

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y CARACTERIZACIÓN  
PARCIAL DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
ESTIMULADORA SOBRE MACROFAGOS Y/O  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS  
DE RAÍZ, TALLO Y HOJA DE *Carlwrightia*  
*cordifolia* A. GRAY.

Por

M.C. Delia Elva Cruz Vega

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biotecnología

MARZO DEL 2002

M.C. Delia Elva Cruz Vega

TD  
QK495  
.C74  
C7  
2002  
c.1



1080124431

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ESTIMULADORA SOBRE  
MACRÓFAGOS Y/O ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN  
EXTRACTOS DE RAÍZ, TALLO Y HOJA DE  
*Carludovicia cordifolia* A. GRAY.



Aprobación de la Comisión de Tesis

*[Handwritten signature]*

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y CARACTERIZACIÓN  
PARCIAL DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD  
ESTIMULADORA, SOBRE MACRÓFAGOS Y/O  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EXTRACTOS  
DE RAÍZ, TALLO Y HOJA DE *Carludovicia*  
*cordifolia* A. GRAY.

Director interno

*[Handwritten signature]*

Por

Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos  
M.C. Delia Elva Cruz Vega

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Biotecnología

*[Handwritten signature]*

Dra. Adriana Elizondo Herrera

MARZO DEL 2002



TD

QK495

• C74

C7

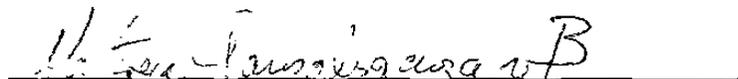
2002

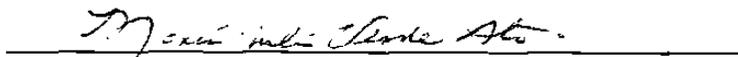


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

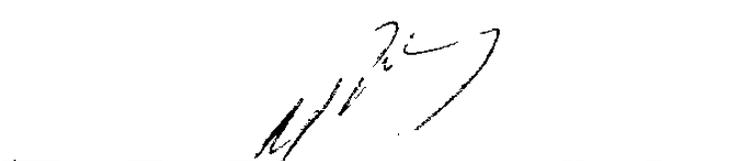
**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE  
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ESTIMULADORA SOBRE  
MACRÓFAGOS Y/O ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN  
EXTRACTOS DE RAÍZ, TALLO Y HOJA DE  
*Carlowrightia cordifolia* A. GRAY.**

Aprobación de la Comisión de Tesis

  
Dra. Ma Teresa González Garza y Barrón  
Director externo

  
Dra. Ma Julia Verde Star  
Director interno

  
Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos

  
Dra. Catalina Rivas Morales

  
Dra. Adriana Elizondo Herrera

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN:

**Instituto Mexicano del Seguro Social**  
Centro de Investigación Biomédica del Noreste  
División de Biología Celular y Molecular

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Laboratorio de Fitoquímica

## RESUMEN

Una de las plantas más utilizadas en la medicina tradicional en México es la “árnica”, que se utiliza principalmente en lesiones de la piel, traumatismos, golpes e inflamaciones. Su nombre vulgar es derivado de su similitud terapéutica con *Arnica montana*, una planta europea utilizada para los mismos fines y aceptada en la Farmacopea Europea, la cual tiene amplia difusión tanto en Europa como en Norteamérica. En nuestro país el nombre de árnica no se aplica a una sola especie, existen más de 20 especies que se denominan con ese nombre. A pesar de utilizarse extensamente existen pocos estudios que corroboren su efecto farmacológico. En el Estado de Nuevo León la especie utilizada como “árnica” pertenece a la familia *Acanthaceae* y se identificó como *Carlownrightia cordifolia* A. Gray, vouche 11710 del Herbario IMSSM.

Dentro del sistema de defensa del organismo los macrófagos juegan un papel importante en la inmunidad inespecífica por su habilidad para ingerir y destruir bacterias, células deterioradas o células tumorales, para que esto sea posible, es necesario que se encuentren en un estado de activación, en el cual liberan gran cantidad de compuestos tóxicos, entre ellos derivados del óxido nítrico (NO). Recientemente se ha reportado que el NO tiene efectos tanto inflamatorios como antiinflamatorios ya que actúa como un autorregulador. Debido a los efectos antiinflamatorios y antisépticos de *C. cordifolia*, podría ser que alguno de sus compuestos afecten la actividad de macrófagos, y/o sintetice compuestos con efecto antiparasitario.

El objetivo de este trabajo fue efectuar la caracterización parcial de los compuestos con actividad biológica de extractos de raíz, tallo y hoja de *C. cordifolia*.

Los resultados mostraron, que solo los extractos metanólicos y hexánicos de hoja, estimularon macrófagos con producción de NO, la cual fue significativa: 92.8 y 156.6  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ); lo que podría contribuir a los mecanismos antiinflamatorios atribuidos a *C. cordifolia*, esto es considerando los efectos autorreguladores de la inflamación que ejerce el aumento de la concentración de NO, ya que se conoce que el aumento de la concentración de NO inhibe al factor N-kappa, responsable de la transcripción de la enzima iNOS y el receptor de membrana VCAM1 ambos directamente involucrados en el proceso inflamatorio. Los extractos metanólico y acuoso de hoja, presentaron actividad antiamebica sobre *Entamoeba histolytica*. Los extractos de hoja, también mostraron actividad antimicrobiana y esta fue relevante en el extracto hexánico, sobre *Salmonella Sp* y *Candida albicans*, lo que justifica su utilización como antiséptico. Las pruebas químicas dieron positivas para saponinas esteroides y triterpenos.

## SUMMARY

One of the most used plants in the traditional medicine in Mexico is the "arnica" that it is used mainly in skin injuries, traumatismos, bumps and inflammations. Its vulgar name is derived from its therapeutic similarity with *Arnica montana*, a European plant used for the same purposes and accepted in the European Pharmacopoeia, having wide diffusion as much in Europe as in North America. In our country the name of arnica doesn't apply to a single species, there are more than 20 species that are denominated with that name. In spite of a widely use, there are few studies that corroborate their pharmacological effect. In the Northeastern of Mexico (Nuevo Leon) the arnica species belongs to the *Acanthaceae* family identified as *Carlownrightia cordifolia* A. Gray, vouched 11710, IMSSM Herbarium.

Inside the organism defense system, macrophages play an important role in the unspecific immunity for its ability to ingest and destroy bacteria, damaged cells or tumor cells. To make this possible, it is necessary that they be in a state of activation in which they liberate a great amount of toxic compounds, among them those derived of the nitric oxide (NO). Recently it has been reported that the NO has inflammatory and anti-inflammatory effects since it acts as a self-regulator. Due to *C. cordifolia* anti-inflammatory and antiseptic effects, and that some of their compounds affect the macrophage activity and synthesized compounds with anti-parasitical effect.

The aim of this study was to make a partial compound characterization with biological activity of *C. cordifolia* stem and leaf extracts.

Results showed that only methanol and hexane extracts from leaves, stimulated macrophages with NO production, turned out important: 92.8 and 156.6  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ); this could contribute to anti-inflammatory mechanisms attributed to *C. cordifolia*. This is considering the self-regulatory inflammation effects that develop an increase of NO concentration, since it is known that the increase of NO concentration inhibits the N-kappa factor, responsible for the transcription of the iNOS enzyme and VCAM1 membrane receptor, both directly involved in the inflammatory process. The methanol and aqueous extracts of leaves presented anti-amoebic activity on *Entamoeba histolytica* trophozoites. Leaf extracts also showed antibacterial activity mainly in the hexane extract on *Salmonella Sp* and *Candida Albicans* that justify its use as antiseptic. Chemical tests turned out positives for saponines, steroids and triterpenes.

## DEDICATORIA

*A mis hijos: Mis grandes amores y mayor motivación para seguir adelante.*

*A mis padres: Por su gran cariño y por el ejemplo a seguir como personas con enormes deseos de superación, gran calidad moral y eterno apoyo..*

*A mis hermanos: Por su cariño y apoyo en todo momento.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi eterno agradecimiento a:

*Dra. María Teresa González Garza y Barrón y Dra. María Julia Verde Star.* Asesoras de mi tesis y apoyo primordial en el inicio de mi carrera en investigación, por creer en mi y por el apoyo constante en la realización de este trabajo.

*Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Lilia Hortensia Morales Ramos y Dra. Adriana Elizondo Herrera.* Por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

*Dra. Azucena Oranday.* Por sus apreciables enseñanzas.

*MCP Noe Salinas.* Por su importante participación en la selección y colecta de la planta en estudio.

*QFB Lorena Siller Campos, Dra. Ma. de los Angeles Verástegui, M.C. Gerardo Lozano Garza, QBP Yesenia Silva Belmares y MH J. Antonio Luna de la Rosa.* Por su apoyo significativo en el desarrollo de este proyecto.

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* por el soporte económico para la realización de mi doctorado.

*Centro de Investigación Biomédicas del Noreste del IMSS,* por el apoyo recibido para el desarrollo de este estudio.

*Todos mis amigos.* Que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
2.1 Aspectos generales	5
2.1.1 Análisis químicos	11
2.1.2 Propiedades farmacológicas	12
2.1.3 Planteamiento del problema	14
2.1.4 Clasificación Botánica de <i>C. cordifolia</i>	16
2.1.5 Antecedentes de la familia <i>Acanthaceae</i>	17
2.1.6 Originalidad y Justificación	19
2.2 Hipótesis	21
2.3 Objetivos	21
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>23</b>
3.1 Origen de los reactivos	23
3.2 Material vegetal.	24
3.3 Material biológico	24
3.4 Preparación de los extractos	28
3.5 Bioensayos.	30
3.5.1 Activación de macrófagos	30
3.5.2 Determinación de la producción de NO como efecto de los extractos sobre macrófagos peritoneales de ratón	30
3.5.3 Determinación de NO por el método de Griess.	31
3.5.4 Determinación de actividad antimicrobiana	32
3.5.5 Determinación de actividad antiamebiana	34
3.6 Métodos de Identificación	35
3.6.1 Pruebas químicas	35
3.6.2 Cromatografía en capa delgada	38
3.6.3 Revelado en placas cromatográficas	40
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
4.1 Extractos obtenidos	42
4.2 Actividad estimuladora de los extractos sobre	42

	macrófagos en ausencia de LPS . . . . .	43
4.3	Efecto de los extractos sobre macrófagos en presencia y ausencia de LPS . . . . .	46
4.4	Actividad antimicrobiana . . . . .	49
4.5	Actividad anti <i>Amoeba</i> . . . . .	51
4.6	Caracterización parcial . . . . .	54
5.	<b>DISCUSION</b> . . . . .	68
6.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> . . . . .	
6.1	Conclusiones . . . . .	75
6.2	Recomendaciones . . . . .	76
	<b>REFERENCIAS</b> . . . . .	77
	<b>PUBLICACIONES PRODUCIDAS</b> . . . . .	86
A.	Delia E. Cruz-Vega, Abigail Aguilar, Jorge Castro-Garza, and Ma. Teresa González-Garza. Anti-amebic activity of aqueous extracts from five medicinal plants from northeastern Mexico. <i>Archives of Medical Research</i> 2000; 31:S17-S18.	
B.	Delia E. Cruz-Vega, Abigail Aguilar, Ma. Julia Verde-Star, Javier Vargas-Villarreal, and Ma. Teresa González-Garza. Leaf extracts of <i>Carlownightia cordifolia</i> induce Macrophage nitric oxide production. <i>Life Sciences</i> 2002; 70(11):1279-1284.	

## LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1.	Plantas utilizadas en medicina tradicional en México, registradas bajo el nombre popular de árnica . . . . .	10
2.	Lista de cepas bacterianas y levaduriformes utilizadas . . . . .	26
3.	Características de las placas cromatográficas . . . . .	39
4.	Producción de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) por macrófagos peritoneales de ratón en presencia de extractos de <i>C. cordifolia</i> . . . . .	44
5.	Efecto de extractos de <i>C. cordifolia</i> en la producción de NO( $\mu\text{M}$ ) en cultivos de macrófagos en presencia y ausencia de LPS . . . . .	47
6.	Resultados de actividad antimicrobiana de extractos de <i>C. cordifolia</i> . . . . .	50
7.	Resultados del porcentaje de inhibición de crecimiento de los extractos de <i>C. cordifolia</i> sobre <i>E. histolytica</i> . . . . .	52
8.	Resultados de las reacciones químicas efectuadas a los extractos metanólico y hexánico de hoja de <i>C. cordifolia</i> . . . . .	55
9.	Resultados de la cromatografía en capa delgada, del extracto metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> observada a la luz visible . . . . .	56
10.	Resultados de la cromatografía en capa delgada, del extracto hexánico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con luz ultravioleta . . . . .	58

11.	Resultados de la cromatografía en capa delgada, del extracto metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> revelado con luz ultravioleta . . . . .	59
12.	Resultados de la cromatografía en capa delgada, del extracto hexánico de hoja de <i>C. cordifolia</i> revelado con reactivo de Liebermann-Buchard . . . . .	61
13.	Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> revelado con reactivo de Liebermann-Buchard . . . . .	62
14.	Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con reactivo de cloruro de antimonio ( $SbCl_3$ ) . . . . .	65
15.	Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto hexánico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con reactivo de cloruro de antimonio. . . . .	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1.	Fotografía de <i>C. cordifolia</i> , una de las plantas utilizadas como árnica en la región del norte . . . . .	15
2.	Gráfica de la producción de NO ( $\mu\text{M}$ ) por macrófagos peritoneales de ratón en presencia de extractos de <i>C. cordifolia</i> . . . . .	45
3.	Gráfica del efecto de extractos de <i>C. cordifolia</i> , en la producción de NO ( $\mu\text{M}$ ) en cultivos de macrófagos en presencia y ausencia de LPS. . . . .	48
4.	Efecto inhibitorio de los extractos de <i>C. cordifolia</i> sobre <i>E. histolytica</i> . . . . .	53
5.	Cromatograma de los extractos hexánico y metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> . Observado con luz visible . . . . .	57
6.	Separación cromatográfica del extracto hexánico y metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con luz ultravioleta. . . . .	60
7.	Separación cromatográfica del extracto hexánico y metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con reactivo de Liebermann-Buchard. . . . .	63
8.	Separación cromatográfica de los extractos hexánico y metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con cloruro de antimonio, observado con luz visible . . . . .	66
9.	Separación cromatográfica de los extractos hexánico y metanólico de hoja de <i>C. cordifolia</i> , revelado con cloruro de antimonio, observado con luz ultravioleta. . . . .	67

## ABREVIACIONES Y SIMBOLOS UTILIZADOS

A.	- Arnica	NO	- Oxido nítrico
cel	- célula	OMS	- Organización Mundial de la Salud
CI <sub>50</sub>	- concentración inhibitoria 50	PBS	- amortiguador de fosfatos salino
C.	- <i>Carlwrightia</i>	pH	- Potencial de hidrógeno
cm	- centímetros	PMA	- acetato de forbol miristato
ED	- dosis efectiva	Rf	- Relación de frentes
EtOH	- etanólico	SbCl <sub>3</sub>	- Cloruro de antimonio
et al	- y colaboradores	sp	- especie
DMSO	- Dimetil sulfóxido	UANL	- Universidad Autónoma de Nuevo León
DTH	- respuesta de hipersensibilidad tardía	UFC	- unidades formadoras de colonias
g	- gramos	Vis	- visible
h	- hora	Xg	- gravedad
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	- Acido fosfórico	%	- por ciento
Hex	- hexánico	µM	- micromolar
H.	- <i>Heterotheca</i>	µl	- microlitro
IMSS	- Instituto Mexicano del Seguro Social	µg	- microgramo
IMSSM	- Herbario del IMSS	° C	- grados centígrados
iNOs	- Oxido nítrico sintasa, inducible		
l	- litro		
L-B	- Liebermann-Burchard		
LPS	- lipopolisacáridos		
MeOH	- metanólico		
ml	- mililitros		
mm	- milímetros		
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sodio		
NF-kB	- Factor nuclear kappa B		
NaOH	- Hidróxido de sodio		

## 1. INTRODUCCION

En la última década la utilización de la herbolaria medicinal ha retomado especial importancia, bajo el enfoque de una nueva biotecnología, que augura revolucionar el mundo de los medicamentos provenientes de plantas (Wagner, et al., 1985; Schultes, et al., 1972). Este renacimiento de la herbolaria se acompaña también con el descubrimiento de propiedades curativas y conceptos farmacodinámicos novedosos, reincorporando muchos recursos vegetales que fueron vistos como placebos en el campo farmacéutico del pasado (Farnsworth, et al., 1985).

