salen de él: las arterias aorta y pulmonar, las venas cava y pulmonar, así como también el saco fibroso que lo rodea llamado pericardio, que se adhiere al esternón y a la pleura que cubre a los pulmones. Está constituido por dos sistemas de propulsión separados:

- 1) el llamado corazón derecho, que impulsa sangre a los pulmones
- 2) el llamado corazón izquierdo, que impulsa sangre al resto del cuerpo.

Cada uno de estos sistemas de propulsión se encuentra dividido en dos cavidades separadas; denominadas aurícula y ventrículo. Las dos aurículas son bombas cargadoras que forzan a la sangre hacia los ventrículos antes de la contracción ventricular. A continuación los ventrículos se contraen con gran fuerza una fracción de segundo después, y expulsan la sangre hacia los pulmones y la circulación general. Debido a lo anterior, los ventrículos son llamados bombas propulsoras. El corazón tiene cuatro válvulas separadas que permiten el flujo de sangre en sentido distal, pero impiden el flujo retrógrado. Dos de éstas, las válvulas AV, funcionan como entrada hacia los ventrículos respectivos; las otras dos, llamadas válvulas semilunares, sirven como salida desde los ventrículos. Cuando se contrae el ventrículo, la presión ejercida de manera retrógrada sobre la válvula AV hace que sus hojuelas se desplacen hasta la posición cerrada, de

modo que la sangre contenida en el ventrículo no puede regresar a la aurícula; al mismo tiempo, la presión de la sangre sobre las paredes ventriculares fuerza a ésta hacia adelante contra las válvulas semilunares, abriéndolas para que fluya la sangre hacia la arteria pulmonar o la aorta. A continuación, cuando se relajan los ventrículos, la presión elevada de la sangre dentro de las grandes arterias la empuja contra las válvulas semilunares y las cierra, con lo que se evita que la sangre que ha salido de los ventrículos regrese hacia ellos. Al mismo tiempo, la sangre que vuelve hacia el corazón desde las venas generales abre las válvulas AV y llena de nuevo los ventrículos como preparación para el siguiente ciclo propulsor. Para mantener irrigado el corazón, éste tiene su propio sistema vascular, el coronario, las arterias coronarias mantienen al corazón vivo. Al expulsar la sangre a través de la arteria aorta al mismo tiempo entra sangre a las coronarias mediante unos orificios llamados *ostium*, los cuales se encuentran situados en la base de la arteria aorta.^{31, 35}

El músculo cardíaco también denominado miocardio, es muy semejante al músculo estriado, pero tiene dos características que lo hacen especialmente adaptado para la función propulsora del corazón. Primeramente, las fibras del miocardio están interconectadas entre sí, de modo que el potencial de acción que se origina en cualquier parte de la masa muscular viaja por todos los sitios y hace que toda la masa muscular se contraiga al unísono. Esto permite al músculo cardíaco de todas las paredes de cada cavidad del corazón contraerse al mismo tiempo y con ritmo y, por lo tanto, impulsa la sangre hacia su exterior. En segundo lugar, el potencial de acción del miocardio dura por lo menos tres décimas de segundo, lo que es un tiempo diez ó más veces mayor que el potencial de acción de la mayor parte de los músculos estriados. Por lo tanto, la duración de la contracción del músculo cardíaco también dura aproximadamente tres décimas de segundo, que es el tiempo que se requiere para que la sangre salga del corazón hacia las arterias. El corazón tiene un sistema especial de regulación del ritmo, que consiste en un nodo SA, localizado en la pared de la aurícula derecha cerca del punto de entrada de la vena cava superior; un nodo AV, localizado en el tabique auricular cerca del punto en que se unen ambas aurículas con los ventrículos; y un sistema de grandes fibras de músculo cardíaco de conducción rápida denominadas fibras de Purkinje, que conducen los impulsos cardíacos con rapidez desde el nodo AV hacia todas las partes de ambos ventrículos. En el corazón normal, el nodo SA regula la frecuencia del latido cardíaco, y

por tanto, se llama marcapaso del corazón. Cuando una persona se encuentra en reposo el nodo SA envía rítmicamente impulsos que producen 72 latidos por minuto aproximadamente, y el potencial de acción, llamado impulso cardíaco, generado en este nodo se extiende por todo el corazón, primero por las aurículas, a continuación por el nodo AV, luego por el sistema de Purkinje hacia los ventrículos, y por último por el propio músculo ventricular.^{31, 32}

El funcionamiento cardíaco depende de cuatro factores primordiales, denominados: precarga, poscarga, contractilidad y frecuencia cardíaca. Es muy importante el efecto de la precarga (presión auricular) en el desempeño cardiovascular, ya que es el momento en el cual la sangre venosa retorna al corazón, y depende de la presión de las venas la cantidad de sangre que ingresa a las aurículas. Si la precarga es elevada se puede producir congestión pulmonar. La poscarga es la resistencia contra la cual el corazón debe bombear la sangre. Está representada por la impedancia aórtica y la resistencia vascular sistémica. La resistencia vascular elevada reduce el gasto cardíaco al incrementar la resistencia a la expulsión. La contractilidad se refiere a la actividad de bombeo del corazón, con la cual se distribuye la sangre al cuerpo, si la contractilidad se ve disminuida, es posible que la cantidad de sangre bombeada sea insuficiente para las necesidades del organismo; con el uso de agentes inotrópicos positivos es posible corregir esta deficiencia. La frecuencia cardíaca es uno de los determinantes principales del gasto cardíaco, cuando existe una reducción en la actividad del corazón y del volumen sistólico, producidos por insuficiencia, un aumento de la frecuencia cardíaca es un mecanismo compensatorio para mantener el gasto cardíaco adecuado.^{31, 34}

El trabajo de bombeo del corazón está regulado por los sistemas simpático y parasimpático. Con ayuda de los principios activos que actúan sobre la función del sistema nervioso vegetativo puede influirse sobre la acción cardíaca. Así, por ejemplo los psicofármacos ansiolíticos del tipo benzodiazepina (diazepam), se utilizan en pacientes con infarto de miocardio con objeto de evitar la estimulación del simpático con un trabajo cardíaco aumentado, provocado por una situación de ansiedad. Bajo la influencia de los antisimpaticotónicos, que sirven para disminuir la hipertensión arterial, disminuye también el trabajo cardíaco. Los bloqueadores ganglionares se utilizaban antes en las crisis hipertensivas. Los parasimpaticolíticos o los β - bloqueadores evitan la transmisión de los

impulsos vegetativos a las células del músculo cardíaco, bloqueando los receptores correspondientes.^{26, 31, 34, 35}

2.1.2. Mecanismo de la Contracción Cardíaca

El miocardio está constituido por fibras musculares estriadas que contienen miofibrillas formadas por unidades contráctiles repetidas seriadamente, llamadas sarcómeros. Las miofibrillas están recubiertas por el sarcolema. Una sarcómera individual está limitada por dos bandas Z adyacentes y tiene una longitud de 1.6 a 2.2 μm . Está constituida por filamentos de actina y miosina, que se superponen regularmente, conectados por puentes cruzados. En relajación, estos puentes se mantienen unidos por la troponina C, que inhibe la contracción. Durante la contracción, la inactivación de la troponina C permite la alteración de los puentes, lo que hace posible que los filamentos de actina y miosina se deslicen entre sí, causando la contracción (ver figura 1).^{26, 31, 35}

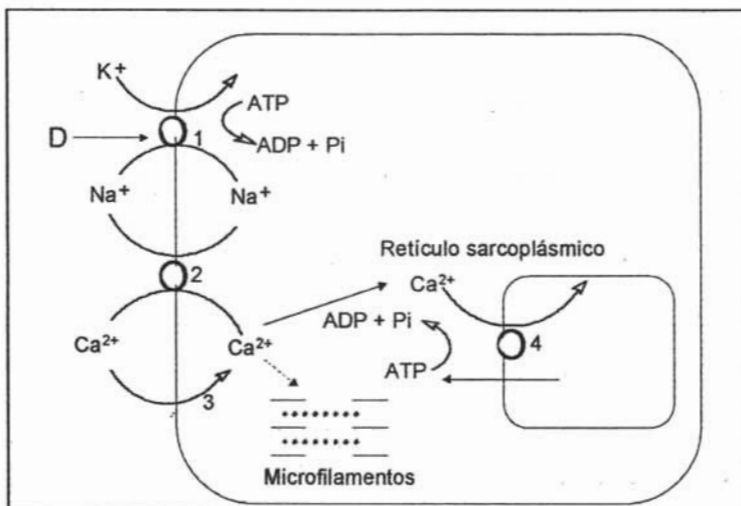


Figura 1. Esquema representativo del intercambio iónico necesario para la contracción. 1 Bomba de Na^+/K^+ . 2 Bomba de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, 3 Entrada de Ca^{2+} . 4 Fijación de Ca^{2+} a la membrana del retículo sarcoplásmico. D Sitio de acción de los digitálicos.

En reposo, el interior de las miofibrillas tiene una carga negativa con respecto al exterior, con un potencial de membrana de -80 a -100 mV, un contenido intracelular bajo de catión sodio (Na^+) y alto de catión potasio (K^+), mantenido mediante la bomba de sodio impulsada por ATP y una concentración baja de Ca^{2+} . Durante la activación, hay un flujo de Ca^{2+} al interior de la célula a través de conductos sarcolémicos, que causan una liberación rápida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. El Ca^{2+} se une a la troponina C, produciendo los cambios en los puentes cruzados de actinmiosina que producen la contracción. Después de la contracción estos efectos se revierten, con reacumulación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, se revierte la fijación de Ca^{2+} -troponina, y retornan los filamentos de actina y miosina y los puentes cruzados al estado de reposo. La energía para la mayor parte de estas reacciones deriva del ATP formado por oxidación de su sustrato. El corazón precisa concentraciones óptimas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} para funcionar con normalidad. En ausencia de Na^+ , el corazón no es excitable y no latirá debido a que el potencial de acción de las fibras miocárdicas depende de la concentración de Na^+ extracelular. Por otra parte, el potencial de membrana en reposo depende del gradiente de éste ion a través de la membrana. En condiciones normales, la concentración de K^+ extracelular es de unos 4 nmoles. Un aumento del K^+ extracelular, si es lo suficientemente grande, produce despolarización, pérdida de la excitabilidad de las células miocárdicas y una parada cardiaca en la diástole. El Ca^{2+} es también fundamental para la contracción, una disminución de Ca^{2+} del líquido extracelular reduce la fuerza de contracción y finalmente provoca una parada en diástole. Por el contrario, un aumento en la concentración de Ca^{2+} extracelular mejora la fuerza contráctil, pero concentraciones muy elevadas inducen parada cardiaca en sístole. El nivel de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular es el responsable fundamental de la situación contráctil del miocardio. Al principio, la onda de excitación se expande con rapidez a lo largo del sarcolema miocárdico, de célula a célula, a través de uniones intercomunicadoras, y la despolarización gradual se extiende hacia el interior de la célula a través de los túbulos T. Durante la meseta del potencial de acción, la permeabilidad del sarcolema al Ca^{2+} aumenta y fluye debido a su gradiente electroquímico entrando en la célula a través de los canales de Ca^{2+} presentes en el sarcolema. La fuente principal de Ca^{2+} es el líquido intersticial en concentraciones de 2 mM. La cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula desde el espacio extracelular no es suficiente para inducir la contracción de las miofibrillas, pero sirve como descarga (desencadenante) para liberar Ca^{2+} de los almacenes intracelulares,

como el retículo sarcoplásmico. La concentración de Ca^{2+} libre citosólico aumenta desde niveles de reposo de 1 a 10 mM durante la excitación, y el Ca^{2+} se une a la troponina C. El complejo troponina- Ca^{2+} interacciona con la tropomiosina para desbloquear los puntos activos entre los filamentos de actina y miosina. La acción de desbloqueo permite el ciclo de los puentes cruzados y la contracción de las miofibrillas (sístole). Al final de la sístole, la entrada de Ca^{2+} cesa y el retículo sarcoplásmico ya no es estimulado para liberar Ca^{2+} . La fosforilación de la troponina I inhibe la unión con el Ca^{2+} , lo que permite que la tropomiosina bloquee de nuevo los puntos de interacción entre los filamentos de actina y miosina y se produce la relajación (diástole). El Ca^{2+} que entra en la célula para iniciar la contracción debe salir durante la diástole. El Ca^{2+} sale fundamentalmente por un intercambio electroneutro de tres iones Na^+ por uno de Ca^{2+} . El Ca^{2+} también sale de la célula mediante una bomba dependiente de ATP.^{10, 11, 25, 32}

2.1.3. Insuficiencia Cardíaca Congestiva

Es una patología en la cual el gasto cardíaco es inadecuado para proporcionar el oxígeno y los nutrientes que el organismo necesita, es muy grave con un promedio de mortalidad de aproximadamente 50% en cinco años. Es de origen multifactorial afectando el ventrículo izquierdo, el derecho, o ambos. El gasto cardíaco disminuido por afectación ventricular puede ser sistólico, cuando no se tiene fuerza suficiente para expulsar la sangre; o diastólico, cuando se da una relajación inadecuada para el llenado normal. La disfunción sistólica con gasto cardíaco disminuido y con fracción de expulsión reducida, es característica de insuficiencia aguda, especialmente si es resultado de infarto al miocardio. Generalmente se trata con fármacos inotrópicos positivos y responde al tratamiento, al menos en su etapa inicial. La disfunción diastólica ocurre cuando existe hipertrofia y sobreesfuerzo del miocardio y, aunque el gasto cardíaco es reducido, la fracción expulsada puede ser normal, por lo que no responde adecuadamente frente a inotrópicos positivos.^{11, 25, 30, 32}

2.1.3.1. Signos y Síntomas

De todos los tipos de insuficiencia cardiaca congestiva, los principales signos y síntomas son taquicardia, disminución en la tolerancia al ejercicio, acortamiento de la respiración, edema pulmonar y periférico, y cardiomegalia. La disminución en la tolerancia al ejercicio, con rápida fatiga muscular, es la consecuencia directa del gasto cardiaco disminuido; las otras manifestaciones resultan de los intentos del organismo para compensar el defecto cardiaco intrínseco.^{25, 30, 32}

2.1.3.2. Tratamientos

Desde hace mucho tiempo, hace aproximadamente 3000 años, los egipcios ya conocían plantas que contenían glicósidos cardíacos, las cuales fueron empleadas adecuadamente, después de algunos años, gracias al inglés William Withering, quien describió el uso y toxicidad de un extracto de la digital. Entre las fuentes de estos fármacos se incluyen la digital blanca (*Digitalis lanata*) y la púrpura (*Digitalis purpurea*), la escila marina del Mediterráneo (*Urginea maritima*), estrofantó (*Strophantus gratus*), y muchas otras plantas de las zonas climáticas templadas y tropicales. Algunos sapos tienen glándulas cutáneas capaces de elaborar bufadienólidos, que difieren de los cardenólidos sólo en que tienen una lactona de seis miembros, y no de cinco en la posición 17 del núcleo esteroidal. Todos los glicósidos cardíacos, o cardenólidos, como la digoxina (ver figura 2), combinan un

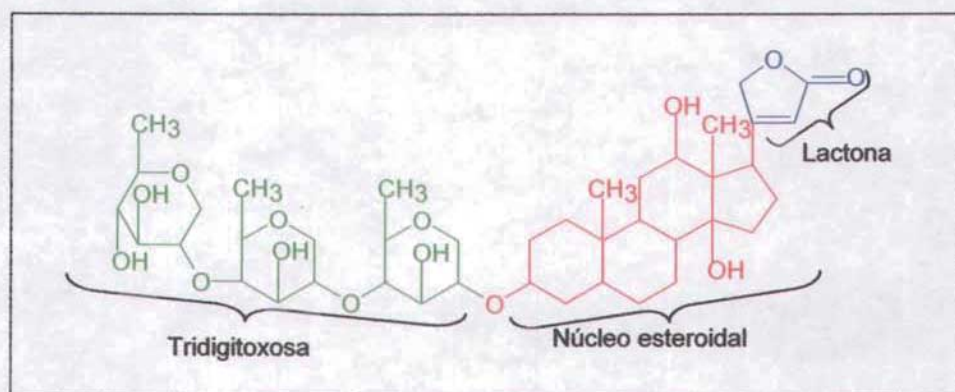


Figura 2. Estructura molecular de la digoxina

núcleo esteroideal con un anillo lactónico de cinco miembros insaturado en el carbono 17 y una serie de azúcares unidos al carbono 3 del núcleo. Debido a que carecen de un grupo fácilmente ionizable, la solubilidad es pH-independiente. Estudios sobre la relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR) indican que el anillo lactona y el núcleo esteroide son esenciales para la actividad, así como el ion hidroxilo (^-OH) en posición 14, sin olvidar la conformación de los sustituyentes y la fusión de los anillos. Los otros constituyentes, las moléculas de azúcar en posición 3, influyen en las variables farmacocinéticas, como lo son la absorción, vida media y metabolismo.^{11, 17, 30, 32}

Los digitálicos tienen múltiples efectos vasculares directos e indirectos, con consecuencias tanto terapéuticas como tóxicas (aritmógenas). Además, tienen efectos indeseables sobre el SNC y el intestino. Los síntomas de intoxicación se presentan al exceder mínimamente la dosis terapéutica e incluyen:

- 1) arritmia cardíaca (en ocasiones con peligro de muerte, por ejemplo, bradicardia sinusual)
- 2) bloqueo AV
- 3) extrasístole ventricular
- 4) fibrilación ventricular
- 5) alteraciones del SNC
- 6) cansancio
- 7) confusión
- 8) alucinaciones
- 9) mareos
- 10) vómitos
- 11) diarreas
- 12) pérdida de sales y agua.

Una vez que se reconoce una intoxicación digitálica, el tratamiento emprendido involucra la administración de K^+ , disminuyendo así la unión de los glicósidos cardíacos; sin embargo, puede alterar también la transmisión AV. Otros tratamientos incluyen la administración de un antiarrítmico, como fenitoína o lidocaína, la administración oral de colestiramina con objeto de secuestrar e inhibir la absorción de la digitoxina que se encuentra en el intestino (circulación enterohepática), entre otras medidas terapéuticas.^{15,}

30, 32, 38

2.2. Plantas Medicinales

El hombre ha utilizado las plantas para curarse y simultáneamente han tenido un significado místico y religioso, ya que no sólo son empleadas para curar ingiriéndolas, sino también como un ahuyentador de "malos espíritus" (los cuales, según creencias populares, son los causantes de las enfermedades) en muchas culturas antiguas e inclusive en la actualidad. Todas las culturas primitivas han adquirido información sobre las propiedades medicinales de un gran número de plantas propias de su medio ambiente. Estos conocimientos, generalmente han sido acumulados por determinados individuos, como lo son sacerdotes, hechiceros, curanderos, entre otros, quienes los transmiten, de generación en generación, ya sea a sus aprendices o a sus descendientes. En otras ocasiones, historiadores y viajeros han dejado importantes descripciones de tales plantas medicinales, así como su utilidad. Desde hace varios siglos se tiene conocimiento de las propiedades curativas de algunas plantas, así como también registros de que los sumerios desde el año 2500 a.C. conocían y cultivaban unas 250 plantas. Existen papiros egipcios de 1600 a.C. donde se encuentran asentados los nombres y usos de numerosas plantas, como el olivo, el azafrán, el hinojo, etc., que utilizaban los médicos de entonces. Los griegos como Pitágoras (582 a.C.) conocía la mostaza y la escila, Hipócrates (466 a.C.) conocía, entre otras, el ajenojo, la canela, la cicuta, la genciana, la acacia, etc., Teofrasto (372 a.C.) escribió diez libros *Sobre la historia de las plantas* y ocho *Sobre las causas de las plantas*, conocía el cornezuelo, la pimienta, el opio, etc., Pedanio Dioscórides (77 a.C.) fue el primer autor que escribe extensamente sobre las plantas medicinales en su obra *De Materia Medica*, en la cual se describen con gran detalle todas las sustancias y plantas medicinales conocidas, así como también sus propiedades. En América, los conocimientos sobre plantas medicinales, fueron transmitidos por los nativos a los misioneros y viajeros españoles, como Gonzalo Fernández en 1535, José Acosta en 1590, el Rey Felipe II entre 1570 y 1577, quien recorre México y publica su *Historia Plantarum Novae Hispaniae*, Fray Bernardino de Sahagún a finales del siglo XVI escribe respecto a las plantas empleadas por los aztecas y zapotecas, sin olvidar el famoso *Códice Badiano*, que se trata de un tratado de plantas medicinales escrito en 1552 por el indio xochimilca Martín de la Cruz. En 1889 se creó en México un Instituto Médico Nacional el cual realizó investigaciones sobre las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente por los indígenas. En 1959 Maximino Martínez publica su libro *Plantas Medicinales de México*,

donde se encuentran más de 900 plantas con su descripción botánica, usos y propiedades químicas. Muchos autores a través de los siglos se encargaron de difundir los conocimientos sobre las plantas medicinales conocidas según cada época y lugar, tales como Galeno en 131-200 d.C., Avicena (837 d.C.), Carl von Linné (*Linneo* 1737 d.C.), entre otros.^{14, 22, 40}

2.2.1. Usos Tradicionales

Generalmente el uso de las plantas medicinales se ha dado de manera empírica mediante los conocimientos transmitidos de generación en generación (frecuentemente de modo oral). En México se conocen el nombre y usos de diversas plantas, que se utilizan para curar dolencias y enfermedades populares. Por ejemplo la manzanilla (*Matricaria recutita*) para el dolor de estómago, las hojas de naranjo (*Citrus aurantium*) y la tila (*Tilia mexicana*) para los nervios, los pelos de elote (*Zea mays*) para los riñones, árnica (*Heterotheca inuloides*) para los dolores musculares, entre muchas más.^{7, 24, 40}

2.2.2. Modos de Empleo

Popularmente, se han utilizado las plantas medicinales de un modo sencillo y práctico, frecuentemente se utiliza un té cuando son preparados de uso interno y emplastos cuando son preparados de uso externo. El té es el preparado en el cual se coloca la planta (la parte indicada, ya sea raíz, tallo, hojas, fruto, etc.) en agua hirviendo por cinco minutos, se toma caliente, tibio, o bien, se puede tomar frío como agua de tiempo (agua fresca). Los emplastos son preparados en los que la planta es macerada sola o con grasa vegetal o animal, y se coloca sobre la lesión, también se puede colocar una gasa o tela empapada con infusión de la planta. Actualmente, se utilizan cápsulas que contienen la planta, o partes de la planta, seca y pulverizada, ungüentos, pastas o cremas, jarabes, elixires, etc.^{7, 24, 40}

2.2.3. Métodos de Extracción de Principios Activos Presentes en Fuentes Vegetales

Las plantas contienen una enorme cantidad de componentes, los cuales pueden ser benéficos o tóxicos, por lo cual es muy importante aislar los componentes activos que se encargan de proporcionar el efecto terapéutico deseado. Existen diversos métodos de extracción de tales activos, y elegir el adecuado depende del tipo de planta, la parte de la planta que se utiliza, así como de la naturaleza química de los activos, ya que si es un activo termolábil, es necesario protegerlo y evitar el uso de extracciones a temperaturas elevadas.^{7, 25, 34, 40}

Para poder obtener un principio activo en particular, se requiere de una combinación de procesos que implican varios pasos muy importantes previos a la extracción como lo son la recolección, el secado, la selección, y la preservación. La recolección es un paso decisivo, ya que se debe tener en cuenta la etapa de maduración adecuada, se debe de considerar el momento propicio para la recolección, ya que es posible que se modifique la cantidad de activo así como su calidad. Es necesario tener cuidado de no maltratar ninguna parte de la planta, ya sea las hojas, el tallo, la corteza, la raíz, las flores, la semilla, los frutos, la penca o el polen. La colecta puede hacerse de modo manual o mecánico, según los cuidados que sean necesarios. El secado es el proceso en el cual se elimina la mayor cantidad de agua de la planta a fin de que se conserve en buen estado por más tiempo, libre de microorganismos y plagas que la destruyen, inactivando también la hidrólisis enzimática. El secado implica también un desactivamiento por calor de enzimas degradadoras. Es por eso que se debe realizar cuidadosamente ya sea al aire, al sol, a la sombra o en estufa, según las propiedades de los principios activos que se deseen obtener. En el proceso de selección se eliminan impurezas, materias extrañas, partes en mal estado, arena o tierra y otras partes de la misma planta. La preservación se lleva cabo para permitir que la planta y los activos se encuentren en buen estado durante más tiempo. Es posible empacar la planta y protegerla contra la luz, humedad, calor, roedores, insectos y hongos, para lo cual se utilizan empaques herméticos y lugares cerrados, frescos y oscuros.^{12, 22, 27}

Es posible llevar a cabo la extracción de los activos mediante varios procesos, de los cuales debe seleccionarse el adecuado según la naturaleza del material vegetal y del principio activo que se desee obtener. Los procesos extractivos pueden ser de dos tipos:

- 1) continuos (como la extracción con Soxhlet y arrastre con vapor)
- 2) discontinuos (como la percolación y maceración)

Los métodos de extracción continua sólido-líquido, con disolventes orgánicos a temperatura de ebullición, se utiliza para materiales vegetales gruesos o difíciles, tales como corteza, raíces y semillas, algunos de ellos, como la turbodestilación, consiste en remojar la planta en agua y hacer circular vapor por la mezcla, el vapor extrae el activo deseado. La extracción por arrastre de vapor es un método muy común mediante vapor de agua a presión que circula a través del ingrediente vegetal. Los métodos de extracción discontinuos como la extracción con disolventes en frío es recomendable para principios activos delicados, en la cual se usa un disolvente orgánico, como el hexano, con objeto de saturar el ingrediente vegetal y obtener los compuestos deseados. Un inconveniente de este proceso es el hecho de que quedan restos del disolvente que es irritante y tóxico. Uno de los métodos discontinuos más modernos es la extracción con fluidos supercríticos, como el CO_2 y NH_3 , que son utilizados para materiales muy delicados, siendo un método con grandes ventajas principalmente la obtención sencilla del extracto crudo sin residuos del disolvente.^{13, 22}

La obtención de los extractos crudos se hace mediante la evaporación del disolvente empleado, una extracción con otro disolvente volátil como alcohol, o simplemente por una decantación. La purificación de los extractos para obtener el activo puede ser un proceso lento y laborioso, ya que es común que se extraigan mezclas complejas las cuales requieren de muchos cuidados.^{6, 22}

2.3. Yoyote (*Thevetia sp*)

2.3.1. Descripción Botánica

El yoyote (*Thevetia sp*), es un arbusto conocido también como yucucaca, narciso amarillo, calaveritas y akitz.