Actualmente, se ha estimado que el 60% de las drogas en desarrollo que se encuentran en ensayos clínicos, son de origen natural, y la gran mayoría de éstas no son económicamente sintetizables, por lo que todavía son obtenidas de cultivos silvestres (Yue-Zhong, 1998).

El interés de las drogas de origen vegetal es debido a varias razones, la medicina convencional puede ser ineficiente, debido al abuso y/o uso incorrecto de ésta, originando efectos secundarios y drogo-resistencia, además de que un

gran porcentaje de la población mundial, no tiene acceso al tratamiento farmacológico convencional, mientras que la medicina tradicional y los conocimientos etnobotánicos sugieren que estos productos no son inofensivos. Sin embargo el uso de estas sustancias no siempre está autorizado por autoridades legales, debido a que se prescriben los productos fitomedicinales y son distribuidos comercialmente, sin control de calidad en su producción, lo que tiene repercusión en su eficacia (Rates, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la fitoterapia en sus programas de salud, y sugiere procedimientos básicos para la validación de drogas de origen vegetal dentro de su desarrollo (Vulto and Smet, 1998).

Países asiáticos como China e India tienen bien establecida su industria de plantas medicinales. Por otro lado, los países latinoamericanos están invirtiendo en programas de investigación de plantas medicinales, por medio de estandarización y regulación de los productos fitomedicinales, siguiendo el ejemplo de países europeos tales como Francia y Alemania. En éste último país el 50% de los productos fitomedicinales son vendidos con prescripción médica, y el costo es cubierto por las compañías de seguros (Gruenwald, 1997).

En Norteamérica los productos fitomedicinales son vendidos como "alimentos saludables" (Gruenwald, 1997; Calixto, 2000). Los consumidores y profesionales se han esforzado para modificar esto, solicitando información acerca de la eficacia y seguridad de estos productos. Esto ha dado lugar a una

nueva pauta para su registro, con supervisión como es el caso en Estados Unidos de América por la Food and Drug Administration (FDA), Organismo que regula los medicamentos de patente (Rates, 2001).

Resumiendo, el contexto moderno, social y económico visto en los servicios de salud, la carencia de falta de mercado farmacéutico y el reconocimiento de la investigación sobre las plantas medicinales usadas en la medicina tradicional, ha originado un satisfactorio acercamiento para el desarrollo de nuevas drogas, reflejándose esto en un incremento del número de publicaciones en este campo, además de que instituciones gubernamentales y privadas alrededor del mundo se interesen, y sean las que apoyan financieramente, programas de investigación en este rubro (Calixto, 1996).

En México, el conocimiento de las propiedades curativas de las plantas es utilizado permanentemente entre las poblaciones indígenas, y las plantas medicinales constituyen el recurso más grande y valioso de la medicina Tradicional Mexicana (Lozoya, 1976).

En el ámbito nacional el interés en el medio científico y médico en relación con el estudio de la Medicina Tradicional y de las plantas medicinales también se ha incrementado recientemente. Aunado a esto, se encuentra la situación provocada por la crisis económica del país, donde los costos de medicamentos de patente hacen cada vez más difícil su adquisición. Todo esto

lleva a la convicción de que los recursos vegetales del país deben ser estudiados, para de esta manera afrontar las carencias y costos de los medicamentos.

Existe una gran cantidad de plantas registradas y clasificadas taxonómicamente en los diferentes herbarios del país, donde además se ha tomado en cuenta el conocimiento popular, y se ha interrogado en forma programada sobre su uso a curanderos, chamanes y hierberos. Sin embargo, aún existe un gran número de plantas que a pesar de que su uso es popular, no se encuentran incluidas en dichos acervos.

Por otra parte, en la mayoría de los casos, la comprobación científica de su valor terapéutico no existe, ni se conocen los componentes químicos responsables de la supuesta acción farmacológica. Es por ello que el análisis de aquellas plantas utilizadas en medicina tradicional resulta importante, ya que permitirá comprobar si efectivamente tienen un valor terapéutico, caracterizar el o los compuestos responsables de esa actividad y dilucidar su mecanismo de acción.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Aspectos generales de la plantas medicinales**

Las plantas pueden ser utilizadas como fuentes terapéuticas de varias maneras. Pueden ser utilizadas como té u otros remedios hechos en casa. Pueden también ser usadas como extractos crudos o fracciones concentradas en preparaciones farmacéuticas tales como tinturas, extracto fluido, polvos, tabletas y cápsulas cuando son consideradas como preparaciones fitofarmacéuticas o medicinas herbolarias. Finalmente las plantas pueden ser sujetas a extracciones sucesivas y procedimientos de purificación, para aislar compuestos de interés, los cuales pueden ser ellos mismos los activos y ser usados directamente como droga. Ejemplos de estos casos son la quinina, ergotamina y digoxina; o bien pueden ser utilizados como precursores como en el caso del baccatin, el cual es precursor del taxol en donde por medio de procesos de semisíntesis se obtiene el compuesto activo, o utilizarse como modelos para su síntesis total (Rates, 2001).

Se ha demostrado que algunas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional contra diversos agentes infecciosos, no tienen actividad citotóxica directa contra dichos agentes. Sin embargo, han sido utilizadas con gran éxito.

Estudios recientes han demostrado que dicho éxito, se debe a una acción directa sobre el sistema inmunológico, el cual es estimulado permitiendo el control de la enfermedad. Tal es el caso de *Spiraea prunifolia* (So, et al., 1999) y *Dichroa febrifuga* (Murata, et al., 1998) usadas en el tratamiento de la malaria y de *Kalanchoe pinnata* planta utilizada contra la infección causada por *Leishmania* (Da-Silva, et al., 1999). En los estudios efectuados con los extractos de estas plantas, se encontró que actúan estimulando a los macrófagos con la consecuente producción de óxido nítrico (So, et al., 1999; Da-Silva, et al., 1999).

El óxido nítrico (NO) ha demostrado ser uno de los principales efectores contra agentes infecciosos (Nathan, et al., 1991; Abbas, et al., 1991). Esto sugirió que el efecto de los extractos vegetales sobre el control de la infección, es actuando de manera indirecta, mediada por la estimulación de los macrófagos.

El óxido nítrico, antiguamente conocido como factor de relajación endotelial, es una molécula de tipo radical libre, con un electrón libre centrado en el átomo de nitrógeno. En el ámbito biológico es producido por acción de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), actuando sobre el aminoácido L-arginina.

Existen diferentes isoformas de NOS y se pueden clasificar de acuerdo al tipo de enzima (constitutiva o inducible) y de acuerdo al tipo de célula (macrófagos, células endoteliales, neuronas, células musculares lisas) en el que encontramos la enzima (Moncada, et al., 1993; Knowles, et al., 1994).

La producción de NO por los macrófagos es mediada por una estimulación de estas células por antígenos a nivel de membrana, la señal se traduce en una fosforilación del inhibidor del factor nuclear kappa-B (I-NF-kB) el cual es degradado, una vez liberado el NF-kB, se traslada al núcleo, y promueve la transcripción de iNOS, enzima responsable de la producción de NO (Lee, et al., 1998). Como un resultado de esto NF-kB esta envuelto en actividades tan divergentes como respuestas inmune e inflamatoria, patogénesis de ciertas enfermedades, respuestas de fase aguda, control del ciclo celular, diferenciación y respuesta a infecciones virales. La inhibición de NF-kB puede ser un blanco terapéutico para la prevención o tratamiento de respuestas biológicas no deseadas, causadas por la activación de NF-kB.

El factor NF-kB es uno de los mensajeros intracelulares llamados también factores de transcripción. Fue identificado por primera vez por Sen y Baltimore (1986), como una proteína nuclear específica de cel B. Sin embargo NF-kB es ahora conocido por ser un factor de transcripción de respuesta rápida en una amplia variedad de células e involucrado en la generación de un gran número genes, como son los que codifican para citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, inmunoreceptores, proteínas

de fase aguda, factores de transcripción y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo; Todos ellos contienen sitios de unión a NF- $\kappa$ B en sus promotores. NF- $\kappa$ B esta presente en el citoplasma como un complejo inactivo asociado con un inhibidor llamado I $\kappa$ B. Como un resultado de esto, NF- $\kappa$ B esta envuelto en actividades tan divergentes, como respuestas inmune e inflamatoria, a la patogénesis de ciertas enfermedades, respuestas de fase aguda, control del ciclo celular y su diferenciación y respuesta a infecciones virales.

Dentro de la investigación de plantas medicinales, la selección de las plantas a estudiar, se realiza basándose en diferentes estrategias que den como resultado una medicina herbolaria o un compuesto activo aislado. Esto es realizado, tomando en cuenta su uso en medicina tradicional (preparación, parte de la planta utilizada, forma de administración), reportes de contenido químico y toxicidad.

Una de las plantas más utilizadas en el territorio nacional es la "árnica", la cual es utilizada principalmente en lesiones de la piel, en el tratamiento de traumatismos, magulladuras y dolores musculares, golpes e inflamaciones, padecimientos gastrointestinales infecciosos, bronquitis y el tratamiento postoperatorio de tromboflebitis (Martínez, 1984; Díaz , 1976; Lozoya, et al., 1987; Aguilar, et al., 1994). Sin embargo el nombre de "árnica" no se aplica a una sola especie, dentro del grupo de plantas denominadas "árnica", la más conocida es la *Heterotheca inuloides* Cass (Lozoya, et al., 1987).

Su nombre común es derivado de su similitud terapéutica con *Arnica montana* L., una planta europea utilizada para los mismos fines y de amplia difusión tanto en Europa como Norteamérica (Baillargeon, et al., 1993; Schröder, et al., 1990).

Como resultado de estudios etnobotánicos realizadas dentro del territorio nacional, se encontró, que se denomina como "árnica" a diferentes plantas, dependiendo del lugar de utilización.

Se han reportado 20 diferentes plantas, 17 especies correspondientes a la familia *Compositae*, y tres especies más correspondientes a las familias *Leguminosae*, *Onagraceae* (Aguilar, et al., 1994; Díaz 1976); donde la especie encontrada en mayor proporción dentro de la República mexicana es la *Heterotheca inuloides*.

Estas plantas a pesar de presentar diferencias por sus características botánicas, son utilizadas para las mismas aplicaciones en medicina tradicional, por su similitud en sus atributos medicinales, en la Tabla 1, se pueden apreciar las diferentes plantas utilizadas como árnica, así como su ubicación dentro del territorio nacional.

**TABLA 1**

Plantas usadas en medicina tradicional en México registradas bajo el nombre popular de árnica.

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE POPULAR	LOCALIZACION
<i>Acanthaceae</i>	<i>Carlownightia cordifolia</i>	Arnica	Nuevo León
<i>Compositae</i>	<i>Bahía absinthifolia</i>	Arnica <sup>8</sup>	Nuevo León
<i>Compositae</i>	<i>Gaillardia sp</i>	Arnica <sup>9</sup>	San Luis Potosí
<i>Compositae</i>	<i>Grindelia inuloides</i>	Arnica <sup>8</sup>	Edó. de Méx.
<i>Compositae</i>	<i>Grindelia squarrosa</i>	Arnica <sup>8</sup>	Edó. de Méx.
<i>Compositae</i>	<i>Heterotheca inuloides</i> Cass	Arnica <sup>8-10</sup>	Centro y Sur de la Rep.
<i>Compositae</i>	<i>Heterotheca leptoglobosa</i> DC	Arnica <sup>9</sup>	San Luis Potosí, Gto
<i>Compositae</i>	<i>Machaeranthera brevilingulata</i>	Arnica morada <sup>6</sup>	Zacatecas
<i>Compositae</i>	<i>Machaeranthera scabrella</i>	Arnica <sup>8</sup>	Nuevo León
<i>Compositae</i>	<i>Machaeranthera spinulosa</i>	Arnica <sup>8</sup>	Nuevo León
<i>Compositae</i>	<i>Mentzelia conzatti</i>	Arnica <sup>10</sup>	No especificada
<i>Compositae</i>	<i>Neurolaena lobata</i> L.	Arnica <sup>9</sup>	Yuc, Tab, Gro, Oax, Chis.
<i>Compositae</i>	<i>Taraxacum officinale</i>	Arnica <sup>8</sup>	Chis., Ver., Tamps.
<i>Compositae</i>	<i>Tithonia diversifolia</i> Gray.	Arnica <sup>8-9</sup>	Oaxaca
<i>Compositae</i>	<i>Trixis angustifolia</i> DC	Arnica <sup>9</sup>	Dgo a Aguas.
<i>Compositae</i>	<i>Trixis radialis</i> DC	Arnica <sup>9</sup>	Tam., Nay., hasta Yuc.
<i>Compositae</i>	<i>Verbesina Greenmani</i> Urb	Arnica de la costa <sup>9</sup>	Sinaloa a Oaxaca
<i>Compositae</i>	<i>Zexmenia Pringeli</i> Greenm	Arnica <sup>9-10</sup>	Puebla, Veracruz
<i>Leguminosae</i>	<i>Desmodium sp.</i>	Arnica <sup>8</sup>	Chiapas
<i>Onagraceae</i>	<i>Oenothera laciniata</i>	Arnica <sup>8</sup>	Chiapas

### 2.1.1 Análisis químicos

El estudio fitoquímico de este tipo de plantas se ha centrado en las plantas europeas: *Arnica montana*, *Arnica chamissonis* y en la especie mexicana *Heterotheca inuloides*. En las dos primeras se han identificado glucósidos flavonoides en los extractos de flores (Merfort, et al., 1987) y sesquiterpenlactonas del tipo helenalin y ésteres 11,13-dihidrohelenalina en las partes verdes de la planta (Schröder, et al., 1990). En las flores de *Heterotheca inuloides* se han identificado 10 glucósidos flavonoides además de otros compuestos como ácido caféico, ácido protocatéquico, ácido clorogénico y umbeliferona (Jerga, et al., 1990; Jerga, et al., 1990).