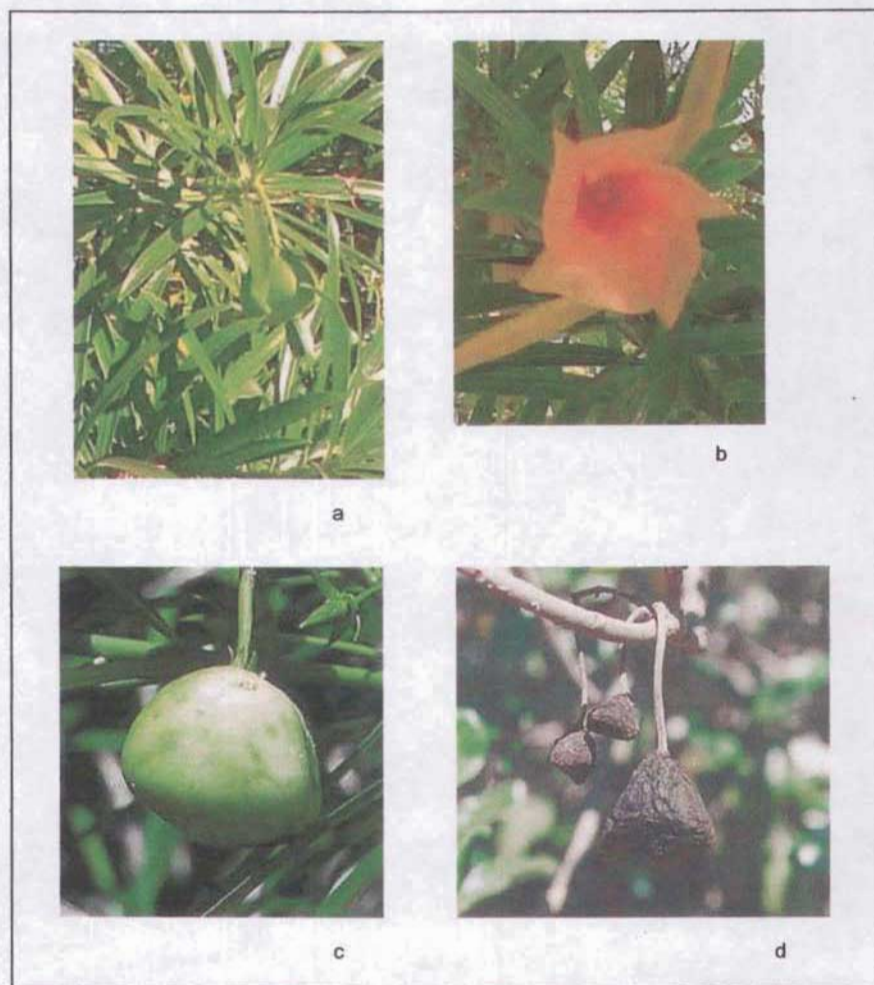


Figura 3. Yoyote (*Thevetia thevetioides*). a. Planta. b. Flor. c y d. Semilla.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: *Plantae*
Phylum: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Asteridae*
Orden: *Gentianales*
Familia: *Apocynaceae*
Género: *Thevetia*
Especie: *thevetioides*
peruviana
neriifolia
ovata

El nombre científico *Thevetia* proviene de André Thévet (1502-1590), un misionero francés, el cual colectó esta planta en Sudamérica. La *Thevetia* es un arbusto de 2 a 3 m, con nerviación secundaria pinada y densa, las hojas son de 4 a 8 cm por 0.5 a 0.8 cm, posee flores con corola extendida y con lóbulos recubiertos de color amarillo. El fruto es una drupa subglobosa, del tamaño de una ciruela, de color verde, tiene un hueso muy duro, amarillento y triangular, en cuyo interior hay de 1 a 2 semillas con cotiledones oleosos (ver figura 3). En México florece de julio a diciembre y se encuentra distribuida en los estados de: México, Morelos, San Luis Potosí, Veracruz y Yucatán. Originaria de América tropical, la *Thevetia* ha sido introducida y aclimatada en la mayor parte de las regiones tropicales de Asia y Africa. Se utiliza con fines autodestructivos, pues se ha observado que 1 ó 2 semillas provocan una sintomatología cardíaca de intensidad variable que puede llevar a la muerte. Es evidente que la sintomatología corresponde a la de la intoxicación digitálica: vómito, diarrea, dolores intestinales, bradicardia, hipercalemia, alteraciones del ritmo y bloqueo AV. Las intoxicaciones masivas evolucionan rápidamente hacia la muerte.^{6, 7, 14, 27}

2.3.2. Composición Química

Las semillas contienen un 40% de aceite no secante, caseína vegetal, un glicósido llamado tevetina (el cual se encuentra en un 0.84% aproximadamente, basándose en el peso seco de la semilla), α -amirina, aucubina, β -amirina, β -sitosterol, betulina, cardenólidos, kaempferol, ácido linoléico, lupeol, nerifolina, ácido oléico, ácido palmítico, peruvósidos, quercetina, ácido ursólico, entre otras sustancias en vías de identificación. La toxicidad de las semillas se debe a heterósidos cardiotónicos que son las tevetinas. La tevetina es una mezcla de dos cardenólidos, las tevetinas A y B (ver figura 4)¹². Los dos heterósidos tienen una cadena triosídica compuesta de dos moléculas de glucosa (la gentobiosa) y de una molécula de tevetosa (6-desoxi-O-metil-L-glucosa). Difieren por la estructura de su genina, a nivel del sustituyente en posición 10, pues la tevetina A posee un grupo aldehído, mientras que la tevetina B presenta un grupo metilo.^{2, 5, 6, 15, 20, 21, 36}

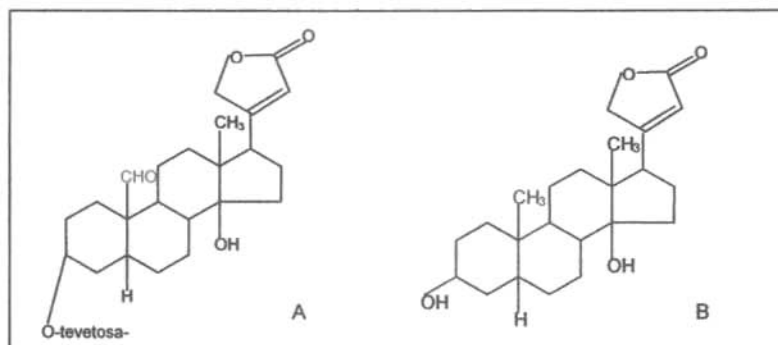


Fig. 4. Estructura de Tevetina A y B. Donde destaca la diferencia entre el grupo aldehído (tevetina A) y grupo metilo (tevetina B)

Las hojas también presentan una elevada toxicidad, debido a su contenido de numerosos heterósidos, glicósidos de la digitoxigenina, cannogenina, tevetinas A y B, uzarigenina, nerifolina, *C-nor-D*-homocardenólidos como la tevetiogenina (*C-nor-D*-homocannogenina) y derivados, entre otros.^{3, 4, 8}

2.3.3. Usos en la Medicina Tradicional

Antiguamente, se usaba el jugo lechoso de la planta para curar la sordera, úlceras y sarna; las hojas se empleaban para calmar los dolores de los dientes y muelas, para disolver los tumores, curar las hemorroides y como cicatrizante. Se ha visto que contiene un poderoso veneno, el cual paraliza los músculos vitales, como el sistema muscular de la respiración y el corazón, entre otros músculos estriados, que se utiliza para cazar, o bien, con fines de autodestrucción.^{6, 24, 36}

2.3.4. Toxicidad

Los glicósidos aumentan la fuerza contráctil elevando el contenido de Ca^{2+} intracelular, inhiben a la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , lo que da como resultado la inhibición de la bomba de sodio y el aumento de la concentración intracelular de Na^+ ; por tanto, la cantidad de Na^+ bombeada fuera de los miocitos es menor, lo que provoca un descenso del gradiente de Na^+ a través de la membrana celular, de forma que ingresa menos Na^+ a la célula, y, por lo tanto, la cantidad de Ca^{2+} que puede salir por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es menor. Para que el músculo cardíaco se relaje, el Ca^{2+} debe salir del citosol mediante una bomba dependiente de ATP, pero debido a la acción de los glicósidos y al elevado contenido de Na^+ , la bomba no es eficiente, en consecuencia se acumula más Ca^{2+} en la célula provocando latidos irregulares (arritmias) y la muerte (ver figura 1).^{30, 32, 38}

2.3.5. Proceso de Extracción

La extracción es un procedimiento vital en el estudio de productos naturales ya que de ella depende el éxito o el fracaso en el aislamiento e identificación de sustancias activas. Así, se lleva a cabo una maceración, en condiciones poco drásticas, esto es, a temperatura ambiente, la cual consiste en tener el material vegetal finamente picado y previamente secado a no más de 60 ± 5 °C; se coloca en un matraz Erlenmeyer y se adiciona un volumen adecuado del disolvente elegido que cubra en su totalidad el material vegetal (de acuerdo a su polaridad y a la solubilidad de la sustancia a extraer), se deja reposar

durante una semana y se procede a filtrar el material vegetal y a evaporar el disolvente para obtener el extracto crudo.^{13, 22, 27}

2.4. Métodos de Evaluación de Fármacos con Actividad Cardiovascular

La evaluación farmacológica de los componentes activos de una planta, consiste en conocer cuál es el efecto que produce en el organismo, puede tratarse de un efecto curativo o medicinal, o bien, de un efecto tóxico. Para esto se realizan una serie de estudios, ya sea en tejidos, órganos aislados, cultivos celulares, o bien, en el organismo íntegro, con objeto de determinar la DE_{50} , DT_{50} y DL_{50} .^{13, 30, 35}

2.4.1. Generalidades

Sydney Ringer, en una serie de experimentos fisiológicos clásicos realizados en la década de 1880,³¹ demostró que las contracciones del corazón aislado de rana dependen de un medio salino que contiene un adecuado balance de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ . Desde aquella época ha sido universalmente reconocido que los tejidos y órganos aislados pueden vivir durante el tiempo en que están rodeadas por soluciones que contienen varios iones diferentes en proporciones adecuadas.^{28, 30, 35}

Está demostrado que un corazón aislado, es decir, separado de sus nervios vegetativos, puede latir durante varias horas cuando se le administra una solución nutritiva (compuesta, básicamente, por electrolitos, dextrosa y ajustada al valor de pH fisiológico) a través del muñón de la arteria aorta y las arterias coronarias (preparación según Langendorff, 1895). En una preparación de este tipo influyen, sobre la fuerza de contracción y la frecuencia cardiaca, los fármacos que poseen una acción directa sobre las células cardiacas. Sobre los receptores de las sustancias transmisoras de los nervios vegetativos actúan los parasimpaticomiméticos y los simpaticomiméticos. Igualmente en el retículo sarcoplásmico se encuentran los sitios de acción de los glicósidos cardiacos (Na^+/K^+ -ATPasas), los antagonistas del calcio (canales de Ca^{2+}) y los agentes con efecto

anestésico local y bloqueadores del canal de Na^+ . En los espacios intracelulares se encuentra el sitio de acción de los inhibidores de la fosfodiesterasa.^{26, 33, 35}

2.4.2. Métodos *In Vivo*

Los métodos *in vivo* se refieren a los experimentos que se realizan utilizando al cuerpo del animal intacto, en el cual, de diferentes maneras, se realizan las evaluaciones necesarias según el órgano o tejido en estudio.^{30, 35}

2.4.2.1. Corazón en Rana

Para poder realizar un estudio en corazón de rana leopardo, se necesita una rana de tamaño mediano, la cual, primeramente es descerebrada y desmedulada. Se inserta un estilete a través del orificio que se encuentra en la parte posterior de la cabeza. Una vez que se tiene al animal listo, se sujeta a una tabla de disección. Se realiza un corte cuidadoso debajo del esternón, cortando tejidos y hueso con mucho cuidado, de tal modo que pueda abrirse una ventana para dejar visible al corazón. Se retira cuidadosamente el tejido circundante al corazón hasta que quede claramente visible, se sujeta firmemente un hilo al vértice inferior del corazón, el cual se encuentra conectado por el otro extremo a un equipo que registra los latidos. Una vez cumplidas las condiciones anteriores se puede iniciar el experimento.^{28, 30, 35}

2.4.2.2. Corazón en Tortuga

Para realizar este experimento, se recomienda el uso de una tortuga con un caparazón de una longitud de 15 a 20 cm. Se puede emplear un anestésico o bien, descerebrar al animal. Existen dos métodos de poner al descubierto al corazón: uno de ellos por extirpación del plastrón (concha ventral completa), y el otro consiste en abrir una ventana en el plastrón sobre el corazón. La extirpación del plastrón puede causar una hemorragia importante, pero proporciona un cuadro claro de los órganos viscerales y de las relaciones

del corazón con las estructuras vecinas. Se produce menos hemorragia si se abre una ventana en el caparazón ventral para descubrir al corazón, y es posible observar más claramente la actividad del seno venoso y las grandes venas. La anestesia se lleva a cabo con uretano al 10 %, utilizando 10 mL por cada 500 g de peso corporal, por vía ip en la pata posterior. La anestesia se mantiene aproximadamente 60 minutos. Para descerebrar al animal, se toma el cuello firmemente, justo debajo de la cabeza; después, se perfora el cráneo, mediante un calador fuerte y puntiagudo y se destruye el cerebro. Se tapa la perforación con un poco de algodón para evitar una hemorragia, la tortuga moverá sus apéndices un cierto tiempo después de la operación, para evitarlo si se desea se puede destruir también la médula espinal. La extirpación del plastrón se realiza con ayuda de una sierra para hueso, cortando la unión entre el caparazón y el plastrón, o cortando con unas tenazas para hueso. Si no se desea extirpar el plastrón entonces sólo puede cortarse una ventana cuadrada mediante el uso de una sierra, o una perforadora preferentemente de 40 ó 50 mm, lo que generará una abertura de 4 ó 5 cm. Una vez que se tiene descubierto el tórax retirar cuidadosamente el tejido anterior al corazón, así como el pericardio, y ya se encuentra listo para trabajar, para realizar los registros de contracción se ata una seda quirúrgica en la punta inferior del corazón, misma que se encontrará sujeta a un dispositivo de registro.^{28, 30, 35}

2.4.3. Métodos *In Vitro*

Los métodos *in vitro* se refieren a los experimentos que se realizan en partes del animal que han sido separadas de éste, ya sea órganos, tejidos, fluidos, células, etc. Así, es posible evaluar una determinada sustancia de modo independiente, lo que es en ocasiones más sencillo de manejar y de controlar; pero que tiene como desventaja el desconocer los mecanismos que se generan en un organismo intacto.^{9, 30, 35}

2.4.3.1. Corazón en Rana

Se utilizan ranas leopardo (*Rana pipiens*). Se monta el equipo de perfusión, el cual consta de una botella que contiene solución Ringer³¹, una cánula para el corazón y un registrador.

Conviene no unir la cánula al sistema, para manipularla más fácilmente. Se realiza la desmedulación y descerebración (o anestesia) de la rana, se coloca el animal en una tabla de disección, con las tijeras se realiza una incisión central en el vientre a través de la piel y de la pared corporal; se extiende la incisión hacia la región anterior a través del anillo pectoral cortando en las proximidades del hueso y del cartílago, para evitar dañar los vasos sanguíneos que se encuentran debajo. Después, se desprende el tejido mediante un instrumento sin punta y se separa para dejar al descubierto el corazón. Se abre el pericardio e identifican las partes del corazón, se pasa un hilo por debajo de los grandes vasos anteriores que salen del lado izquierdo, se prepara la cánula colocando una gota de solución salina en su punta, se llena la cánula con solución salina. Con unas tijeras finas se corta en forma de V (el vértice debe estar orientado hacia adelante) aproximadamente a mitad de camino entre el tronco arterial que se encuentra en posición inmediatamente anterior al corazón y el que se encuentra en posición inmediatamente posterior al hilo. Se inserta y ata la cánula. Se separa el corazón, con la cánula atada, de los tejidos circundantes; se llena la cánula con solución salina, evitando las burbujas de aire, y se une la cánula al conjunto de perfusión; se perfunde lentamente con solución de Ringer a temperatura ambiente. Se oxigena el Ringer antes de su uso. El corazón está listo para trabajar.^{28, 30}

2.4.3.2. Corazón Aislado y Perfundido Según Langendorff

El método de perfusión en corazón aislado (1895-1897) según Langendorff³³ se emplea para diversas especies de mamíferos pequeños como perro, gato, rata, conejo, ratón y cobayo, es éste último uno de los más utilizados por su facilidad de manejo y excelentes resultados. Es posible utilizarlo en todos los animales de sangre caliente con un sistema vascular coronario. En seres humanos se mantiene vivo al corazón durante una cirugía utilizando este principio. Se trata de un método que permite la investigación de la actividad mecánica de un corazón de mamífero completamente aislado. El principio se basa en forzar la sangre, o a cualquier otro fluido oxigenado que permita la actividad cardíaca, mediante la inserción de una cánula a través de la aorta ascendente. Siendo esta una perfusión retrógrada, lo que significa un flujo inverso al natural, la cual cierra las válvulas aórticas, como sucede durante la diástole, por lo que el perfusado es capaz de irrigar las

arterias coronarias, a través de los ostium derecho e izquierdo. Después de que el líquido de perfusión pasa a través del sistema vascular coronario el flujo sale del seno coronario y se abre el atrio derecho, para comenzar un ciclo propulsor por el corazón. Antes de iniciar el protocolo experimental se debe conocer la anatomía del corazón. Una vez abierto el tórax el corazón se observa con el ventrículo derecho hacia el frente (ver figura 5), la línea de separación entre los ventrículos está claramente marcada por la arteria coronaria anterior descendente izquierda. Los dos vasos prominentes que se observan impulsan la sangre de los ventrículos hacia el cuerpo (arteria aorta) o los pulmones (arteria pulmonar), respectivamente. El ostium de la arteria coronaria derecha, entrada de sangre, aparentemente se localiza en la válvula aórtica. En la preparación de Langendorff los orificios de las dos arterias coronarias no se deben obstruir al insertar la cánula aórtica.^{9, 23.}

26

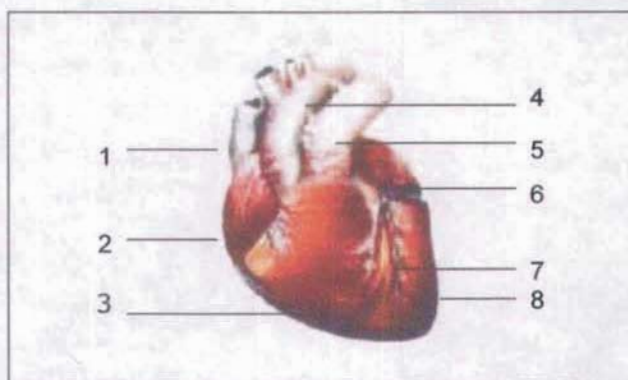


Figura 5. Vista frontal del corazón. 1. Vena cava. 2. Aurícula derecha. 3. Ventrículo derecho. 4. Arteria aorta. 5. Arteria pulmonar. 6. Aurícula izquierda. 7. Arteria coronaria. 8. Ventrículo izquierdo.

Antes de llevar a cabo el experimento se preparan los animales eliminando los sólidos de la dieta 24 horas antes, con agua *ad libitum*. Para prevenir una trombosis en las arterias coronarias, cinco minutos antes del experimento los animales se deben preinyectar con 500 UI de heparina por cada 100 g de peso corporal, ya sea por vía iv o ip, con el fin de inhibir el proceso de coagulación. En los animales heparinizados, cualquier indicio de sangre en las coronarias es lavado por el perfusado. La cirugía puede llevarse a cabo utilizando anestesia general y ventilación artificial. Se pueden utilizar barbitúricos, los

cuales proporcionan un buen efecto anestésico y sus efectos adversos son bien conocidos: Tiopental® o Nembutal® (pentobarbital sódico) inyectado o en perfusión a concentración constante durante el experimento, ejerce una acción inotrópica negativa y afecta las arterias coronarias, pero estos efectos desaparecen por completo después de diez minutos de haber suspendido la administración. Pueden emplearse también anestésicos volátiles inhalados tales como éter etílico, halotano, metoxiflurano, los cuales se administran mediante un vaporizador calibrado. Estos anestésicos tienen como desventaja que en un corto periodo de tiempo a altas concentraciones, especialmente de hidrocarburos halogenados, producen una insuficiencia cardiaca irreversible. Durante la anestesia la entrega de oxígeno se interrumpe, después de 10 a 30 segundos se genera anoxia e isquemia respectivamente, seguida de grandes cambios en los contenidos del tejido de ATP y creatinina fosfato, teniendo como consecuencia una disminución en los mecanismos cardiacos. Es por esto que se recomienda el uso de un respirador artificial de presión positiva durante el transcurso de la cirugía, es necesario ajustar el volumen tidal (mL de aire/kg de peso corporal) respecto a la especie animal de prueba, con el fin de evitar un daño a corazón por falta o exceso de ventilación. Una vez que se restablece la actividad mecánica del corazón, siguiendo la perfusión, después de 30 a 45 min se observan alteraciones irreversibles en el metabolismo del miocardio como deficiencia de ATP. Si a 37 °C la isquemia permanece por 3 a 5 min, la fuerza contráctil y la capacidad de estrés están reducidos notablemente, además de la deficiencia de ATP. Para un cobayo de entre 250 y 350 g de peso puede utilizarse una cánula de 3 mm de diámetro externo, la cual puede ser de plástico, vidrio o metal (como plata o acero inoxidable).^{9,23}

El procedimiento experimental consiste primeramente en anestesiarse al animal. Una vez en anestesia quirúrgica, se fija a una tabla de disección, se disecciona la traquea y se inserta una cánula conectada a un respirador, se realiza un corte longitudinal en la mitad del abdomen a la altura del esternón, teniendo cuidado con las arterias torácicas, se abre el abdomen hacia arriba del diafragma, se corta el diafragma para una abertura total del tórax, se observan los pulmones ventilados y el corazón latiendo. Se retira cuidadosamente el pericardio liberando al corazón y los grandes vasos. Se refiere la aorta ascendente mediante el empleo de una seda quirúrgica y unas pinzas curvas delgadas, teniendo cuidado de no dañar la arteria pulmonar que se encuentra a un lado. Referida la aorta se realiza una lazada sin cerrar o apretar. El corazón sujeto a la seda es elevado

ligeramente, con unas tijeras se cortan los grandes vasos y los pulmones, sin dañar al corazón. Para evitar daños en la función mecánica del corazón y tejidos, se coloca el corazón en una solución nutritiva (Krebs-Henseleit, Tyrode, Locke, Ringer modificada, entre otras.³³) a una temperatura de 0-2 °C, de esta forma el corazón se mantiene sin problemas durante 5 minutos. Durante este tiempo, se introduce la cánula en la aorta y se sujeta firmemente con ayuda de la seda, cerrando con ello el circuito que perfunde una solución a 10 mL/min, 37 °C, con un pH de 7.4 y oxigenada con carbógeno al 5 % permitiendo al corazón una recuperación de su actividad mecánica normal. Se deja en periodo de adaptación a flujo de 25 mL/min durante cinco minutos y a flujo de 10 mL/min durante 25 minutos. Se estimula eléctricamente a nivel de aurícula derecha a una frecuencia de 1 hz. Se conecta a un equipo registrador y es posible iniciar el experimento (ver figura 6).^{16, 23}