Los estudios en la planta mexicana *H. inuloides* se han realizado principalmente para encontrar diferencias químicas con la especie europea *A. montana*, más no por sus propiedades terapéuticas, los estudios pretenden encontrar algún marcador químico que les permita detectar la presencia de *H. inuloides* en sus mezclas, por considerarse a ésta como adulterante de los preparados de *A. montana* (Pietta, et al., 1994).

Posteriormente se han reportado estudios con *Heterotheca inuloides*. Haraguchi, et al., (1997) reportaron dos sesquiterpenoides: 7-hidroxi-3,4-

dihidroxicadalin y 7-hidroxicadalin; y flavonoides: quercetin y kaemferol aislados de la planta.

Se han aislado apartir de extractos con diclorometano de flores, los compuestos 7-hidroxicadalin y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadalin, sesquiterpenoides los cuales se comprobó que eran los compuestos responsables de las propiedades antiinflamatorias, en experimentos en ratones(Segura, et al., 2000). Delgado et al., (2001), aislaron 3 nuevos sesquiterpenoides de hoja, los que también reportan con actividad antiinflamatoria.

### 2.1.2 Propiedades farmacológicas

Se sabe que *A. montana* ha sido utilizada por años en la medicina tradicional en Europa y Norteamérica por sus propiedades antiinflamatorias y curativas en heridas. También ha sido utilizada como estimulante cardiaco y analéptico leve (Schröder, et al., 1990). Además del uso externo de los extractos de *A. montana* y *A. chamissonis*, la tintura de árnica se ha administrado oralmente para mejorar la circulación sanguínea, pero debido a los frecuentes efectos colaterales esta vía de administración es discutible (Baillargeon, et al 1993).

Se ha demostrado que las sesquiterpenlactonas, y los Flavonoides aislados de la especie *A montana*, tienen actividad citotóxica contra dos líneas celulares humanas: GLC4 (carcinoma de células pequeñas de pulmón) y COLO-320 (cáncer colorectal), donde los flavonoides muestran una moderada citotoxicidad y las sesquiterpenlactonas son hasta diez veces más tóxicas comparadas con el compuesto de referencia cisplatino (Woerdenbag, et al., 1994). A las sesquiterpenlactonas también se les han atribuido las reacciones alérgicas de tipo dermatitis que produce el contacto con las plantas (Pirker, et al., 1992). También se ha informado de polisacáridos con actividad estimuladora sobre macrófagos induciendo en estos la producción de TNF (Puhlmann, et al., 1991). Lo que resulta muy interesante considerando la actividad antiinflamatoria y antiséptica atribuida al árnica.

Con respecto a los estudios de actividad biológica de *H. inuloides*, a la fecha se han reportado sesquiterpenoides con actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas, lo que también va muy de acuerdo con su uso antiséptico (Kubo, et al., 1993). También se han reportado propiedades antioxidantes (Haraguchi, et al., 1996; Kubo, et al., 1996; Haraguchi, et al., 1997). En extractos de flores (acuosos y con diclorometano) probados en modelos *in vivo*, se demostró actividad antiinflamatoria y analgésica (Gene, et al., 1998; Segura, et al., 2000).

### 2.1.3 Planteamiento del Problema

Una de las plantas conocidas comúnmente como “ámica” en el estado de Nuevo León, es la *Carlwrightia cordifolia* A. Gray, familia *Acanthaceae* la que es utilizada con fines curativos, principalmente como anti-inflamatorio y antiséptico. Sin embargo, a pesar de su uso popular en la región, inclusive dentro de la medicina homeopática, no se tienen antecedentes en las recopilaciones herbolarias ni existen antecedentes científicos, que corroboren su utilización. Recientemente fue identificada por personal del Herbario IMSSM y se registro bajo el número de voucher 11710. (Figura 1).



**FIGURA 1**

*Carlwrightia cordifolia*, una de las plantas utilizadas como árnica en la región del norte.

#### 2.1.4 Clasificación botánica de la *Carlownrightia cordifolia*.

Reino: Plantae vegetal

División: spermatophyta

Clase: angiospermae

Subclase: dicotiledoneae

Orden: tubiflorae

Suborden: acanthinae

Familia: *Acanthaceae*

Género: *Carlownrightia*

Especie: *C. cordifolia*

### 2.1.5 Antecedentes de la familia *Acanthaceae*.

En la literatura se tienen reportes de estudios científicos efectuados a plantas correspondientes a esta familia, como es el caso de estudios realizados a 103 agentes antineoplásicos de África del Este, donde como resultado de éstos se encontró en arbustos *Hypoestes verticillaris* dos alcaloides. Los que fueron aislados e identificados como: fenantro-indolizidina e hipolestestatin, compuestos que probaron tener una fuerte inhibición en el crecimiento de la línea P-388 (leucemia linfocítica murina) con una dosis efectiva (ED) de 10 µg/ml (Pettit, et al., 1984).

Estudios realizados sobre otras especies de esta familia, como *Justicia spicigera* (muicle) se reporta que extractos etanólicos utilizados en experimentos *in vitro* con *Giardia lamblia*, presentan actividad microbicida, resultando más activos que el control (tinidazol), siendo este control, el medicamento de elección comúnmente en estos casos (Ponce-Macotela, et al., 1994).

En *Ruellia praetermissa*, se efectuaron estudios sobre fragmentos de ileum aislado, en los cuales se encontró actividad contráctil, se probaron extractos metanólico, acuoso y etil-acetato resultando con actividad los tres.

Sugiriendo que los compuestos luteolin y apigenin pueden ser los responsables de esta actividad (Salah, et al., 2000).

*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees., es una planta utilizada en medicina natural como antiinflamatorio, conocida como "el rey de los amargos". De ésta planta, se obtuvo el compuesto andrografólido, el cual es una lactona diterpenoide (Shen, et al., 2000), y se le atribuye la habilidad, para prevenir la producción de especies de oxígeno reactivo, compuestos inducidos por el acetato de forbol miristato (PMA), así como la inhibición de adhesión de los neutrófilos (Basak, et al., 1999). Se efectuaron también, estudios de toxicidad subcrónica, con la utilización de dichos extractos, reportando estudios negativos de efectos tóxicos testiculares en ratas (Burgos, et al., 1997). En otros estudios en animales de experimentación se encontró actividad inmunoestimuladora como efecto, tanto del extracto etanólico, como del compuesto aislado de dicho extracto (diterpeno andrografólido), debido a que induce estimulación significativa de anticuerpos y respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH), también se encontró que estimula la respuesta inmune no específica en animales (Puri, et al., 1993).

De la planta "Heine" (*Astercantha auriculata* Nees,) utilizada en medicina indígena para tratamientos hepáticos, se probaron los extractos metanólicos de semillas, para estudiar el efecto antihepatotóxico. Utilizando un modelo de toxicidad, inducido por dosis de los medicamentos paracetamol y tioacetamida, los resultados mostraron una significativa actividad hepatoprotectora, como

efecto de dicho extracto, esto se realizó monitoreando varias funciones hepáticas, (Singh, et al., 1995).

### 2.1.6 Originalidad y Justificación

La *Carlownrightia cordifolia* A. Gray es una planta anual, que crece en forma silvestre, durante los meses de mayo a agosto, en terrenos semiáridos del estado de Nuevo León principalmente. Al igual que muchas otras plantas medicinales, a pesar de su uso difundido en la medicina herbolaria, no se tienen estudios fitoquímicos, ni farmacológicos que puedan confirmar su valor terapéutico.

Se sabe que los macrófagos juegan un papel importante tanto en los procesos inflamatorios, como microbicidas (Abbas, et al., 1991) y siendo una de sus principales armas para esta última actividad la producción de NO, compuesto implicado en la inflamación ya que desencadena una serie de eventos llevan que a la producción de prostaglandinas las cuales son responsables de los eventos de inflamación, dolor y enrojecimiento en el caso de traumatismos y que actualmente, se conoce que tiene también efectos antiinflamatorios ya que en concentraciones elevadas bloquea la activación del factor NF-kB (Abbas , et al., 1991; Yim, et al., 1993; Hibbs, et al., 1987;.Peng, et al., 1998).

Considerando que los macrófagos y su producción de NO juegan un papel importante en la inflamación y que se desconoce el mecanismo por el cual *Carlwrightia cordifolia*, actúa en este proceso, se planteó la posibilidad de demostrar un efecto sobre los macrófagos.

Por otro lado, a pesar de los grandes avances en medicina, las enfermedades por parásitos protozoarios sigue siendo un problema de salud. Y aunque actualmente se cuenta con fármacos que en la mayoría de los casos resultan eficientes; estos presentan diversos grados de toxicidad. Debido a esto se continua la búsqueda de nuevos antiamélicos mas potentes y menos tóxicos. En nuestro país se ha detectado mas de 100 plantas utilizadas como antiamélicos o antidiarreicos (Aguilar, *et al.*, 1994). Por lo que resulta importante, probar toda planta de la que se tenga sospecha, de que sintetice compuestos con actividad antiparasitaria.

Aunado a esto, se encuentra también el hecho de que el tratamiento con antibióticos ha dado lugar a modificaciones genéticas de la microflora patógena, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de dichos fármacos ha favorecido la aparición de cepas multi-drogoresistentes. Esta realidad remarca la necesidad de encontrar nuevos fármacos con actividad antibiótica (Ríos, 1998). Considerando el uso antiséptico de *C. cordifolia*, es posible que también presente compuestos con actividad antimicrobiana.

## 2.2 Hipótesis

Es posible que la *Carlwrightia cordifolia* A. Gray., sintetice compuestos con efecto activador sobre macrófagos y/o actividad antimicrobiana.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 General

Caracterización parcial del o los principios activos responsables de la actividad estimuladora sobre macrófagos y/o actividad antimicrobiana en los extractos de hoja, tallo y raíz de *Carlwrightia cordifolia*.

### 2.3.2 Específicos

1. Obtención de extractos etanólicos a partir de material fresco de hoja, tallo, y raíz de *Carlownrightia cordifolia* utilizando el método de maceración y determinar el efecto activador en cultivos de macrófagos peritoneales de ratón.
2. Obtención de extractos hexánico y metanólico a partir de material seco de hoja, tallo, y raíz de *Carlownrightia cordifolia* utilizando el método de extracción por reflujo continuo y determinar el efecto activador en cultivos de macrófagos peritoneales de ratón.
3. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de difusión en placa y monitoreo del compuesto activo por la técnica de bioautografía en los extractos obtenidos.
4. Determinación de actividad antiprotozoaria de los extractos obtenidos.
5. Caracterizar parcialmente los principios activos de los extractos donde se detecte la actividad, realizando investigación por medio de reacciones químicas de identificación de grupos funcionales y cromatografía en capa delgada.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Origen de los reactivos, material y equipo.**

Los solventes utilizados en las extracciones se obtuvieron de Productos Monterrey (México), el medio RPMI-1640 y el LPS de Sigma Chemical Co. (Saint Louis Missouri, USA), el tioglicolato y Silica Gel 7G de Merck (México), el suero fetal bovino fue obtenido y esterilizado en nuestro laboratorio, otros reactivos utilizados fueron de J.T. Baker (México).

Incubadora de CO<sub>2</sub> (National, USA), Microscopio invertido Mod. "D"· Carl Zeiss), Microscopio compuesto (Carl Zeiss), Lector de microplacas EIA multiwell reader (Sigma, USA), Centrífuga refrigerada (Damon/IEC, USA) B20, rotor 11/79 y 289, placas de calentamiento (CORNING, USA) PC-320. Hemocitómetro (American Optical Scientific Instruments Div. USA), material de disección, microplacas de poliestireno de fondo plano con 96 pozos (Sigma, USA),

### 3.2 Material vegetal

Las muestras de hoja, tallo y raíz de *C. cordifolia* (70 cm de altura y en floración), fueron colectadas durante el mes de Julio, en la zona suburbana de la ciudad de Monterrey, N.L., de las muestras colectadas se envió un ejemplar al Herbario IMSSM para su certificación y extender el voucher correspondiente así como al Herbario de la UANL para su depósito.

Del material colectado se separaron en tres tipos de muestras: hoja, raíz y tallo, se secaron a temperatura ambiente, y se molieron. De cada una de la muestra se obtuvieron extractos acuoso, etanólico, metanólico y hexánico.

### 3.3 Material Biológico

Cepas bacterianas y levaduriformes.

Las cepas bacterianas utilizadas (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Salmonella sp*), y Levaduriformes (*Candida albicans*), se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), las cuales se presentan en la Tabla 2.

Los microorganismos se mantuvieron en refrigeración a 4 °C en medios sólidos. Se utilizó el medio sólido C. Rivas (glucosa, peptona de colágena, extracto de levadura y agar) (Rivas, 1998; Velásquez, 1997), preparándose con 8.5 g en 100 ml de agua destilada, se esterilizó en autoclave y se vació a cajas de Petri en volúmenes de 20 ml.

Para la activación de los mismos se utilizó el medio caldo C. Rivas (glucosa, peptona de colágena y extracto de levadura), preparándose 8.5 g en 100 ml, y se vació a tubos de ensaye 18 X 150 mm con tapón de rosca en volúmenes de 5 ml y se esterilizaron en autoclave. Se inocularon con las diferentes cepas en estudio con una asada a cada tubo previamente identificado. Se incubaron de 12-18 h a 37 °C.

En el caso de la cepa levaduriforme se utilizó medio caldo C. Rivas (Saboraud modificado) dándoles un tiempo de incubación de 2 días para las cepas levaduriformes.

## TABLA 2

Lista de cepas bacterianas y levaduriformes utilizadas

BACTERIAS	LEVADURA
<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Bacillus cereus</i>	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Salmonella sp</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

### Cepa de Protozoarios

Se utilizó la cepa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS, Las amibas se mantuvieron en condiciones axénicas, en medio PEHPS (Said-Fernández, et al., 1988), a 37 °C, con subcultivos cada 4 días.

## Macrófagos peritoneales de ratón.

Obtención: Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN). La obtención de los macrófagos peritoneales se realizó mediante la inoculación intraperitoneal de 2 ml de caldo tioglicolato al 2 % en amortiguador de fosfatos salino (PBS). Cuatro días después se recuperaron los macrófagos mediante lavado de la cavidad peritoneal con 10 ml de medio RPMI-1640. El volumen recuperado del lavado se depositó en un tubo cónico de polietileno estéril con tapón de rosca. La suspensión celular, se centrifugó 15 minutos a 450 x g a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado conteniendo los macrófagos, se resuspendió en 1ml de medio, se tomó una muestra para determinar viabilidad con solución de azul de tripano, y posteriormente se determinó el número de macrófagos por ml con un hemocitómetro. Los macrófagos se cultivaron en microplacas de 96 pozos, colocando 200 µl por pozo con  $2 \times 10^5$  cel, e incubando a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h, después de este tiempo en condiciones asépticas, se eliminó el medio de cultivo utilizando vacío y se adicionaron nuevamente 200 µl de medio RPMI complementado con 10 % de suero fetal bovino.

## 3.4 Preparación de extractos

### Extracto acuoso

A 1 l de agua en ebullición se agregaron 40 g de las muestras por analizar cada una en forma independiente e inmediatamente se retiró del fuego. Esta solución se dejó en reposo hasta que la infusión alcanzó la temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró a través de un lienzo de algodón y se esterilizó por filtración, utilizando membrana de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , con esta solución se prepararon las diluciones necesarias para las diferentes pruebas utilizando PBS estéril.

### Extracto Etanólico

Muestras de corteza, tallo y hoja se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 0.5 cm, de éste material se pesaron 60 g y se maceraron con 60 g de etanol (76.4 ml) hasta obtener una pasta. El material se dejó reposar por una semana en un frasco oscuro. Posteriormente se filtró por presión mecánica a través de un lienzo de algodón crudo. Se esterilizó por filtración, utilizando membrana de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , con esta

solución se prepararon las diluciones necesarias para las diferentes pruebas utilizando PBS estéril.

### Extracto Hexánico.

Muestras de la corteza, tallo y hoja, se llevaron a pequeños pedazos de aproximadamente 0.5 cm y se molieron, se pesaron 60 g y se pusieron con 700 ml de hexano en un sistema de reflujo continuo utilizando de soxhlet por 7 días. El extracto resultante se evaporó a sequedad en un rotavapor. Para las prueba biológicas el extracto obtenido fue resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO), se esterilizó por filtración utilizando membrana de acetato de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se realizaron las diluciones necesarias en cada prueba biológica con PBS estéril.

### Extracto Metanólico

Las muestras residuales de la corteza, tallo y hoja de la extracción por hexano se pusieron con 700 ml de metanol bajo reflujo en soxhlet por 7 días. El extracto resultante se evaporó a sequedad en un rotavapor. Para las pruebas biológicas se resuspendió en etanol, se esterilizó por filtración utilizando membrana de acetato de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se realizaron las diluciones utilizadas en cada prueba biológica con solución PBS estéril.

## 3.5 BIOENSAYOS

### 3.5.1 Activación de macrófagos:

Para activar a los macrófagos en cultivo se utilizaron: Lipopolisacáridos (LPS) 25 µg/ 1 x 10<sup>6</sup> (1µg/ml) los cuales se agregaron a las 24 h, directamente a la microplaca, conteniendo un volumen de 200 µl de medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal bovino con 2 x 10<sup>5</sup> cel. Esta prueba se utilizó como control positivo en todos los ensayos. Como control negativo se utilizó PBS, o en su caso los solventes diluidos en PBS de acuerdo a las soluciones preparadas de los extractos. La producción de NO se cuantificó a las 48 h, por la técnica de Griess.

### 3.5.2 Determinación de la producción de NO como efecto de los extractos sobre macrófagos peritoneales de ratón.

#### Cultivo de macrófagos no estimulados con LPS.

Al cultivo de macrófagos obtenidos 24 h después, se adicionaron 10 µl de las diluciones 1:10 de cada uno de los extractos previamente esterilizados por

filtración. La producción de NO se determinó, a las 48h después de adicionar los extractos, utilizando la técnica de Griess.

### **Cultivo de macrófagos estimulados previamente con LPS**

Al cultivo de macrófagos obtenidos 24 h después, se adicionaron Lipopolisacáridos 1 µg/ml y a las siguientes 24 h se adicionaron 10 µl de las diluciones 1:10 de cada uno de los extractos previamente esterilizados por filtración. La producción de NO se determinó, a las 24 h después de adicionar los extractos, utilizando la técnica de Griess

#### **3.5.3 Determinación de NO por el método de Griess**

La concentración de NO se cuantificó de manera indirecta por la determinación de nitritos en el medio de los macrófagos en cultivo, por el método colorimétrico de Griess (Stuehr et al., 1989, Mauerl et al., 1991). Se tomaron 100 µl del medio sobrenadante de los macrófagos cultivados y se le agregaron 50 µl del reactivo A de Griess (di-hidro-cloruro de Naftil-etilendiamino al 0.1 %) mas 50 µl del reactivo B (sulfanilamida al 1 % en ácido fosfórico al 2.5 %), se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la lectura de densidad óptica, en un lector para microplacas (ELISA)

a una longitud de onda de 545 nm. Como estándar se utilizó una curva, utilizando una solución de nitrato de sodio, en concentraciones de 0.244 a 125  $\mu$ M. La concentración de nitritos se obtuvo por extrapolación en la curva estándar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 3.5.4 Determinación de actividad antimicrobiana

#### Método de Difusión en Placa

Se utilizó el método de difusión en placa (Koneman, et al., 1989), utilizando discos de papel filtro Whatman No. 1 estériles, a los cuales se les adicionan 50  $\mu$ l de los extractos a probar así como cada uno de los solventes utilizados, sobre placas sólidas de medio de cultivo previamente inoculados con 100  $\mu$ l de una suspensión  $1 \times 10^{-6}$  del microorganismo de prueba. Se incubó a 37 °C por 24 h, después de este periodo se midieron los halos de inhibición en mm para cada prueba. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y en condiciones de esterilidad.

Los extractos que presentaron mayor actividad microbiana se utilizaron en las pruebas cromatográficas y químicas para la separación e identificación parcial de las fracciones activas.

## Localización por bioautografía

Para la localización del compuesto activo se realizó esta metodología la cual se apoya en los métodos de difusión y cromatografía. Esta técnica es adecuada para localizar el compuesto responsable de la actividad biológica, cuando se estudia un extracto crudo que tiene una mezcla de compuestos muy abundante (Hamburger, et al., 1987).

En este estudio, se utilizó el método de Hamburger modificado (Verastegui, 1998), utilizando placas cromatográficas de sílica G con dimensiones de 2.5 x 7.5 cm, previamente corridas con los extractos en los sistemas de solventes adecuados para la mejor separación y esterilizadas con luz ultravioleta. Dichas placas se colocaron en cajas de Petri, sobre de estas, se colocó una tira de medio sólido C. Rivas de 1x 6 cm, con un espesor aprox. de 0.3 mm.

Posteriormente se añadieron 150  $\mu$ l de la dilución  $1 \times 10^{-6}$  UFC del microorganismo de prueba sobre la tira de agar y se distribuyó homogéneamente. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de una caja de petri un fragmento de algodón húmedo con 4-5 ml de

agua estéril. Como control negativo se utilizó un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero separado de la placa cromatográfica.

Se incubaron 24 h a 37 °C. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente facilitando así el aislamiento y la identificación del compuesto responsable del efecto antimicrobiano.

### 3.5.5 Determinación de actividad anti*Amibiana*

Se utilizó la cepa de *E. histolytica* HM-1:IMSS, los trofozoitos se mantuvieron en condiciones axénicas en medio PEPHS, mantenidos en cultivo y resemebrados cada 96 horas.

Se prepararon tubos de vidrio con tapón de rosca, conteniendo 5.5 ml de medio PEPHS y se inocularon con  $5.5 \times 10^3$  cel. Posteriormente se adicionaron 50 µl de cada una de las diluciones (0.05 - 100.00 µl) de los extractos preparados, así como controles preparados con únicamente los solventes utilizados en los extractos, todos se realizaron por triplicado. Se incubaron a 37 °C por 72 h.

Los trofozoitos fueron separados por enfriamiento durante 10 min en agua hielo, y fue calculado el número de trofozoitos/ml de cada uno de los tubos, utilizando un hemocitómetro y fue calculado el porcentaje de inhibición de crecimiento en los cultivos tratados con respecto al control no tratado (González-Garza, et al., 1988).

### 3.6 Métodos de Identificación

#### 3.6.1 Pruebas químicas

##### Oxidrilos fenólicos

Prueba de cloruro férrico: Se disolvieron 2 mg de la muestra en 1 ml de agua o etanol, después se le añadieron unas gotas de cloruro férrico al 12.5% en agua; la aparición de un precipitado rojo, azul violeta o verde se consideró positivo.

##### Esteroides y Triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard: Se disolvió una pequeña muestra en cloroformo para añadir el reactivo que se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico en una mezcla de anhídrido acético con 1 ml de cloroformo; la

aparición de cualquier color en el lapso de 1 hora indicó que la prueba resultó positiva.

### Coumarinas

Se disolvieron 2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba fue positiva.

### Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: Se utilizaron dos soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse. Solución A: 1g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; solución B: 10 g de NaOH en 100 ml de agua. Para la prueba se pusieron 3 mg del compuesto a estudiar y 4 gotas del reactivo, siendo positiva al producirse una coloración naranja o roja oscura.

### Flavonoides

Prueba de Shinoda: La muestra disuelta en etanol, se trató con limaduras de magnesio, se aplicó calor (60°C) y se agregaron unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, la prueba se consideró positiva al presentar colores naranja, rojo, rosa-azul y violeta.

Prueba de Salkowski: una pequeña cantidad de muestra se disolvió en ácido sulfúrico concentrado y si la prueba fue positiva para flavonas y flavonoles se observaron coloraciones amarillo; naranja-guinda para flavonas y rojo-azuloso para chalconas; y si presentaron coloración roja- púrpura indicó la presencia de quinonas.

### Grupos carbonilo

Prueba de 2,4- dinitrofenilhidracina: en un tubo de ensaye se disolvió 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente. Se agregaron 50 mg del compuesto carbonílico y se calentaron en baño maría por 15 minutos; se dejaron en reposo y se enfriaron en baño de hielo, la aparición de un precipitado indicó la presencia de grupos carbonilo.

### Alcaloides

Prueba de Dragendorff: el reactivo que se utilizó consta de dos soluciones: solución A, 5 ml de subnitrato de bismuto al 1.6 % en ácido acético al 20 %. La solución B, se preparó mezclando 5 ml de yoduro de potasio al 40 % y 20 ml de ácido acético aforando a 100 ml con agua destilada.

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en etanol y se colocaron unas gotas en una placa de porcelana, luego se le añadió unas gotas del reactivo de

Dragendorff; la prueba se consideró positiva al aparecer un precipitado naranja marrón.

### Identificación de Lactonas

Prueba de Shinoda: A la muestra disuelta en etanol se agregaron 4 gotas de NaOH al 10%. Un color amarillo que se desaparece al agregar 3 o 4 gotas de ac. sulfúrico fue positivo.

### Azúcares

Prueba de Molisch: en un tubo de ensaye se colocó la muestra, se añadieron 3 gotas del reactivo de Molisch ( 1 g de  $\alpha$ -naftol en 100 ml de etanol al 95 %) y se agitó. Después se inclinó el tubo y depositaron por la pared 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. La prueba fue positiva al formarse un anillo coloreado en la interfase.

### 3.6.2 Cromatografía en capa delgada

Se realizaron cromatografías ascendentes utilizando como adsorbente silica gel 7G en una proporción de 10 g de silica en 40 ml de agua, la mezcla

anterior se vertió sobre placas de vidrio previamente desengrasadas, se dejaron secar al aire y enseguida se activaron en una estufa durante 1 h a 115 °C. La dimensión de las placas fueron de acuerdo a las necesidades de los ensayos como se resumen en la Tabla 3.

**TABLA 3**

**Características de las placas cromatográficas utilizadas**

Base cm	Altura cm	Espesor mm	Aplicación μl	Función
2.5	7.5	1	en punto	preliminares selección fase móvil con capilar ensayos de bioautografía
5.0	10	2	en banda 20	revelado con agentes cromogénicos
20	20	3	en banda 100	aislamiento

La fase móvil se determinó probando varias mezclas de solventes de diferente polaridad hasta encontrar el mejor desarrollo cromatográfico.

La muestra se aplicó de acuerdo al tipo de ensayo realizado, como se indican en la tabla 3 a una distancia de 1 cm del inicio de la placa, se dejó evaporar el solvente para efectuar el corrimiento dentro de una cámara de vidrio con la mezcla de solventes elegidos, hasta una distancia de aproximadamente 1 cm del extremo superior de la placa, se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente para evaporar los solventes.

### 3.6.3 Revelado en placas cromatográficas.

La observación de las fracciones separadas en las placas de cromatografía desarrolladas, se efectuó utilizando varios métodos:

- Observación con luz visible.
- Observación con luz ultravioleta (lámpara de 254-366 nm).
- Aspersión con reactivo de Liebermann-Burchard, el revelado indicó la presencia de esteroides y triterpenos, al obtenerse cualquier coloración después de transcurrida una hora.

- Aspersión con tricloruro de antimonio al 10 % en cloroformo con calentamiento a 120 °C por 10 min, El revelado con cloruro de antimonio, indicó la presencia de di y triterpenos dando coloración de roja a violeta en visible. Y observando con luz ultravioleta (365 nm) dando principalmente coloración rojo-violeta, azul y verde fluorescente.

Las bandas separadas se marcaron en la placa cromatográfica y se determinó el Rf de cada una midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada, y dividiendo el valor entre la distancia del punto de aplicación y el frente del eluyente (Harris, 1992).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Extractos Obtenidos

Se obtuvieron los extractos de cada parte de la planta en estudio: tallo, hoja y raíz utilizando diferentes metodologías:

- a) Infusión: (acuoso)
- b) Maceración (etanólico)
- c) Extracción continua con solventes de polaridad creciente (hexánico y metanólico)

Con los extractos obtenidos se realizaron los bioensayos y pruebas de identificación.

## 4.2 Actividad estimuladora de los extractos obtenidos sobre macrófagos, en ausencia de LPS.

Los extractos que demostraron tener una actividad estimuladora sobre macrófagos con producción de NO fueron el etanólico de tallo siendo 9.85  $\mu\text{M}$ .

Los extractos de raíz que presentaron actividad fueron: el etanólico, metanólico y hexánico 47.1, 21.7, 25.2  $\mu\text{M}$  respectivamente.

En los extractos de hoja el acuoso y etanólico la producción de NO fue de 3.46 y 17.5  $\mu\text{M}$ ; mientras que con los extractos metanólicos y hexánicos se obtuvieron 92.8 y 156.6  $\mu\text{M}$ , siendo este último el más activo. Los extractos acuoso, metanólico y hexánico de tallo y acuoso de raíz no hubo producción de NO. En los controles negativos utilizados (DMSO, etanol y PBS) no hubo producción de óxido nítrico.