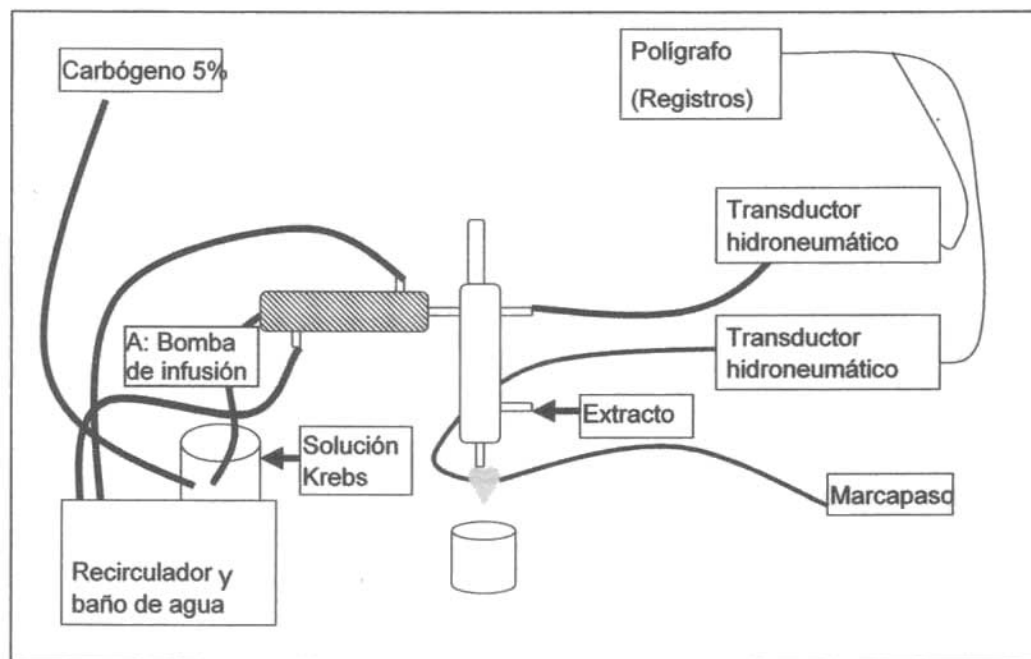


Figura 6. Esquema del método Langendorff

2.5. Técnicas Analíticas

Las técnicas analíticas empleadas permiten la evaluación química de los extractos, analizando e identificando con ello la posible estructura de alguno o varios componentes, por lo que debe realizarse cuidadosa y meticulosamente hasta obtener los resultados suficientes que permitan sugerir la naturaleza de los componentes químicos presentes.^{29,}

39

2.5.1. Cromatografía en Capa Fina (ccf)

Es una técnica de separación e identificación de sustancias químicas por medio de un disolvente que se desplaza sobre una superficie (capa) delgada de un adsorbente idóneo, el cual se deposita sobre una placa de vidrio que actúa como soporte inerte de la capa. Para preparar la capa se hace una suspensión o pasta de materias finamente divididas, como lo es la sílica, con un líquido apropiado, como puede ser agua. Se coloca sobre la lámina de vidrio, extendiéndola como una cubierta fina y lisa, y se deja secar. Ya preparada la placa se aplica la muestra, ya sea por punto o por línea y se deja evaporar el disolvente que contiene, se coloca la lámina en posición vertical, o muy próxima a ella, en una cámara perfectamente cerrada, previamente saturada con un disolvente, o mezcla de disolventes elegidos, de modo que este ascienda por capilaridad durante un tiempo preciso, después de lo cual la lámina es retirada de la cámara y secada a temperatura ambiente.^{29, 37, 39}

2.5.2. Identificación Cualitativa

Una vez desarrollada la placa cromatográfica, es posible observar las sustancias separadas por medios tales como luz UV de longitudes de onda corta y onda larga (245 y 365 nm, respectivamente), vapores de yodo y reveladores específicos, entre otros. La naturaleza química de las sustancias o moléculas, es un factor imprescindible para la identificación de las mismas, debido a que se basa primordialmente en reacciones químicas, tales como reacciones de oxidación-reducción, complejométricas, por formación de

puentes de hidrógeno, entre otras. Así, los glicósidos cardiacos se pueden identificar mediante una reacción colorida con ácido tricloroacético, obteniéndose una coloración amarilla que fluoresce en la luz UV de onda larga. Mediante comparación con un estándar de referencia y el cálculo del (R_f) es posible también identificar una sustancia.^{1, 18, 19}

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dentro del contexto de las enfermedades cardiovasculares, la insuficiencia cardíaca congestiva y la fibrilación auricular crónica son los padecimientos cardíacos que, con una mortalidad del 50 %, cobran el mayor número de vidas al año en nuestro país y en todo el mundo, el tratamiento farmacológico de elección implica la administración de digitálicos, siendo actualmente el esquema terapéutico más empleado y el que mejor calidad de vida ofrece al paciente, considerando que la diversidad de sustancias empleadas en la práctica clínica está restringida sólo a dos o tres variantes digitálicas, sin poder superar su estrecho margen de seguridad y algunos efectos adversos.

Por ello, es muy importante proporcionar a la terapéutica cardiovascular nuevas posibilidades de compuestos del tipo digitálicos obtenidos a partir de fuentes naturales, los cuales podrían presentar un efecto terapéutico de igual o mayor magnitud que los existentes, así como un mejor índice de seguridad, con lo que se favorecería la sobrevida de los pacientes aquejados por estas enfermedades cardíacas.

IV. OBJETIVOS

General:

Evaluar el efecto farmacológico, en el modelo de corazón aislado y perfundido de cobayo según Langendorff, de la tevetina y variantes tevetósidas de los extractos de yoyote (*Thevetia sp*) sobre el músculo cardíaco.

Particulares:

Obtener los extractos del yoyote mediante maceración

Determinar el mejor método de extracción para la tevetina y los tevetosidos

Determinar el efecto de cada extracto sobre la presión de perfusión y la fuerza de contracción del corazón

Evaluar el contenido de activo en cada extracto

Identificar, mediante reactividad química selectiva y funcional, la naturaleza química de los extractos y fracciones evaluadas farmacológicamente

V. HIPÓTESIS

Los extractos del yoyote (*Thevetia sp*) contienen glicósidos cardiacos, entre ellos tevetina, la cual es capaz de modificar la fuerza de contracción y la presión; por ello si se utiliza el sistema de extracción adecuado, será posible aislar estos principios activos, bajo un estudio cromatográfico selectivo, por lo que estas fracciones aumentarán la contracción ventricular al administrarse directamente al corazón en un modelo de corazón aislado de cobayo, observando un incremento en la presión coronaria lo que sería indicativo de un genuino efecto digitálico.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Población de Estudio

Especie animal: Cobayo

Características: Macho

Peso corporal: 400-500 g

6.2. Criterios

6.2.1. De Inclusión

Que sea cobayo

Sexo macho

Con un peso corporal entre 400 g y 500 g

Sano

Que no haya sido utilizado previamente

6.2.2. De Exclusión

Que sea hembra

Que esté fuera del peso establecido

Que haya sido tratado previamente

Que esté enfermo

6.2.3. De Eliminación

Que el corazón presente zonas de infarto

Que el corazón muestre signos electrofisiológicos de arritmia

6.3. Variables de Estudio

Contenido de activo en el extracto

Presión de perfusión

Contracción intraventricular izquierda

Concentración letal media (CL₅₀)

6.4. Material y Equipo

6.4.1. Material de Vidrio

Botella de doble fondo (Dewar)

Matraz balón 24/40 (50 y 100 mL, Pyrex)

Matraz Erlenmeyer (100 y 250 mL, Pyrex)

Microjeringa (100 µL, Hamilton)

Micropipeta (500 µL, Finnpiquette)

Pipeta graduada (1, 5 y 10 mL, Pyrex)

Portaobjetos (Corning)

Refrigerante recto 24/40 (Pyrex)

Termómetro -20 a 120 ° C (Brenan)

Tubos capilares sin heparina (Corning)

Tubos de ensayo (13 x 100 mm, Kimax)

Vaso de precipitados (10, 25, 100, 150, 250 y 1000 mL, Pyrex)

6.4.2. Reactivos

Acetato de etilo (Grado RA, J.T. Baker)

Acetona (Grado RA, J.T. Baker)

Acetonitrilo (Grado RA, J.T. Baker)

Agua desionizada (Grado RA, Stallion)

Benceno (Grado RA, J.T. Baker)
Bicarbonato de sodio (Grado RA, J.T. Baker)
n-Butanol (Grado RA, J.T. Baker)
Cloruro de calcio dihidratado (Grado RA, J.T. Baker)
Cloruro de potasio (Grado RA, J.T. Baker)
Cloruro de sodio (Grado RA, USB)
Dextrosa (Grado RA, J.T. Baker)
Diclorometano (Grado RA, J.T. Baker)
Dimetilsulfóxido (Grado RA, J.T. Baker)
Éter (Grado RA, J.T. Baker)
Éter de petróleo (Grado RA, J.T. Baker)
Etilendiaminotetracetato de sodio (Grado RA, J.T. Baker)
Etanol (Grado RA, J.T. Baker)
Fosfato de sodio monobásico (Grado RA, Productos Químicos Monterrey)
Hexano (Grado RA, J.T. Baker)
n-heptano (Grado RA, J.T. Baker)
isooctano (Grado RA, J.T. Baker)
Metanol (Grado RA, J.T. Baker)
n-Pentano (Grado RA, J.T. Baker)
1-Propanol (Grado RA, J.T. Baker)
2-Propanol (Grado RA, J.T. Baker)
Sílica Gel para capa fina (60 GF₂₅₄, Merk)
Sílica Gel para columna (60, Merk)
Sulfato de magnesio heptahidratado (Grado RA, J.T. Baker)
Tricloroetano (Grado RA, J.T. Baker)
Xileno (Grado RA, J.T. Baker)

6.4.3. Equipo

Balanza analítica (Precisa)
Baño y recirculador de agua (Presicion Scientific)
Bomba de infusión (Sigmamotor)
Bomba de vacío (Fisher Scientific)
Equipo para destilación (Pyrex)
Equipo para filtración de membrana (Millipore)
Equipo para órganos aislados Langendorff
Marcapasos (S88 Grass Instruments)
Parrilla de agitación y calentamiento (Corning)
Polígrafo (RPS7C8 Grass Instruments)
Respirador (UGO Basile)

6.4.4. Recursos Varios

Cromatofolios (Al de sílica gel 60 F₂₅₄ para ccf, espesor de capa 0.2 mm, Merck)
Heparina (5000 UI/mL, Pisa)
Pentobarbital sódico (0.063 g/mL, Salud y Bienestar Animal)
Filtros de membrana de ésteres mixtos de celulosa (0.45 µm, Millipore)
Estuche de disección

6.5. Método

6.5.1. Extracción

- a. Lavar perfectamente con agua y jabón neutro 1 kg de semillas.
- b. Separar la corteza de las semillas, abriendo cuidadosamente con una navaja.
- c. Cortar finamente las semillas.
- d. Sumergir las semillas en 500 mL de hexano durante una hora a temperatura ambiente.
- e. Separar en dos partes las semillas picadas.

- f. Secar una parte a la sombra a temperatura ambiente durante 24 horas.
- g. Secar la otra parte en estufa a 50 ± 5 °C durante dos horas.
- h. Colocar 10 g de semilla secada a temperatura ambiente en cada uno de tres matraces Erlenmeyer.
- i. Adicionar al primer matraz 250 mL de metanol, al segundo matraz 250 mL de acetato de etilo y al tercer matraz 250 mL de una mezcla de etanol/agua (8:2).
- j. Dejar reposar a temperatura ambiente y a la sombra durante una semana.
- k. Repetir el proceso desde h, utilizando ahora la semilla secada en estufa.
- l. Filtrar las semillas y coleccionar por separado los seis disolventes de extracción.
- m. Evaporar el disolvente mediante una destilación a presión reducida.
- n. Se obtienen así seis extractos crudos.

6.5.2. Identificación

- a. Evaluar los extractos mediante un estudio en ccf.
- b. Determinar experimentalmente el mejor sistema de elución para el extracto comparándolo con un estándar de tevetina.
- c. Determinar, en el sistema de elución afín a la polaridad de los activos, los R_f tanto del extracto como del estándar, empleando como sistemas de revelado luz UV y vapores de yodo.
- d. Realizar una prueba de identificación cualitativa para glicósidos cardiacos con ácido tricloroacético.
 - 1. Preparar una solución de ácido tricloroacético al 25 % en cloroformo, ésta es la disolución A.
 - 2. Preparar una solución de ácido tricloroacético al 1 % en cloroformo, ésta es la disolución B.
 - 3. Disolver 3.3 g de ácido tricloroacético en 10 mL de cloroformo y agregar dos gotas de peróxido de hidrógeno al 30 %. Ésta es la disolución C.
 - 4. Preparar una placa cromatográfica evaluando el extracto, el estándar de tevetina y un blanco de disolvente, y eluir con el sistema de elución.
 - 5. Aspersar uniformemente la placa seca con la disolución A.
 - 6. Aspersar uniformemente la placa seca con la disolución B.

7. Aspersar uniformemente la placa seca con la disolución C.
 8. Calentar la placa en parrilla a 120 °C por 5 a 10 minutos.
 9. Observar a la luz natural y a luz UV de onda corta y larga.
- e. Determinar la miscibilidad o solubilidad de los extractos en agua, etanol/agua (1:1) y etanol.

6.5.3. Evaluación Farmacológica

6.5.3.1. Preparación de las disoluciones

- a. Preparar la disolución stock de Krebs, disolviendo 0.2 g de EDTA en 1000 mL de agua desionizada. Agregar los siguientes reactivos: 3.31 g de fosfato monobásico de sodio, 4.7 g de cloruro de calcio dihidratado, 5.92 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 8.95 g de cloruro de potasio y 137.68 g de cloruro de sodio. Agregar la siguiente sustancia cuando se ha solubilizado por completo la primera.
- b. Aforar la solución a 2000 mL con agua.
- c. Refrigerar hasta el momento de su uso.
- d. Preparar la solución de trabajo disolviendo en 1000 mL de agua 4.08 g de bicarbonato de sodio y 2 g de dextrosa.
- e. Adicionar 200 mL de solución stock.
- f. Aforar la solución a 2000 mL con agua.
- g. Filtrar la solución a través de un filtro de membrana de 0.45 μm .
- h. Tomar 40 mL de esta solución y refrigerar.