Como control positivo de estimulación de macrófagos se utilizó el LPS, con el que se obtuvo un valor de 6.07  $\mu\text{M}$ .

La viabilidad celular comprobada con azul tripano al 1% al final de cada experimento fue de 98 %. Por lo que no se observó efecto citotóxico en presencia de los extractos probados.

## Análisis estadístico utilizado

Los experimentos se efectuaron por triplicado, los resultados se analizaron comparando la producción de NO entre los extractos probados, contra el control utilizado (LPS), aplicando una prueba de ANOVA.

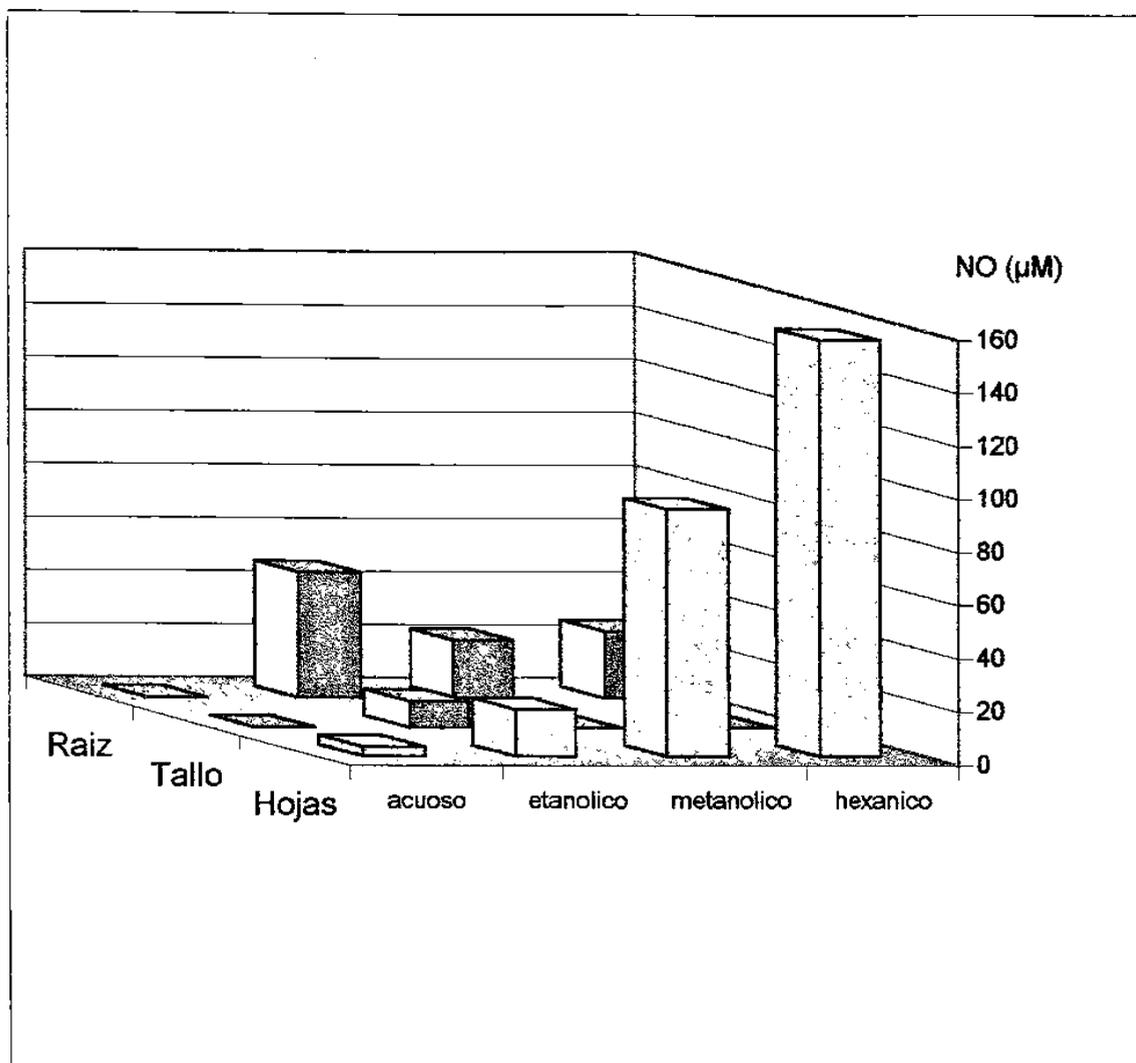
Los resultados sobre el efecto de los extractos probados se resumen en la Tabla 4 y Figura 2.

**TABLA 4**

Producción de óxido nítrico ( $\mu\text{M}$ ) por macrófagos peritoneales de ratón en presencia de extractos de *C. cordifolia*.

Extractos	NO ( $\mu\text{M}$ ) hoja	NO ( $\mu\text{M}$ ) tallo	NO ( $\mu\text{M}$ ) raíz
Acuoso	3.46	0	0
Etanólico	17.5	9.85	47.1
Metanólico	92.8*	0	21.7
Hexánico	156.6*	0	25.2
LPS	6.07		

\* $p < 0.001$



**FIGURA 2**

Grafica de la producción de NO ( $\mu\text{M}$ ) por macrófagos peritoneales de ratón, en presencia de extractos de *C. cordifolia*.

#### 4.3 Efecto de extractos de hoja de *C. cordifolia*, en la producción de NO en cultivos de macrófagos, en presencia y ausencia de LPS.

Todos los extractos de hojas mostraron efecto inhibitorio sobre las cantidades de NO liberado por los macrófagos estimulados con LPS (24.47  $\mu\text{M}$ ). Los extractos acuoso y hexánico produjeron 11.9 y 10.56  $\mu\text{M}$ , los cuales corresponden a un 51.4 y 56.9 % de inhibición respectivamente. Los extractos etanólico y metanólico incubados con los macrófagos estimulados con LPS, inhibieron completamente la producción de LPS. No se observó inhibición en los cultivos de macrófagos estimulados con LPS que se incubaron con los controles de solventes utilizados en las diluciones (etanol-PBS). Cuando los cultivos de macrófagos no estimulados con LPS fueron incubados con los extractos de hojas, se detectó NO en todos los sobrenadantes. El extracto hexánico dio la más alta concentración con un incremento de 2.25 veces más con respecto al determinado en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos estimulados con LPS.

Debido a los altos niveles encontrados de nitritos se realizaron determinaciones de nitritos en los extractos, encontrándose presencia de estos solo en el extracto hexánico (105  $\mu\text{M}$ ). Este fue considerado para el resultado final, no se determinaron nitritos en los demás extractos.

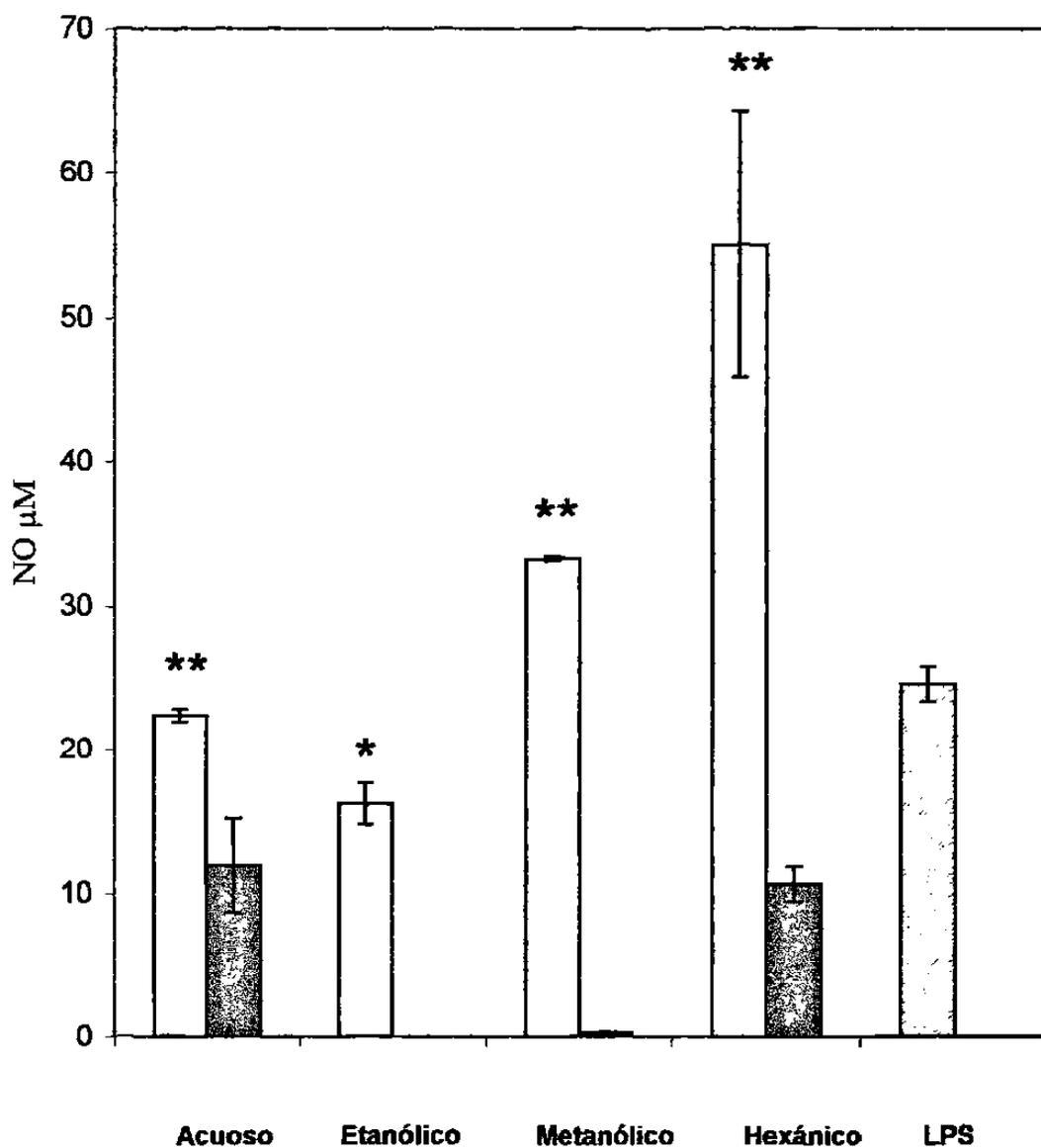
La concentración de NO en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos con los extractos metanólicos fue 1.36 veces menor que el control de LPS y con los extractos acuosos mostraron una concentración menor pero con menor inhibición (33.8 %) que el control de LPS, los resultados se presentan en la Tabla 5 y Figura 3.

**TABLA 5**

Efecto de extractos de hoja de *C. cordifolia*, en la producción de NO ( $\mu\text{M}$ ), en cultivos de macrófagos en presencia y ausencia de LPS.

Extractos de hoja	NO ( $\mu\text{M}$ ) (macrófagos s/LPS)	NO ( $\mu\text{M}$ ) (macrófagos c/LPS)
Acuoso	22.3 **	11.9
Etanólico	16.2 *	0
Metanólico	33.2 **	0.3
Hexánico	55.0 **	10.56
LPS 24.47 $\mu\text{M}$ de NO		

\*( $P < 0.02$ ), \*\*( $p < 0.001$ )



**FIGURA 3**

Efecto de extractos acuoso, etanólico, metanólico y hexánico de hoja de *C. cordifolia*, sobre la producción de NO, en cultivos de macrófagos s/LPS (□) y c/LPS (■), comparadas con los macrófagos estimulados con LPS, \* (P < 0.02), \*\* (P < 0.001).

## 4.4 Actividad antimicrobiana

### Método de difusión en placa

Los extractos de *C. cordifolia* que mostraron actividad antimicrobiana corresponden a los hexánico y metanólico de hoja. El espectro más amplio fue el del extracto hexánico al inhibir a las 6 especies bacterianas (*Salmonella sp*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, y *Escherichia coli*) y una especie fúngica (*Candida albicans*) obteniéndose la mayor inhibición del crecimiento en el caso de *Salmonella sp*. El extracto metanólico fue de menor actividad sobre: *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus cereus*; y nulo en *Escherichia coli*, los resultados se muestran en la Tabla 6.

**TABLA 6**

Resultados de la actividad antimicrobiana de extractos de hoja de *C. cordifolia*.

Microorganismos	Inhibición extracto MeOH	Inhibición Extracto Hex
<i>Salmonella sp</i>	++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	++
<i>Candida albicans</i>	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	++
<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+

Inhibición de: +++ 11-15 mm, ++ 6-10 mm, + 1-5 mm, - sin inhibición.

## Método de bioautografía

Con relación al método de bioautografía, en el cual se requiere conjuntar aspectos microbiológicos y fisicoquímicos, para realizarse se requiere primeramente tener compuestos separados por la cromatografía en capa fina. Se realizaron las bioautografías del extracto hexánico de hojas de *C. cordifolia* que presentó mayor actividad biológica, se utilizó el cromatograma desarrollado en la fase móvil: benceno:cloroformo:agua (80:10:10) que fue el que mostró mayor separación de bandas, y el microorganismos utilizado fue *Salmonella sp* con el que se obtuvo la mayor actividad (+++); Los resultados en la bioautografía fueron negativos para todas las fracciones a pesar de concentrar la muestra. Aunque este método es el mas adecuado para los casos en que la actividad es completamente inherente al compuesto separado y no cuando el resultado es indirecto por la acción de otros compuestos como podría ser este caso.

### 4.5 Actividad antiamebiana

Los extractos metanólico, hexánico y acuoso de hojas de *C. cordifolia* presentaron inhibición sobre *E. histolytica*. Los resultados de inhibición en porcentaje de los extractos acuoso y metanólico fueron muy semejantes: 50 y

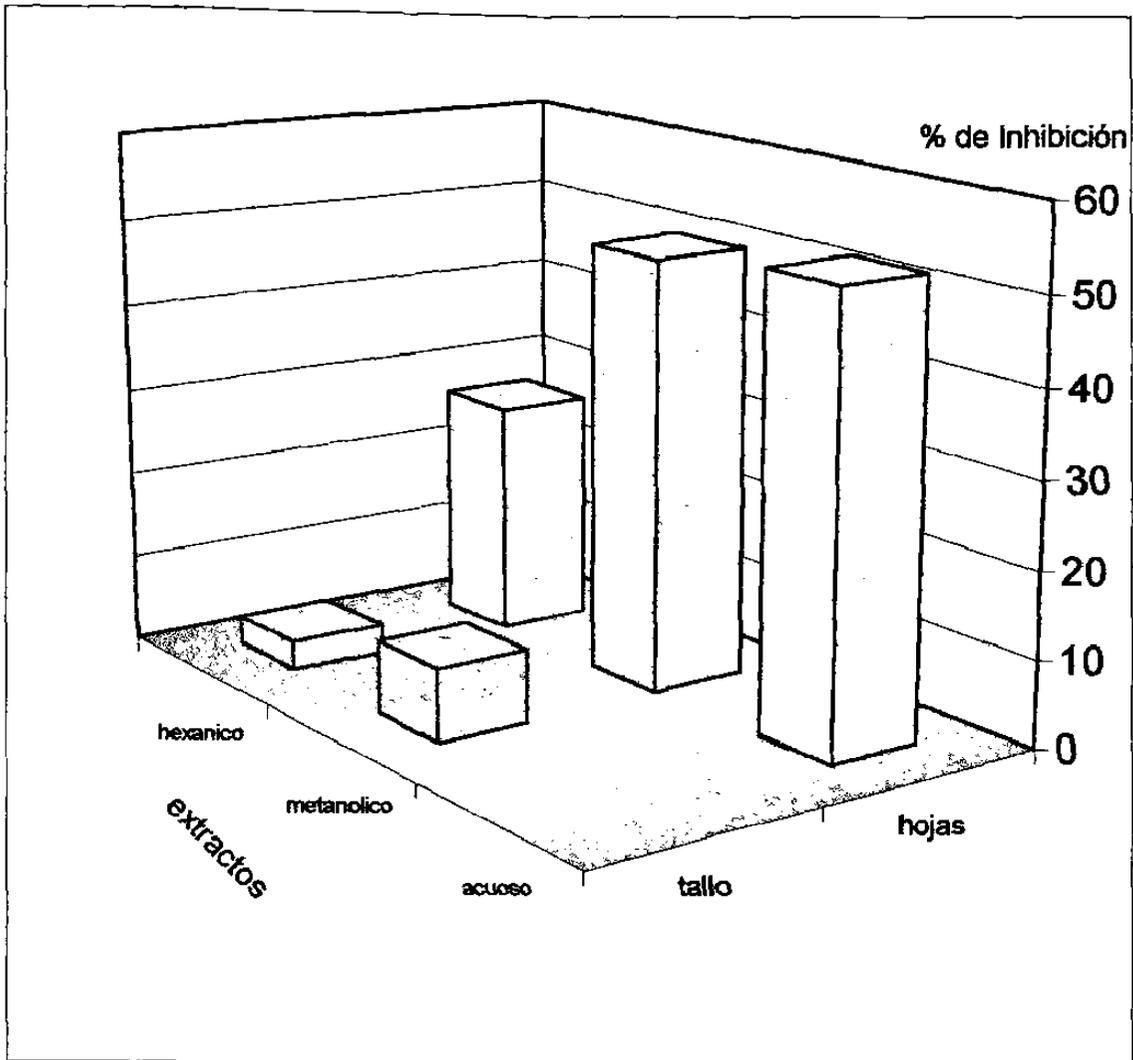
52 % respectivamente, mientras que el extracto hexánico resultó menor 27 %.

Los resultados se presentan en la Tabla 7, Figura 4.

**TABLA 7**

Resultados de porcentaje de inhibición de crecimiento de los extractos de *C.cordifolia* sobre *E. histolytica*.

Extracto	% IC hoja	% IC tallo
Hexánico	27	3.3
Metanólico	50	8.3
Acuoso	52	0



**FIGURA 4**

Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos y hexánicos hoja y tallo de *C. cordifolia*, sobre *E. histolytica*.

## 4.6 Caracterización Parcial

### Reacciones Químicas:

Para la determinación parcial de los compuestos responsables de la actividad biológica, se efectuaron reacciones químicas indicativas de la presencia de grupos funcionales y cromatografía en capa delgada.

Los resultados obtenidos de los extractos metanólico y hexánico de hoja de *C. cordifolia*, revelaron la presencia de: saponinas, esteroides, esteroides y triterpenos. Ver Tabla 8.

**TABLA 8**

Resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales de los extractos metanólico y hexánico de hoja de *C. cordifolia*.

Grupo funcional (P. Q.)	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico
Esteroides y Triterpenos (L-B)	positiva	positiva
Saponinas (Molish)	positiva	positiva
Esteroles (Salkowski)	positiva	positiva
Lactonas	negativa	negativa
Alcaloides (Dragendorff)	negativa	negativa
Flavonoides (Shinoda)	negativa	negativa
Sesquiterpenlactonas (Baljlet)	negativa	negativa
Cumarinas	negativa	negativa

## Cromatografía en Capa Delgada.

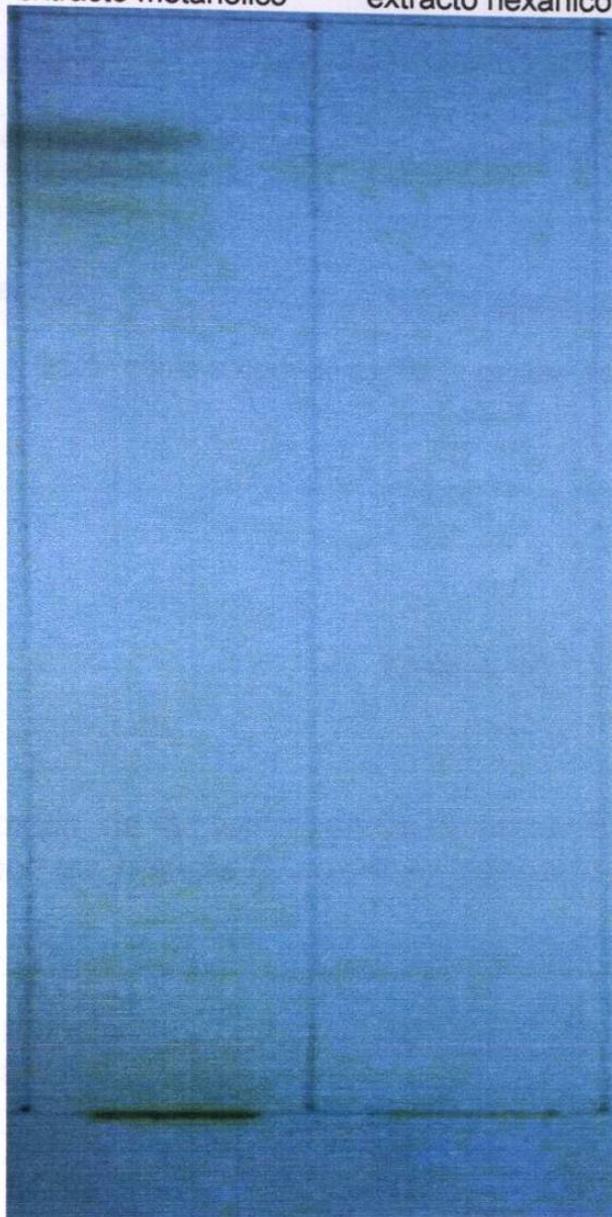
a) En la cromatografía en capa delgada (Silica – Gel 7GF), el sistema de elusión que separó mas eficientemente los extractos fue: benceno, cloroformo, agua (80:10:10). Al observar con luz visible se detectaron en el extracto metanólico dos fracciones con  $R_f$  de 0.89 y 0.92. En el extracto hexánico no se observó ninguna fracción a la luz visible. Esto se muestra en la Tabla 9, Figura 5.

**TABLA 9**

Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hoja de *C. cordifolia*, observada a la luz visible.

Fracción del extracto metanólico	$R_f$	Color luz vis
1	0.89	verde
2	0.92	verde

extracto metanólico      extracto hexánico



**FIGURA 5**

Cromatograma de los extractos hexánico y metanólico de hoja de *C. cordifolia*, observada a la luz visible

Al observar el cromatograma con luz ultravioleta, en el carril correspondiente al extracto metanólico, se percibieron nueve fracciones en el rango de Rf de 0.1 – 0.5 y 10 fracciones en el rango de 0.51-0.09. Con respecto al carril del extracto hexánico se observan 3 fracciones con Rf de 0.01, 0.34 y 0.92, como se puede apreciar en las Tablas 10 y 11, Figura 6.

**TABLA 10**

Resultados de la cromatografía en capa delgada, del extracto hexánico de hoja de *C. cordifolia*, revelado con luz ultravioleta.

Fracción Ext. Hexánico	Rf	color a la luz UV
1	0.01	azul
2	0.34	azul
3	0.92	azul fluorescente

**TABLA 11**

Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hojas de *C. cordifolia* revelado con luz UV.

Fracción extracto metanólico	Rf	Color a la luz UV
1,2,3,4	0-0.2	azul
5	0.21	rojo
6,7,8	0.22-0.5	azul
9	0.5	azul fluorescente
10, 11	0.51-0.6	rojo
12,	0.65	rojo
13,14,15,16	0.7-0.88	rojo
17	0.89	violeta
18	0.9	rojo
19	0.92	azul fluorescente

extracto hexánico

extracto metanólico



**FIGURA 6**

Cromatograma de los extractos hexánico y metanólico de hoja de *C. cordifolia*, revelada con luz ultravioleta

Se utilizaron otros reactivos para el revelado de acuerdo a los resultados de las reacciones químicas. Con el reactivo de Liebermann-Buchard, el cual detecta esteroides y triterpenos cuando se obtienen bandas de cualquier color que permanezcan después de una hora.

Las bandas positivas que se obtuvieron en el extracto metanólico, fueron 4 fracciones en el rango de Rf de 0.01 – 0.17 y dos fracciones en el rango de Rf de 0.9 – 0.93. En el extracto hexánico, se obtuvieron dos con Rf de 0.72 y 0.89, como se observa en las Tablas 12 y 13, Figura 7.

**TABLA 12**

Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto hexánico de hoja de *C. cordifolia* revelado con reactivo de Liebermann-Buchard.

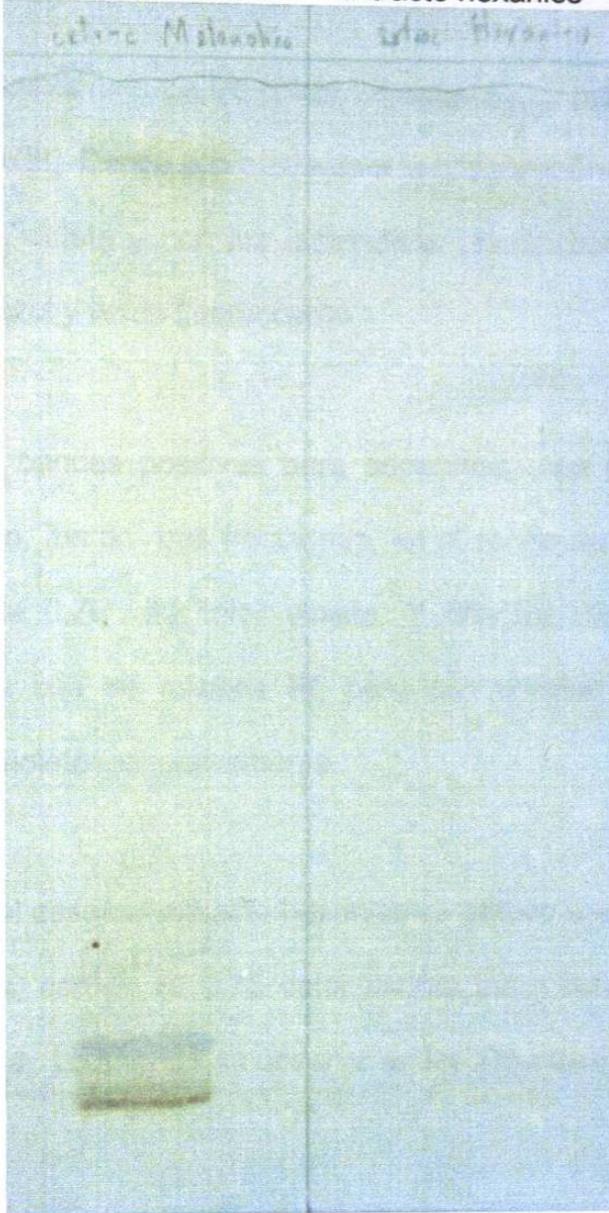
FRACCIÓN Extracto Hexánico	Rf	Color c/luz vis
1	0.72	azul
2	0.89	verde

**TABLA 13**

Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hoja de *C. cordifolia* revelado con reactivo de Liebermann-Buchard.

FRACCIÓN extracto metanólico	Rf	COLOR c/luz vis
1	0.01	verde
2	0.07	azul
3	0.1	azul
4	0.17	azul
5	0.9	verde
6	0.93	verde

extracto metanólico      extracto hexanico



**FIGURA 7**

Separación cromatográfica del extracto metanólico de hoja de *C. cordifolia* revelado con reactivo de Liebermann-Bouchard.

Utilizando uno de los reactivos específicos para saponinas el cloruro de antimonio (III). Donde son positivas a la observación de luz visible coloraciones de rojo a violeta y con luz ultravioleta principalmente coloración de rojo a violeta y azul y verde fluorescente.

Las bandas positivas para saponinas, con luz visible en el extracto metanólico, fueron tres fracciones, en el rango de Rf entre 0.1 – 0.26 y una con Rf de 0.75 de color violeta. Y con luz ultravioleta, positivas para saponinas con los mismos Rf, pero con colores: verde fluorescente, roja, violeta y violeta respectivamente.

En el caso del extracto hexánico se obtuvo una sola banda, positiva para saponinas, con un Rf 0.75 color violeta tanto con luz visible como con luz ultravioleta. Lo anterior se observa en las Figuras 8 y 9, Tablas 14 y 15.