6.5.3.2. Preparación del equipo

- a. Montar el equipo para perfusión de órganos aislados según Langendorff.
- b. Ajustar la temperatura del baño de agua a 37 ± 1 °C.
- c. Colocar la solución de trabajo en la botella Dewar y purgar el sistema de perfusión cuidando que no queden burbujas.
- d. Mantener la solución oxigenada con una mezcla de O_2/CO_2 (95:5, carbógeno al 5 %).

6.5.3.3. Procedimiento quirúrgico

- a. Preparar un cobayo para cirugía, inyectar heparina (1 mL/kg de peso).
- b. Pasados cinco minutos anestesiarse con pentobarbital (1 mL/kg de peso).
- c. Realizar una disección de la tráquea insertando un respirador artificial.
- d. Abrir el tórax cuidadosamente, hasta dejar el corazón al descubierto.
- e. Retirar el pericardio.
- f. Referir la aorta con una seda quirúrgica.
- g. Jalar ligeramente el corazón con el lazo y cortar hasta extraerlo completamente del animal.
- h. Colocar el corazón inmediatamente en la solución Krebs fría (0-2 °C).
- i. Canular la aorta ascendente conectada al equipo asegurándola con ayuda de la seda quirúrgica.
- j. Dejar en periodo de adaptación durante 5 minutos a un flujo de 25 mL/min y 25 minutos a un flujo de 10 mL/min.
- k. Introducir en el ventrículo izquierdo un balón de látex conectado a un transductor de presión hidroneumática.
- l. Colocar los electrodos del marcapasos en la aurícula derecha.
- m. Estimular el corazón hasta lograr una contracción rítmica.
- n. Registrar un valor basal tanto de presión de perfusión como de fuerza de contracción.
- o. Administrar la muestra a evaluar.
- p. Realizar curvas concentración-respuesta gradual con cada extracto.
- q. Realizar el experimento utilizando como control negativo el vehículo.
- r. Realizar el experimento empleando como control positivo un estándar de tevetina.

VII. RESULTADOS

Las muestras de yoyote fueron obtenidas en el mercado "Sonora" de la Cd. de México, las semillas presentan forma triangular, un color café claro, de 1.5 g de peso aproximadamente, cada una. Conteniendo en su interior 1 ó 2 cotiledones de color rosa pálido y con olor característico.

Las semillas fueron caracterizadas como *Thevetia thevetioides* Schumm por el M en C, Juan Carlos Torres Narvaez, del Depto. de Farmacología del INCICH.

Se realizaron las extracciones buscando la que proporcione mejor rendimiento de producto. Se obtuvieron seis extractos crudos, tres secados a la sombra a temperatura ambiente y tres secados en estufa. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de los extractos obtenidos en los diferentes sistemas de extracción.

Extracto	Clave	Sistema de Extracción	Tipo de Secado	Cantidad de Extracto (g)	Propiedades	Rendimiento (%)
1	M1	Metanol	Ambiente	0.71935	Líquido color miel muy viscoso y pegajoso	7.1935
2	A1	Acetato de etilo	Ambiente	1.14117	Líquido amarillo claro aceitoso	11.4117
3	E1	Etanol/agua (80:20)	Ambiente	0.96796	Líquido café oscuro no traslúcido, no aceitoso	9.6796
4	M2	Metanol	Estufa (50±5°C)	0.79770	Líquido color amarillo claro viscoso	7.9770
5	A2	Acetato de etilo	Estufa (50±5°C)	1.37812	Líquido amarillo claro aceitoso	13.8712
6	E2	Etanol/agua (80:20)	Estufa (50±5°C)	0.75068	Líquido color café claro no aceitoso	7.5068

Se realizó una primera evaluación cromatográfica en capa fina, utilizando como sistema de elución etanol/acetato de etilo (1:1), utilizando un estándar de tevetina, se realizaron dos placas y se determinaron los r_f 's del estándar y de los extractos (ver figura 7, donde se representa de manera esquemática la visualización de las manchas observadas mediante la ccf). Los resultados se muestran en la tabla 2.

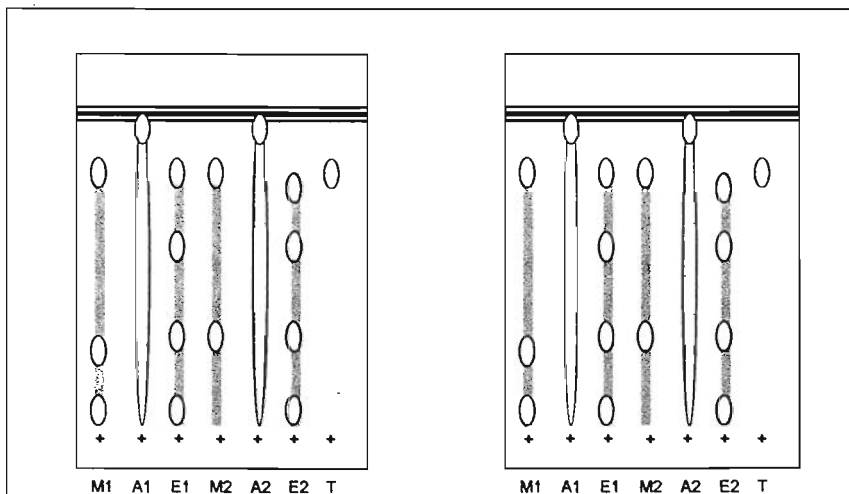


Figura 7. Placas cromatográficas que muestran la elución de los extractos de yoyote y el estándar de tevetina, en un sistema de elución etanol/agua(1:1).

En estas placas primarias es posible identificar los extractos que contienen presumiblemente tevetina, sin embargo el sistema de elución no es el adecuado debido a que la tevetina no se observa con claridad y las manchas observadas de los extractos no están bien definidas ni separadas.

Tabla 2. Resultados del estudio cromatográfico realizado a los extractos en el sistema etanol/acetato de etilo (1:1 v/v), donde se muestra resaltado el Rf similar al del estándar de tevetina. Estos resultados se muestran en la figura 7.

Extracto	Placa 1	Placa 2	Observaciones
M1	0.0615 0.2923 0.7076	0.7460	
A1	-	-	Se observa una sola mancha barrida en toda la placa
E1	0.6923 0.5692 0.3384 0.0769	0.0634 0.2857 0.6984	
M2	0.7076 0.3230	0.5555	
A2	-	-	Se observa una sola mancha barrida en toda la placa
E2	0.6796 0.6000 0.3384 0.0769	0.7777 0.6984 0.5873 0.2857 0.0634	
Tevetina	0.6769	0.6984	

Se marcan con negritas los r_f's que son similares al del estándar de tevetina, los cuales se presentan en los extractos etanólicos y metanólicos.

Se realizó la prueba de reactividad química selectiva, la cual permite la identificación cualitativa de glicósidos cardiacos utilizando ácido tricloroacético, obteniendo los siguientes resultados que se muestran en la tabla 3 (ver figura 8).

Tabla 3. Resultados de la prueba para glicósidos cianogénicos con ácido tricloroacético, se muestra la representación de la placa en la figura 8.

Extracto	Resultado	Coloración observada	Observaciones
M1	+	Azul	Amarillo brillante en UV de onda larga
A1	-	Negra	
E1	+	Azul	Amarillo brillante en UV de onda larga
M2	+	Azul	Amarillo brillante en UV de onda larga
A2	-	Negra	
E2	+	Azul	Amarillo brillante en UV de onda larga
Tevetina	+		Amarillo brillante en UV de onda larga

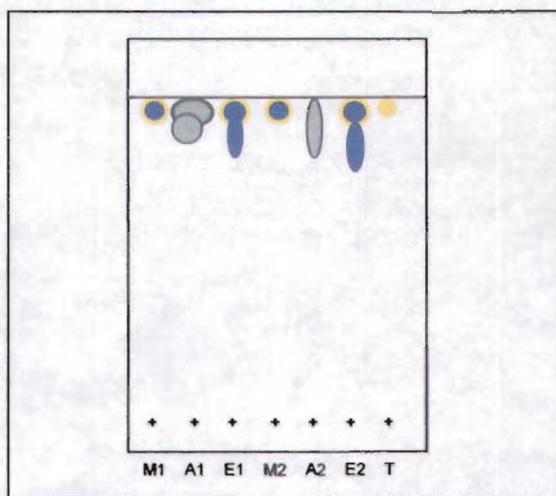


Figura 8. Placa cromatográfica que muestra la elución de los extractos de yoyote y el estándar de tevetina, en un sistema de elución etanol/agua(1:2), al ser revelados con ácido tricloroacético.

Es posible determinar que los extractos etanólicos y metanólicos contienen tevetina y que los extractos de acetato de etilo no, por otra parte no se observan las manchas muy definidas y se van con el disolvente hasta el frente de elución.

Por lo anterior se realizan pruebas para encontrar el mejor sistema de elución que permita visualizar el estándar de tevetina y los componentes de los extractos en manchas definidas y separadas, para ello se realizó un estudio cromatográfico utilizando diferentes sistemas de elución, los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Estudio cromatográfico de los extractos.

Sistema de Elución	Disolvente (s)	Observaciones
1	<i>n</i> -heptano	No eluye
2	Hexano	No eluye
3	Iso-octano	No eluye
4	<i>n</i> -pentano	No eluye
5	Tricloroetano	No eluye
6	Diclorometano	No eluye
7	Éter de petróleo	No eluye
8	Tolueno	No eluye
9	Benceno	No eluye
10	Cloroformo	No eluye
11	Éter	No eluye
12	Acetato de etilo	No eluye
13	Acetona	Se barren las muestras
14	Metanol	Las muestras eluyen hasta el frente del disolvente
15	Agua	Las muestras eluyen hasta el frente del disolvente
16	1-propanol	Se observan manchas no definidas
17	2-propanol	Se observan manchas no definidas
18	Etanol	Se barre la muestra
19	1-butanol	Se observan manchas no separadas
20	Acetonitrilo	No eluye
21	Xileno	No eluye
22	Dimetilsulfóxido	No eluye

Una vez observada la respuesta se eligió el siguiente sistema:

Metanol / 2-propanol / butanol (2:2:1)

Se observó que las muestras no estaban completamente separadas por lo que finalmente y en base a los resultados del estudio cromatográfico, se evaluaron dos sistemas:

- 1) Metanol / 2-propanol / butanol / hexano (1.5:2:1:0.5)
- 2) Metanol / 2-propanol / butanol / benceno (1.5:2:1:0.5)

Observándose una mejor separación con el sistema 1, ya que es posible observar separada la tevetina (ver figura 9).

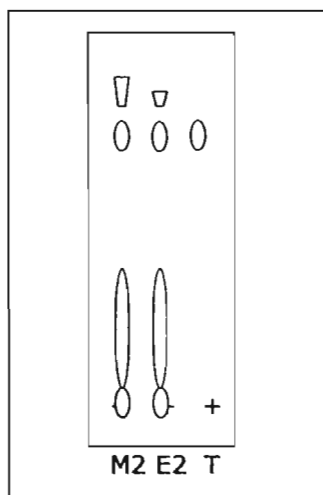


Figura 9. Placa cromatográfica de los extractos de yoyote M1, M2 y tevetina en el sistema de elución 1, revelado con luz UV.

Se evaluó la miscibilidad de los extractos en agua, etanol y una mezcla de etanol/agua (1:1 v/v, a temperatura ambiente), los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de la evaluación de miscibilidad de los extractos.

Extracto	Agua	Etanol	Etanol/agua (1:1 v/v)
M1	-	-	-
A1	*	*	*
E1	+	+	+
M2	+	+	+
A2	*	*	*
E2	+	+	+

- no es miscible, * forma emulsión, + si es miscible

Se realizó la evaluación farmacológica de los extractos de manera preliminar, en bolos únicos para determinar si presentan o no el efecto esperado, los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Evaluación farmacológica preliminar de los extractos mediante el método Langendorff.