**TABLA 14**

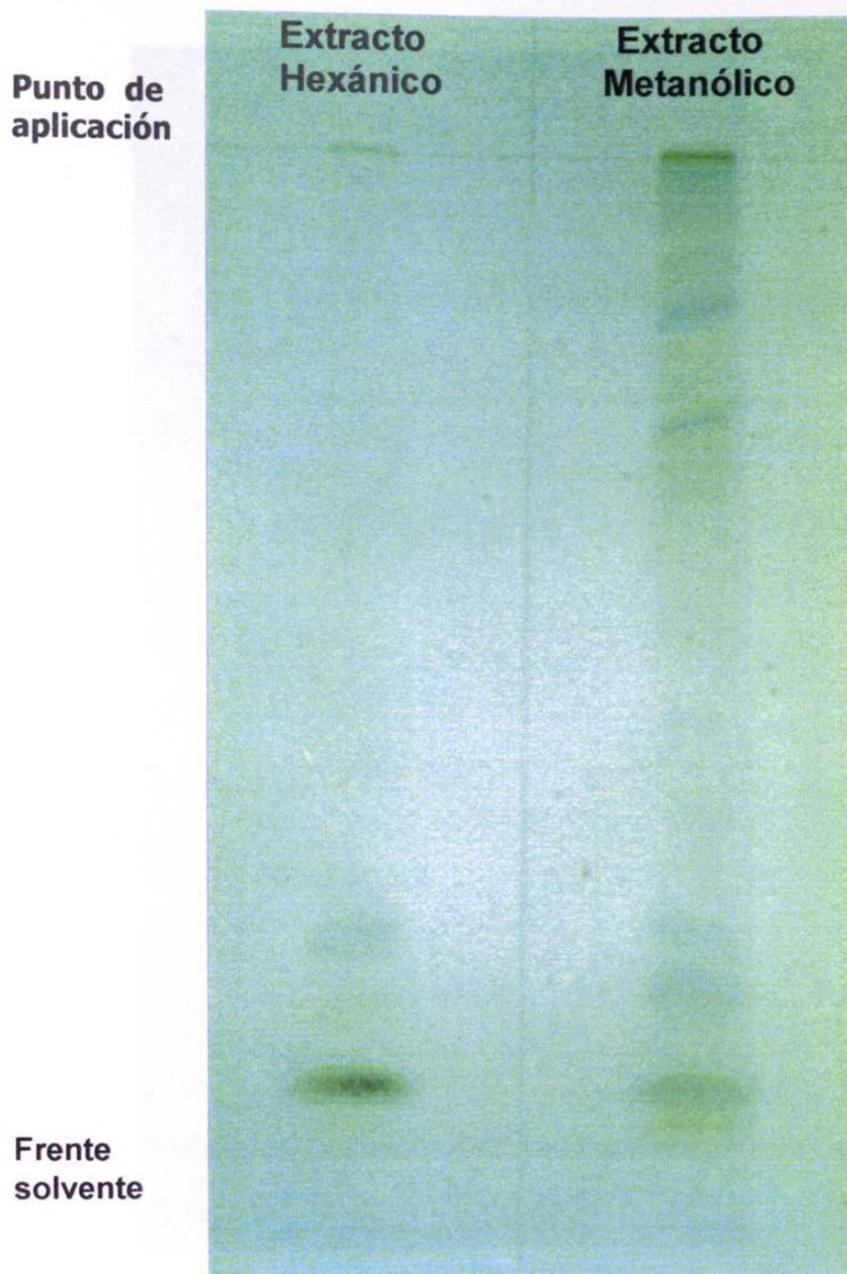
Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto metanólico de hoja de *C. cordifolia*, revelado con reactivo de cloruro de antimonio ( $\text{SbCl}_3$ )

FRACCIÓN extracto metanólico	Rf	COLOR (c/luz vis, $\text{SbCl}_3$ )	COLOR (c/luz vis, $\text{SbCl}_3$ )
1	0.1	violeta	verde fluorescente
2	0.17	violeta	roja
3	0.26	violeta	violeta
4	0.75	violeta	violeta

**TABLA 15**

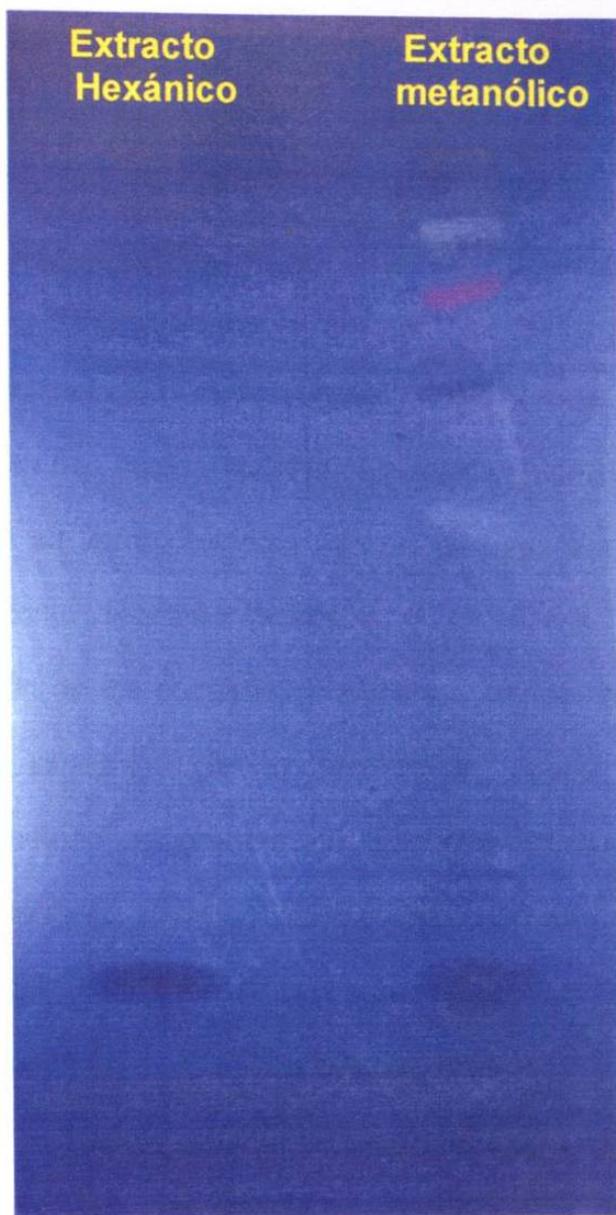
Resultados de la cromatografía en capa delgada del extracto hexánico de hoja de *C. cordifolia*, revelado con reactivo de cloruro de antimonio ( $\text{SbCl}_3$ ).

FRACCIÓN extracto metanólico	Rf	COLOR (c/luz vis, $\text{SbCl}_3$ )	COLOR (c/luz vis, $\text{SbCl}_3$ )
1	0.75	violeta	violeta



**FIGURA 8**

Cromatograma del extracto hexánico de hoja de *C. cordifolia*, revelado con reactivo de cloruro de antimonio.



**FIGURA 9**

Cromatograma de extractos hexánico y metanólico de hoja de *C.cordifolia* revelado con cloruro de antimonio y observado con luz Ultravioleta.

## 5. DISCUSIÓN

El principal objetivo del estudio de las plantas medicinales es validar la eficacia de su uso como remedios caseros tradicionales contribuyendo de esta manera con su valor científico, por lo general las plantas medicinales son utilizadas como extractos acuosos o etanólicos, donde la presencia y concentración de los compuestos activos depende de varios factores: aun en una misma especie, lugar de recolección, época del año, porcentaje de humedad, método de preparación, cantidad empleada, etc. Factores que deberán tomarse en cuenta, cuando se pretende valorar una planta utilizada en medicina tradicional. La colecta de la especie estudiada en esta trabajo se realizo siguiendo el conocimiento popular local.

Por otra parte los resultados científicos de una planta medicinal nos llevan no solo a validar su eficacia, sino en muchas ocasiones al descubrimiento de nuevos compuestos con resultados, no precisamente relacionados con los usualmente reportados en medicina tradicional.

Las técnicas de extracción diferentes a las utilizadas de la manera tradicional nos llevan a encontrar compuestos con otras actividades biológicas, donde los resultados no necesariamente son similares a las que ocurren con los procedimientos tradicionales; esto posiblemente sea debido a que se extraen diferentes compuestos dependiendo del tratamiento de la muestra.

Se han reportado inclusive, casos donde es posible encontrar efectos opuestos como en el extracto acuoso y el metanólico de la raíz de *Spiraea prunifolia* que se ha demostrado efectos opuestos sobre la generación de NO como efecto del INF-gamma en la línea celular de macrófagos RAW 264.7; los extractos acuosos inducen la generación de NO mientras que los metanólicos lo inhiben (So, et al., 1999).

En el presente trabajo se estudio el efecto de la liberación de NO en macrófagos peritoneales murinos, por extractos de la planta *Carlowrightia cordifolia*, los cuales se prepararon utilizando por separado hojas, raíz y tallo preparados por diferentes maneras: infusión, maceración (acuoso y etanólico) y extracción por reflujo continuo con solventes de polaridad creciente (hexánico y metanólico).

De los resultados obtenidos los correspondientes a hoja fueron los que presentaron efecto en los cuatro extractos, fueron estadísticamente significativos el hexánico y metanólico en la producción de NO como efecto activador de macrófagos (156.6 y 92.8  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ),

Cuando los macrófagos fueron incubados con los extractos de hojas de *C. cordifolia*, sin estímulo de LPS, fue detectada producción de NO en todos los casos.

Los extractos hexánicos fueron los que produjeron la mayor concentración de NO, con un incremento de 2.25 veces con respecto a la determinada en los macrófagos estimulados con LPS. La concentración de NO producida por los extractos metanólicos fue 1.36 veces menor que el control de LPS.

Los extractos acuosos, inducen liberación de NO en cantidades similares al control de LPS. Los cultivos de macrófagos que se incubaron con el extracto etanólico muestran una reducción en la concentración de NO, pero con menor inhibición (33.8 %) que el control de LPS.

En los ensayos de los extractos con los macrófagos estimulados con LPS, los resultados mostraron que todos inhiben la generación de NO. Los extractos metanólico y etanólico resultaron más potentes que los extractos acuosos y hexánicos. La actividad inhibitoria detectada en el extracto etanólico muestran una actividad biológica con una aparente correlación con los atributos antiinflamatorios reportados de la planta. Los resultados obtenidos no son suficientes para confirmar que la actividad antiinflamatoria en este caso es

mediada por el NO. Sin embargo contribuyen al controversial estudio del papel del NO en los procesos inflamación-antiinflamación.

Todos los extractos probados mostraron un efecto inhibitorio sobre las cantidades liberadas de NO por los macrófagos estimulados con LPS (24.47  $\mu\text{M}$ ). Los extractos acuoso y hexánico produjeron 11.9 y 10.56  $\mu\text{M}$  los cuales corresponden a un 51.4 % y 56.9 % de inhibición respectivamente. Los extractos etanólico y metanólico inhibieron completamente la producción de NO en cultivo de macrófagos estimulados con LPS.

Por otro lado el incremento de la concentración de NO observada en macrófagos no estimulados con LPS, podría ser relativo a los atributos regulatorios de retroalimentación del NO en el proceso inflamatorio (Peng, et al., 1998).

Se comprobó un efecto activador en macrófagos con producción de NO tanto en los extractos hexánicos como en los metanólicos de hoja, pero no en tallos y raíz, lo que podría contribuir a los efectos antiinflamatorios atribuidos a *C. cordifolia*, donde principalmente se utilizan las hojas.

Esto es, considerando los efectos autorreguladores de la inflamación que ejerce el aumento de la concentración de NO, ya que se sabe que el aumento de la concentración de NO inhibe al factor N-KAPPA el cual es responsable de la transcripción de la enzima iNOS y el receptor de membrana

VCAM1, por incremento en la expresión y traslocación de su inhibidor I $\kappa$ -B ambos directamente responsables de que se mantenga el proceso inflamatorio (Spiecker, et al., 1997).

Este incremento de concentración de NO liberado en macrófagos no estimulados-LPS, podría ser resultado a los atributos regulatorios de retroalimentación en procesos de inflamación (Peng, et al., 1998; Colasanti and Persichini, 2000). Esto va de acuerdo con los efectos inhibitorios de donadores exógenos de NO sobre la producción de citoquinas inflamatorias tales como IL-1 y MIP-1alfa en macrófagos alveolares humanos (So, et al., 1999). También se ha demostrado *in vivo* que el NO exógeno atenúa la interacción leucocito-endotelial.

En la medicina tradicional muchas plantas han sido usadas por sus propiedades antiinflamatorias, la investigación del mecanismo de acción de los procesos inflamatorios han mostrado que ellos pueden inhibir la generación e NO (Karaca, et al., 1995) o ser capaz de inhibir la producción de iNOS al nivel de genes (Kang, et al., 1999), la expresión del RNAm para producción de iNOS y/o inhibición de NF- $\kappa$ B (Bork, et al., 1997; Hehne, et al., 1998; Guido, et al., 1998; Lys, et al., 1999; Wong, et al., 1999). La utilización de plantas medicinales para combatir problemas inflamatorios se ha incrementado. De ahí que sea importante tratar de esclarecer su posible modo de acción para evaluar los efectos farmacológicos y su posible efecto en este uso.

Por lo que se infiere que el método de extracción por reflujo continuo (no convencional) que se utilizó fue más eficiente, en los resultados de las pruebas de identificación química que se efectuaron fueron positivas para saponinas, triterpenos, esteroides y azúcares. Las saponinas utilizadas en drogas oficiales son principalmente derivados triterpénicos, con una pequeña cantidad de esteroides. Su característica hemolítica varía dependiendo del tipo de sustitución. Las saponinas triterpénicas poseen un sistema de anillo que pueden ser ácidos debido a la presencia de uno o dos grupos carboxílicos y /o un grupo carbohidrato, el cual contiene unidades de 1-6 monosacáridos siendo los más comunes glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, fucosa, xilosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico. Por otra parte las saponinas esteroidales son principalmente derivados del furostanol (bidesmosido), los cuales no presentan grupos carboxílicos y poseen pocas unidades de azúcares, y no presentan actividad hemolítica. Por lo que se propone que los extractos metanólicos y hexánico de *C. cordifolia* podrían presentar una mezcla de saponinas (Wagner, et al., 1983) que pueden ser las responsables de la actividad antiinflamatoria de la planta.

Con relación a los resultados obtenidos en la actividad antibacteriana que se presenta en la tabla 6, apoyan el uso popular de esta planta como antiséptica.

En cuanto a los resultados de inhibición de crecimiento de *E. histolytica* de los extractos metanólico y acuoso de hoja, presentados en la tabla 7, dan pauta para investigar mas a fondo, con el objeto de obtener el compuesto o compuestos responsables de esta actividad, así como recomendable estudiar el efecto de estos extractos en otros protozoarios amitocondriate como *Trichomonas vaginalis* y *Gardia lamblia*, también causantes en la actualidad de problemas de salud pública.

Es necesario realizar mas investigaciones utilizando animales de experimentación para comprobar su efectividad *in vivo* y llegar a la caracterización final y purificación del compuesto responsable con el propósito de identificar y proponer una droga nueva, que podría ser más poderosa y menos tóxica.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 CONCLUSIONES

- 1) La actividad antiinflamatoria de *C. cordifolia*, puede ser justificada, por la estimulación de macrófagos con producción de NO.
- 2) La mejor actividad biológica se encontró en hojas, lo que coincide con su utilización en medicina tradicional.
- 3) Los extractos de hoja de *C. cordifolia* en las pruebas químicas y cromatográficas utilizadas, dieron positivos para saponinas, compuestos que pueden ser responsables de la actividad inmunoestimulante.
- 4) El extracto hexánico de hoja de *C. cordifolia*, presentó actividad antimicrobiana sobre todos los microorganismos probados, y fue relevante sobre *Salmonella. sp* y *Candida albicans*.
- 5) El extracto acuoso y metanólico de hoja de *C. cordifolia*, presentaron actividad antiamebiana sobre *Entamoeba histolytica*, lo que plantea la presencia de algún compuesto con actividad antiparasitaria.

## 6.2 RECOMENDACIONES

- 1) Aislar caracterizar los compuestos activos responsables de las actividades encontradas.
- 2) Efectuar estudios con los compuestos activos sobre la inhibición de activación del factor nuclear kappa B.
- 3) Estudiar otras especies mexicanas correspondientes a la familia *Acanthacea*, para buscar el mismo efecto biológico presentado con la *Carlownrightia cordifolia*.
- 4) Implementar método de micro propagación de la planta estudiada.

## REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. W B Saunders Company. USA 1991; 336,347.
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. Méx 1994.
- Baillargeon L, Drouin J, Desjardins L, Leroux D, Audet D. The effects of *Arnica montana* on blood coagulation. Randomized controlled trial. Can Farm Physician 1993; 39:2362.
- Basak A, Cooper S, Roberge AG, Banik UK, Chretien M, Seidah NG. Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. Biochem J 1999; 15:338(Pt 1):107-13.
- Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. FEBS Letters 1997: 85-90.
- Burgos RA, Caballero EE, Sanchez NS, Schroeder RA, Wikman GK, Hancke JL. Testicular toxicity assessment of *Andrographis paniculata* dried extract in rats. J Ethnopharmacol 1997; 58(3):219-24.
- Calixto JB. Fitofarmacos Brasil. Ciencia Hoje 1996; 21(123):26-30.

- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33(2):179-190.
- Colasanti M and Persichini T. Nitric oxide: An inhibitor of NF- $\kappa$ B/Rel system in glial cell. *Brain Research Bulletin* 2000; 52(3):155-161.
- Da-Silva SA Costa SS, Rossi-Bergmann B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric intermediates . *Parasitology* 1999; 18: 575-582.
- Delgado G, Olivares MS, Chávez MI, Ramírez-Apan T, Linares E, Bye R, Espinosa-Garcia FG. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J Nat Prod* 2001; 64(7):861-4.
- Díaz JL. *Uso de Plantas Medicinales de México*. Ed IMEPLAM A.C. 1976.
- Farnsworth N, Soejarto D. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany* 1985; 39: 231-240.
- Gene RM, Segura L, Adzet T, Marin E, Iglesias J. *Heterotheca inuloides*: anti-inflammatory and analgesic effect. *J Ethnopharmacol* 1998; 60(2):157-62.
- Gruenwald J. The market situation and marketing of herbal medicinal products in Europe. In: *Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare*, 1997; 2:33.

- Guido LyB, Alexander Knorre, Thomas J. Schmidt, Heike L. Pahl, and Irmgard Merfort. The Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactone Helenalin Inhibits the Transcription Factor NF- $\kappa$ B by Directly Targeting p65. *J. of Biological Chemistry* 1998; 273(50):33508-33516.
- González-Garza MT y Said-Fernandez S. *Entamoeba histolytica*: Potent *in vitro* antiamebic effect of gossypol. *Exp Parasitol* 1988; 66:253.
- Hamburger M.O. and Codell G.A. A Direct Bioautographic TLC Assay for compounds Possesing Antibacterial Activity *Journal of Natural Products* 1987; 50(1):19-22.
- Haraguchi H, Saito T, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo I. Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48(4):441-3.
- Haraguchi H, Ishikawa H, Sanchez Y, Ogura T, Kubo Y, Kubo I. Antioxidative constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorg Med Chem* 1997;5(5):865-71.
- Harris, C. D. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3<sup>o</sup> Edición. Grupo Editorial Iberoamérica. 1992; 690-691.
- Hehner SP, Heinrich M, Bork PM, Vogt M, Ratter F, Lehmann V, Schulze-Osthoff K, Droge W and Schmitz ML. Sesquiterpene Lactones Specifically Inhibit Activation of NF- $\kappa$ B by Preventing the Degradation of I $\kappa$ B-alfa y I $\kappa$ B-beta. *The J. of Biological Chemistry* 1998; 273 (3):1288-1298.

Hibbs JB, Tantor RR, Vavrin Z. Macrophage Cytotoxicity Role for L-arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 1987; 235:473.

Jerga C, Merfort I, Willuhn G. Flavonoid Glycosides and Other Hydrophilic Compounds from Flowers of *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 1990; 56:413-415.

Jerga C, Merfort I, Willuhn G. Flavonoid Aglycones from Flowers of *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 1990; 56:122-123.

Kang YJ, Lee YS, Lee GW, Lee DH, Ryu JC, Yun-choi HS, Chang KC. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 1999; 291:314-20.

Karaca K, Sharma JM, Nordgren R. International Journal of Immunopharmacology 1995; 17:183-8.

Knowles R, Moncada S. Nitric oxide synthesis in mammals. *Biochem J* 1994; 298:249-58.

Koneman EW, Stephen D, Allen VR, Dowell HM. Diagnostico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. 1ª edición 1989; 380-402.

Kubo I, Muroi H, Chaudhuri S, Sánchez Y, Ogura T. Antimicrobial Agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta medica* 1993; 60:218-221.

Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Ishikawa H, Haraguchi H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. *Planta Med* 1996; 62(5):427-30.

- Lee JIK, Burckart GJ. Nuclear Factor Kappa B: Important transcription Factor and Therapeutic target. *J Clin. Pharmacol* 1998; 38:981-993.
- Lyss G, Schmidt TJ, Merfort I, Pahl HL. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica. Selectively inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Cell Biochem* 1999; 74(4):606-15.
- Lozoya X. Estado Actual de las Plantas Medicinales Mexicanas. IMPELAN. México. 1976.
- Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Méd. IMSS (Méx)* 1987; 25:283-291.
- Martínez M. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas, Fondo de Cultura Económica (Méx) 1984; 145-146.
- Mauel J, Pham TV, Beatrice K, Corradin-Betz S, Bauer J, Evaluation of assay procedures measuring macrophage stimulation by immunomodulators *in vitro*. *Develop. Biol. Standard* 1991; 77:71.
- Merfort I, Wendisch D. Flavonoid Glycosides from *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. *Planta Medica* 1987; 53:434-437.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl J Med* 1993; 329:2002-12.
- Murata K, Takano F, Fushiya S, Oshima Y. Enhancement of NO production in activated macrophages *in vivo* by an antimalarial crude drug, *Dichroa febrifuge*. *J Nat Prod* 1998; 61:729-733.

- Nathan CF, Hibbs Jr, JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial. Activity. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3:65-72.
- Osuna L, Lozoya X. Plantas medicinales usadas por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales infecciosos. *Rev. Méd IMSS (Méx)* 1989; 27:305-311.
- Peng HB, Spiecker M, Liao JK. *The Journal of Immunology* 1998; 161:1970-6.
- Pettit GR, Goswami A, Cragg GM, Schmidt JM, Zou JC. Antineoplastic agents, 103. The isolation and structure of hypoestestatins 1 and 2 from the East African *Hypoestes verticillaris*. *J Nat Prod* 1984; 47(6):913-9.
- Pietta PG, Mauri PL, Bruno A, Merfort I. MEKC as an Improved Method to Detect Falsifications in the Flowers of *Arnica montana* and *A. chamissonis*. *Planta Medica* 1994; 160:369-372.
- Pirker C, Moslinger T, Koller DY, Gotz M, Jarisch R. Cross-Reactivity with tagetes in arnica contact eczema. *Contact Dermatitis* 1992; 26:217-219.
- Ponce-Macotella M, Navarro-Alegria I, Martinez-Gordillo MN, Alvarez-Chacon R. In vitro effect against *Giardia* of 14 plant extracts. *Rev Invest Clin* 1994; 46(5):343-7.
- Puhlmann J, Zenk MH, Wagner H. Immunologically active polysaccharides of *Arnica montana* cell cultures. *Phytochemistry* 1991; 30:1141-1145.
- Puri A, Saxena R, Saxena RP, Saxena KC, Srivastava V, Tandon JS. Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J Nat Prod* 1993; 56(7):995-9.

Rates SMK. Plant as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39:603:613.

Rios J. L. Screening Methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 1998; 23:127-149.

Rivas Morales C. Diseño de un medio de cultivo para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolitica. Facultad de Medicina UANL 1998; pp XVII.

Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. PEHPS medium: An Alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82:249.

Salah AM, Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M, Vierling W, Wagner H. In vitro purgative effect of *Ruellia praetermissa*. *Sceinf. ex. Lindau (Acanthaceae)*. *J Ethnopharmacol* 2000; 72(1-2):269-72

Segura L, Freixa B, Ringbom T, Vila R, Perera P, Adzet T, Bohlin L, Canigueral S. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Med* 2000; 66(6):553-5.

Shen YC, Chen CF, Chiou WF. Suppression of rat neutrophil reactive oxygen species production and adhesion by the diterpenoid lactone andrographolide. *Planta Med* 2000; 66(4):314-7.

Singh A, Handa SS. Hepatoprotective activity of *Apium graveolens* and *Hygrophila auriculata* against paracetamol and thioacetamide intoxication in rats. *J Ethnopharmacol* 1995; 49(3):119-26.

Schröder H, Loche W, Strobach H, Leven W, Willuhn G, Till U, Schoro K. Helenalin and 11 alpha-dihydrohelenalin, two constitutes from *Arnica montana* L., inhibit human platelet function via thiol-dependent pathways. *Thromb Res* 1990; 57:839.

Schultes RE. The future of plant as resources of new biodynamic compounds." *Plants in the development of modern medicine*". Swain T (editor). Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1972; 106.

Spiecker M, Peng H, and K. LJ. Inhibition of endothelial Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression by Nitric Oxide Involves the Induction and Nuclear Translocation of I $\kappa$ B-alfa. *The J. of Biological Chemistry* 1997; 272(49):30969-30974.

So HS, Park R, Oh HM, Pae HO, Lee JH, Chai KY. *Journal Ethnopharmacology* 1999; 68:209-17.

So HS, Park R, Oh HM, Chai KY, Lee JH, Chung HT. Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *Siraea prunifolia* car *simpliciflora*'s root in RAW 264.7 cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 2: 343-355.

Stuehr DJ, Nathan CF. Nitric Oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 1989; 169:1543-1555.

Velázquez GCC. Estudio Fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquilia canescens*. 1997; 10-15.

- Versastegui MMA, Verde SMJ, García AJS. Bioautografía para detectar la Actividad Antimicrobiana de los extractos de plantas. Revista de la Sociedad de Química de México XXXIII 1998, 131.
- Vulto AG, and Smet PAGM. Meyler's Side Effects of drugs. 11<sup>th</sup> Ed. Elsevier, Amsterdam, 1998; 999-1005.
- Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. Plant Drug Analysis. Spring- Verlag Ed. New York 1984.
- Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR. Economic and Medicinal Plant Research. Academic Press, New York, 1985.
- Woerdenbag HJ, Merfort I, PaBbreiter CM, Schmidt TJ, Willuhn G, Uden W, Pras N, Kampinga HH, Konings A. Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from *Arnica* Species Against the GLC4 and the COLO 320 Cell Lines. *Planta Medica* 1994; 60:434-437.
- Wong HR, Menendez IY. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 262:375-80.
- Yim CY, Bastian NR, Smith JC, Hibbs JB and Samlowski WE. Macrophage nitric oxide synthesis delays progression of ultraviolet light induced murine skin cancers. *Cancer Res* 1993; 53:5507-5516.
- Yue-Zhong Shu. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products* 1998; 61:1053-1071.

## **PUBLICACIONES PRODUCIDAS**

- A. Delia E. Cruz-Vega, Abigail Aguilar, Jorge Castro-Garza, and Ma. Teresa González-Garza. Anti-amebic activity of aqueous extracts from five medicinal plants from northeastern Mexico. Archives of Medical Research 2000; 31:S17-S18.
- B. Delia E. Cruz-Vega, Abigail Aguilar, Ma. Julia Verde-Star, Javier Vargas-Villarreal, and Ma. Teresa González-Garza. Leaf extracts of *Carlwrightia cordifolia* induce Macrophage nitric oxide production. Life Sciences 2002; 70(11):1279-1284.

## Antiamoebic Activity of Aqueous Extracts from Five Medicinal Plants from Northeastern Mexico

Delia E. Cruz-Vega,<sup>\*,\*\*</sup> Abigail Aguilar,<sup>\*\*\*</sup> Jorge Castro-Garza<sup>\*</sup> and Ma. Teresa González-Garza<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS),

<sup>\*\*</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, Mexico

<sup>\*\*\*</sup>Herbario IMSS, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico

**Key Words:** *Entamoeba histolytica*, Therapy, Folk medicine, Plant aqueous extracts.

### Introduction

Amebiasis is a parasitic disease that extends worldwide, and is a public health problem in developing countries (1). To date, there is no ideal treatment for amebiasis. This is mainly due to the toxicity of antiamebic drugs and the emergence of resistant strains (2). Accordingly, the search for new antiamebic drugs that are more potent and less toxic than those currently used is one of the priorities of research (3).

Research on plants used in traditional medicine as antiamebic medication offers an alternative to the development of new drugs and/or validation of their use in folk medicine. In addition, it is important because it is a common form of medication for people who embrace traditional medicine as an alternative, or as the only available medicine.

Considering that teas or infusions are one of the most frequent routes of administration in traditional medicine, the aim of this study was to verify *in vitro* the possible antiamebic activity of aqueous extracts from five plants used in Northeastern Mexico.

### Materials and Methods

**Plants.** *Lepidium virginicum* L. (*Cruciferae*), *Acacia farnesiana* L. (*Leguminosae*), *Acacia rigidula* Benth (*Leguminosae*), *Parkinsonia aculeata* L., and *Carlwrightia cordifolia* A. Gray (*Acanthaceae*) were included in this study. All plants were collected around the city of Monterrey, with the exception of *L. virginicum*, which was collected near Mexico City. The taxonomic identification was made at the IMSS Herbarium in Mexico City. After collection, the specimens were cleaned and the roots, stems, and leaves

separated and allowed to dry at room temperature. Ten grams of each dried sample were extracted with 250 mL boiling water for 10 min (aqueous extract). The samples were then filtered through a raw cotton filter, sterilized by filtration, and used immediately.

**Amebas.** *Entamoeba histolytica*, HM-1:IMSS strain was used in all experiments. The trophozoites were maintained in axenic conditions in PEHPS medium (4), and subcultured every 4 days.

**Assay method.** The assay was performed as described previously (5). Briefly, culture tubes containing 11 mL of PEHPS medium were inoculated with  $1.1 \times 10^4$  amebas, after which the culture tubes were added (in triplicate) with 100  $\mu$ L of each aqueous extract. The tubes were incubated for 72 h at 36°C, cooled in ice water for 10 min, and the number of trophozoites/mL in each tube determined with a hemocytometer. The results are expressed as the percentage of growth inhibition with respect to untreated controls.

### Results and Discussion

All aqueous extracts tested inhibited growth of *E. histolytica* trophozoites. The highest activity was detected in leaf extracts, with exception of *L. virginicum*, in which stem extracts were more potent inhibitors. *Acacia rigidula* showed the highest inhibitory activity of all plants included in this study (Table 1). These results support the popular use of these plants. It is important to emphasize that activity was tested in aqueous extracts because teas or infusions from whole plants or their components are an extended practice to treat amebiasis in folk medicine around the world. This also suggests an inexpensive