Extracto	Observaciones
M1	No se puede determinar el efecto por su elevada viscosidad e inmiscibilidad
A1	No presenta efecto inotrópico
E1	Si presenta efecto inotrópico positivo
M2	Si presenta efecto inotrópico positivo
A2	No presenta efecto inotrópico
E2	Si presenta efecto inotrópico positivo

Se realizó la evaluación farmacológica de los extractos los cuales provocan un aumento en la fuerza de contracción (ver figura 10). Se observa primero, en el recuadro A, un registro basal en condiciones normales, sin la administración de ninguna sustancia, por lo que éste registro se considera el valor cero. En el recuadro B, se observa que al administrar el extracto de *Thevetia* existe un aumento en la fuerza de contracción del ventrículo izquierdo. Este efecto se sostiene por unos 5 minutos, como se observa en el recuadro C. Si se administra una cantidad ligeramente mayor de extracto es posible observar el inicio de una intoxicación, mostrándose alternancias en los registros, como se puede ver en el recuadro D. Si el corazón continua recibiendo dosis del extracto, presentará un severo cuadro de intoxicación irreversible, como se observa en el recuadro E, donde los latidos son irregulares, evidenciándose la arritmia. Finalmente se presenta la muerte, como se observa en el recuadro F.

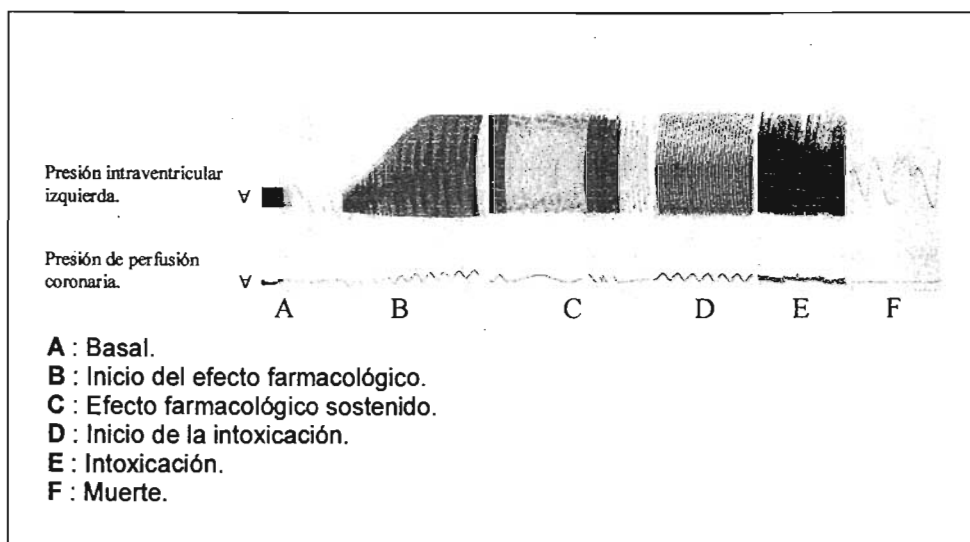


Figura 10. Efecto de los extractos de *Thevetia thevetioides* sobre el músculo cardíaco.

Tabla 7. Efecto de los extractos de *Thevetia thevetoides* sobre presión Intraventricular Izquierda.

Presión Intraventricular Izquierda (mmHg)								
Dosis (μ L)	Control	ES Control	STD Tevetina	ES STD Tevetina	Extracto 1	ES Extracto 1	Extracto 2	ES Extracto 2
0	25.0	0	25.0	0	25.0	0	25.0	0
10	27.0	2.6832	33.8	3.1389	69.2	6.3599	57.8	6.3749
20	26.2	2.3323	34.2	4.0792	82.2	8.7777	83.4	9.1738
30	26.2	2.3323	37.8	6.1514	85.8	6.7908	85.8	8.5930
40	23.8	1.7435	43.8	6.2481	86.8	6.8326	88.2	8.5229
50	23.4	2.0396	42.2	6.6211	86.8	5.9445	69.0	10.5071
60	24.2	2.3323	47.4	5.8787	87.0	6.1101	69.0	12.2637
70	24.2	2.3323	49.8	5.8855	87.2	5.2887	65.4	7.5471
80	23.8	2.1540	53.2	6.5145	87.4	5.8514	65.8	10.0717
90	21.8	2.6532	51.8	5.9194	89.0	4.3817	68.8	9.8305
100	22.2	3.0724	56.8	8.4474	89.0	5.1284	63.4	9.3466

ES: Error estándar.

STD: Estándar.

1: Metanólico.

2: Etanólico.

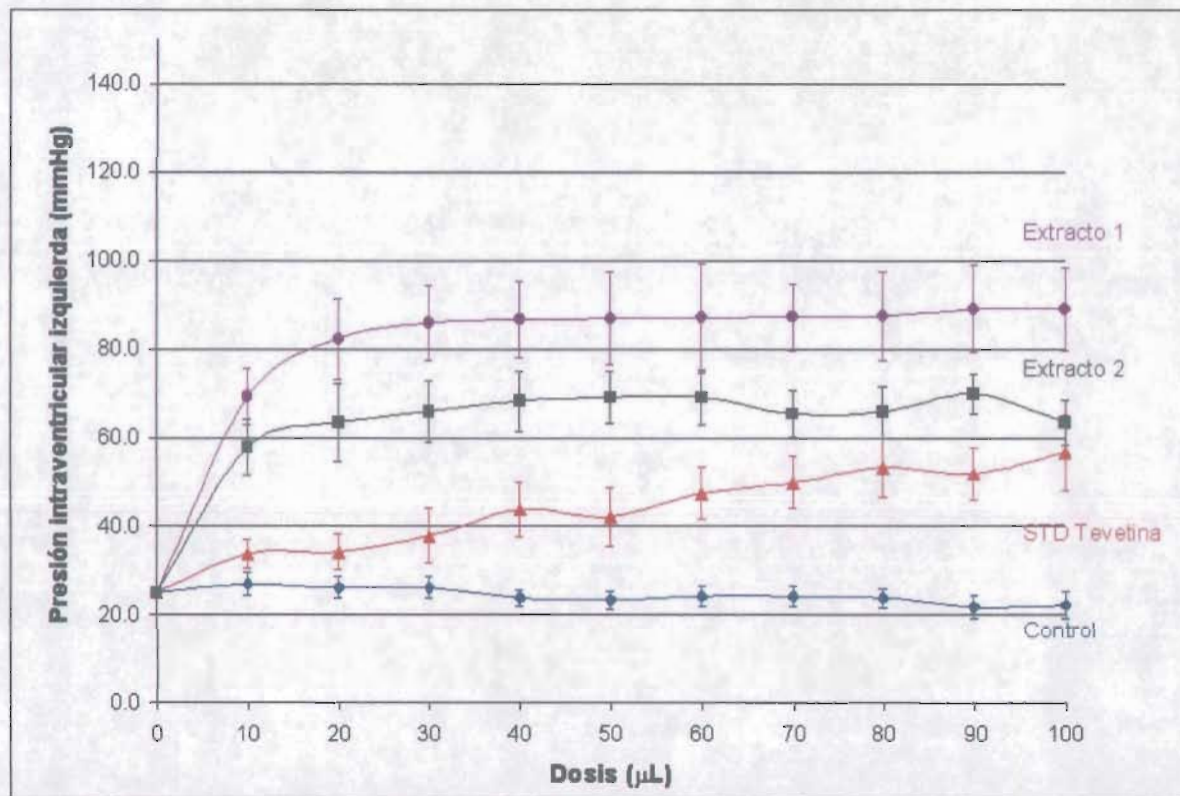


Figura 11. Efecto de los extractos de semilla de yoyote sobre la presión intraventricular Izquierda

En la figura 11 es posible observar como los extractos aumentan la fuerza de contracción, representada como presión intraventricular izquierda (PII).

Se realizó un experimento control (línea de color azul) en el cual no se observa aumento de PII, aunque si un ligero descenso, esto es debido a que el control se administró a temperatura ambiente.

De igual manera se evaluó un estándar de tevetina, en la línea color rojo, se observa que hay un aumento en la PII que es directamente proporcional a la dosis administrada, cosa que no sucede con los extractos.

Se observa que los extractos generan un aumento en la PII mayor que el observado con el estándar, pero su comportamiento es diferente, ya que éstos presentan una relación dosis independiente, esto es conforme se aumenta la dosis no se observa un aumento en la PII. Se presenta un aumento de la fuerza de contracción inmediato, el cual se mantiene aún cuando se administran dosis mas altas, esto sucede con ambos extractos (líneas color morado y verde).

Es notable que el extracto 1 (metanólico) aumenta la PII incluso más que el extracto 2 (etanólico), esto sugiere que la extracción con metanol permite obtener diferentes sustancias, o las mismas pero en mayor cantidad.

Es importante mencionar que el efecto observado es gracias a una mezcla compleja de sustancias que contienen los extractos, incluyendo tevetina. Es debido a esta combinación de componentes que se presenta un efecto diferente al del estándar, el cual se trata de una sustancia pura.

Tabla 8. Efecto de los extractos de *Thevetia thevetioides* sobre la resistencia vascular coronaria.

Dosis (μ L)	Resistencia Vascular Coronaria (mmHg)							
	Control	ES Control	STD Tevetina	ES STD Tevetina	Extracto 1	ES Extracto 1	Extracto 2	ES Extracto 2
0	50.0	0	50.0	0	50.0	0	50.0	0
10	49.6	0.4000	55.8	1.7888	55.3	6.8647	58.5	2.3184
20	50.0	0	60.5	1.1510	55.3	2.8939	58.5	2.0310
30	49.6	0.4000	61.5	1.8506	58.1	2.4494	58.8	1.6770
40	48.1	2.1470	63.0	0.9746	60.4	3.2977	60.5	2.2912
50	49.5	1.8371	64.0	0.8944	56.8	2.1794	59.5	2.1505
60	50.0	1.5811	63.3	1.7175	57.6	5.0373	61.8	2.6100
70	52.0	2.1505	65.8	1.7888	58.6	1.4577	61.5	1.8708
80	53.0	2.8939	65.5	2.2803	63.5	0.7805	61.8	3.8065
90	53.9	3.2128	66.0	2.2748	60.0	0.5590	63.0	3.2977
100	52.7	3.6110	68.4	2.4855	61.7	0.4842	62.5	3.8729

ES: Error estándar.

STD: Estándar.

1: Metanólico.

2: Etanólico.

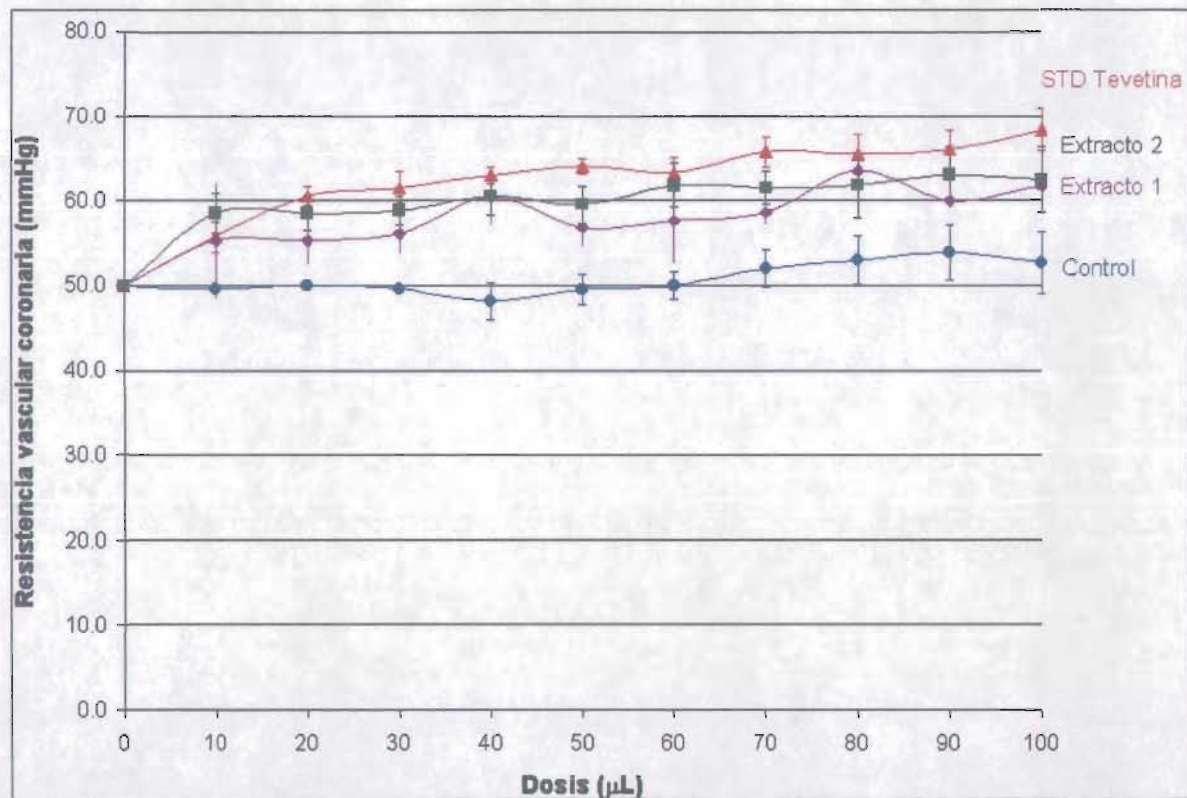


Figura 12. Efecto de los extractos de semilla de yoyote sobre la resistencia vascular coronaria

En la figura 12 se observa el efecto de los extractos de yoyote sobre la resistencia vascular coronaria (RVC).

Se observa como el estándar de tevetina aumenta ligeramente la RVC, lo cual es característico de esta sustancia que tiene propiedades vasoconstrictoras.

En caso contrario los extractos disminuyen ligeramente la RVC, por lo cual se presume que entre sus componentes existe una sustancia con propiedades vasodilatadoras, o bien que el conjunto de sustancias que contienen los extractos favorece la disminución de la RVC. Los dos extractos, etanólico y metanólico se comportan de manera similar.

Los extractos de acetato de etilo no presentaron efecto cardiotónico.

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

Se obtuvieron seis extractos crudos, los cuales dan un rendimiento promedio del 9.1416 %, en base al peso de la semilla seca, aproximadamente 2 mL por extracto. Mediante una maceración.

El sistema de extracción más adecuado es el metanólico, secado en estufa, ya que se obtiene un extracto de características apropiadas para su análisis cromatográfico y farmacológico, con un buen rendimiento (7.9770 %), el disolvente empleado se evapora fácilmente y las propiedades farmacológicas presentadas son las esperadas (efecto inotrópico positivo).

No se descarta, sin embargo, el uso de extracción etanólica, la cual genera un extracto que presenta características muy similares al extracto metanólico, por lo cual se considera que contienen tevetina pero, es probable que exista diferencia en cuanto a algunas de las sustancias presentes en cada extracto.

Para poder evaluar los extractos en ccf, se buscó el sistema de elución mas adecuado, el cual permite observar las manchas separadas y definidas, así como observar claramente la tevetina separada en los extractos, esto fue bastante difícil y complicado debido a que los extractos eluían en sistemas en los que la tevetina no, por lo cual fue necesario realizar un estudio cromatográfico completo con disolventes de diferentes polaridades, en cada caso no era posible determinar simultáneamente el comportamiento de tevetina y los extractos. Debido a esto fue necesario comenzar a evaluar mezclas de disolventes los cuales permitieron observar manchas separadas y además se logró observar claramente a la tevetina. El sistema de elución obtenido es:

metanol/2-propanol/butanol/hexano (1.5:2:1:0.5).

Se realizó una prueba de miscibilidad de los extractos observándose que los extractos de acetato de etilo no presentan miscibilidad con agua debido a que son de naturaleza aceitosa, en cambio los extractos etanólicos y metanólicos si presentan

características de hidrosolubilidad, lo cual favorece la administración en la evaluación farmacológica. Esta prueba se realizó a temperatura ambiente.

Se realizó la evaluación cualitativa para glicósidos cardíacos, en donde es posible identificar los extractos que contienen estas sustancias, los extractos que dan positivo a la prueba son los etanólicos y metanólicos, dando también positivo en cuanto a la presencia de tevetina, estos extractos contienen varias sustancias que, según indica esta prueba, se trata de glicósidos cardíacos los cuales son los responsables el efecto farmacológico observado y gracias a esta mezcla de sustancias el efecto observado es de características similares a la tevetina pero no iguales. Esta prueba también indica que los extractos de acetato de etilo no contienen ni tevetina ni algún otro glicósido cardíaco por lo que no presentan algún efecto farmacológico.

Se observa que los extractos de acetato de etilo no presentan la actividad farmacológica esperada, ya que no contienen glicósidos cardíacos, además de que presentan características semejantes a las de un aceite; de modo contrario los extractos etanólicos y metanólicos sí generan un aumento en la fuerza de contracción.

Se observa un efecto inotrópico positivo superior al del estándar de tevetina para los dos extractos, encontrándose que éste aumento no es proporcional a la dosis administrada, sino que en la primera dosis alcanza un efecto máximo y se mantiene así al aumentar la dosis siguiente. El extracto metanólico presenta una potencia superior que el extracto etanólico lo que indica que éste sistema extractivo permite obtener una mezcla de compuestos de mejor calidad. Si bien existe una sustancia capaz de aumentar la fuerza de contracción, existen además otras que pueden generar sinergismo. De la misma manera los extractos contienen otros componentes los cuales por sí mismos pueden generar los efectos observados.

De manera simultánea se determinó un efecto adicional que no se encuentra reportado, el cual es la disminución de la presión de perfusión coronaria (resistencia vascular coronaria), este efecto no es de magnitudes tan importante como el aumento de la contracción, pero sí es importante indicar que los extractos presentan características similares a las de la tevetina ya que entre sus componentes se encuentra este glicósido,

pero también contienen otros glicósidos cardiacos los cuales en su conjunto producen un efecto farmacológico que de alguna manera se encuentra potenciado, o es probable que sea una suma de los efectos de cada uno de los componentes del extracto, es por esto que se observan efectos no esperados ya que no solo contiene glicósidos sino muchas otras sustancias que están favoreciendo la presencia de los efectos farmacológicos descritos.

Es importante realizar la separación de los componentes de los extractos, mediante diversos métodos analíticos, para lo cual se requiere de un estudio más complejo y que conlleva más tiempo de pruebas. Esto facilitaría la identificación de los componentes y cuál es el efecto que cada uno produce sobre el músculo cardiaco.

IX. CONCLUSIONES

Se puede concluir que el yoyote es una planta que contiene diversas sustancias, entre ellas glicósidos cardiacos como tevetina, es posible obtener un extracto mediante el uso de metanol o etanol como disolventes de extracción, los cuales permiten obtener extractos que contienen en su gran mayoría glicósidos cardiacos, estos extractos son muy sencillos de obtener y de bajo costo.

Una vez encontrado el sistema de elución apropiado, es posible realizar la evaluación cromatográfica, estos extractos contienen una gran cantidad de sustancias, aunque solamente se identificó tevetina, por lo complejo de la mezcla, pero se comprobó la presencia de glicósidos cardiacos, estas sustancias se encuentran en gran proporción en los extractos metanólicos y etanólicos.

Las características de los extractos obtenidos son favorables para las evaluaciones farmacológicas, ya que es posible observar claramente el efecto esperado con cada extracto, ambos extractos aumentan la fuerza de contracción del músculo cardiaco, no es un efecto dosis-dependiente, ya que al aumentar la dosis no aumenta el efecto sino que se mantiene sin llegar a un efecto tóxico o letal. Los efectos observados son la suma de las sustancias que cada extracto contiene por lo que es necesario realizar la separación e identificación de los componentes del extracto para definir cual o cuales son las sustancias responsables del efecto farmacológico observado.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 2000. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 7ª ed; SSA, México, p. 274-275, 738, 751-752, 765, 805.
2. Abe, F., Yamauchi, T., Nohara, T. C-Nor-Homo-Cardenolide Glycosides from *Thevetia nerifolia*. **Phytochemistry**. 1992. **31**:1: 251-254.
3. Abe, F., Yamauchi, T. Two Pregnanes from Oleander Leaves. **Phytochemistry**. 1992. **31**:8: 2819-2820.
4. Abe, F., Yamauchi, T., Wan, A.S.C. Cardiac Glycosides from the leaves of *Thevetia nerifolia*. **Phytochemistry**. 1992. **31**:9: 3189-3193.
5. Abe, F., Yamauchi, T., Yahora, S., Nohara, T. Glycosides of 19-Formylthevetigenin and 5 α -Thevetigenin from *Thevetia nerifolia*. **Phytochemistry**. 1994. **37**:5: 1429-1432.
6. Aguilar, C.A., Zolla, C. 1982. Plantas Tóxicas de México; IMSS, México, p. 196-198.
7. Argueta, A.V. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III; Instituto Nacional Indigenista, México, p. 1404-1406.
8. Begum, S., Adil, Q., Siddiqui, B.S., Siddiqui, S. Constituents of the Leaves of *Thevetia nerifolia*. **J. Nat. Prod.** 1993. **56**:4: 613-617.
9. Berne, R.M, Levy, M.N. 1999. Fisiología. 2ª ed.; Harcourt Brace, Madrid, España, p. 24-25, 243-249.
10. Bevan, J.A., 1982. Fundamentos de Farmacología. Introducción a los Principios de Acción de los Fármacos. 2ª ed.; Harla, México, p. 5.
11. Bowman, W.C., Rand, A.J. 1985. Farmacología Bases Bioquímicas y Patológicas. 2ª ed; Nueva Editorial interamericana, México, p. 39.36-39.42.
12. Bruggeman, L. 1962. Tropical Plants and Their Cultivation; Thomas and Hudson, London, p 195, fig. 274.
13. Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. 2ª ed.; Intercept, USA, p. 189-192, 748-749.
14. Bruneton, J. 2001. Plantas Tóxicas Vegetales Peligrosos para el Hombre y los Animales; Acribia, España, p. 126-129.
15. Budavari, S. 2001. The Merck Index. 13th edn; Merck & Co., USA, p. 277-278, 1462.
16. Céspedes, A.V., Corral, A.S., Díaz, C.O., Morales, Y.F. Efecto del *Nerium oleander* en modelo de corazón aislado de cobayo. **Rev. Cubana Plant. Med.** 1999; **3**:2: 74-8.

17. Chandrasoma, P., Taylor, C.R. 1999. Patología General. 3ª ed; Manual Moderno, México D.F., p. 327-390.
18. Clarke's. 1986. Isolation and Identification of Drugs; 2nd. edn Pharmaceutical Press, London, p. 54, 302-303.
19. Connors, K.A. 1981. Curso de Análisis Farmacéutico; Reverté, España, p. 375-386.
20. Cruz, A., García, I., Iriarte, J., Muchowsky, J.M., Regla, I. Seeds of *Thevetia Species* as an Alternative Source of Digitoxygenin. **J. Org. Chem.** 1977. **92:22**: 3580-3584.
21. Cruz, A., Guzmán, A., Iriarte, J., Medina, R., Muchowsky, J.M. 18,20-Oxido-20,22-dihydroneriifolin, an Unusual Oxygenated Cardenolide. **J. Org. Chem.** 1979. **44:20**: 3511-3515.
22. Domínguez, X.A. 1979. Métodos de Investigación Fitoquímica; Limusa. México, p. 42, 195-209.
23. Döring, H.J., Dehnert, H. 1988. The Isolated Perfused Heart According to Langendorff; Biomesstechnik-Verlag, Germany, p. 1-34.
24. Emes, M.B., Ochurte, C.E., Castañeda, S.G., Peralta B.G. 1994. Flora Medicinal Indígena de México. Vol. III; Instituto Nacional Indigenista, México, p. 181-184, 202.
25. Gutiérrez, G.C. 1995. Principios de Anatomía Fisiología e Higiene; Uteha-Noriega, México, p. 187-193.
26. Guyton, A.C. 1987. Fisiología Humana; Interamericana McGraw-Hill, México, p. 257-275.
27. Harborne, J.B. 1973. Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis; Chapman and Hall, USA, p. 4-26, 192-195.
28. Hoar, W.S., Hickman, C.P. 1978. Manual de Laboratorio para Fisiología General y Comparada; Omega, España, p. 23, 95-107, 259-263, 267-270.
29. Johnston, E.J., Jacobs, A.L. Thin-Layer Chromatography of Cardiac Glycosides. **J. Pharm. Sci.** 1966. **55:5**: 531-532.
30. Katzung, B.G., Parmley, W.W. Glucósidos cardiacos y otros fármacos utilizados en la insuficiencia cardiaca congestiva. En: Katzung, B.G. 1999. Farmacología Básica y Clínica. 7ª ed.; El Manual Moderno, México, p 235-254.
31. Kelly, R.A., Smith, T.W. Pharmacological Treatment of Heart Failure. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. 1996. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Vol. I. 9th edn.; McGraw-Hill, International, USA, p. 809-821.

32. Lathers, C.M. Tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva; glucósidos digitálicos. En: Smith, C.M., Reynard, A.M. 1993. Farmacología; Médica Panamericana, Argentina, p. 465-487.
33. Lenhinger, A.L. 1995. Bioquímica las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2ª ed.; Omega, España, p. 800-804.
34. López, A.L. 1970. Atlas de Anatomía Humana; Interamericana, México, p. 164-173.
35. Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler A. 1992. Atlas de Farmacología; ediciones Científicas y Técnicas, España, p. 116-127.
36. Martínez, M. 1992. Las Plantas Medicinales de México. 6ª ed.; Botas, México, p. 73-76.
37. Mayo, D., Pike, R.M., Trunper, P.T. 1986. Microscale Organic Laboratory. 3rd edn.; Alhambra, España, p. 4-60.
38. Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. 2002. Nutrición Salud y Enfermedad. Vol. II. 9ª ed.; McGraw-Hill, México D.F., p. 1423-1429.
39. Smith, I., Feinbers, J.G. 1979. Cromatografía sobre Papel y Capa Fina; Alhambra, España, p. 181-200.
40. Volák, J., Stodola, J., Severa, F. 1989. Plantas Medicinales. 2ª ed.; Artia, Checoslovaquia, p 30.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA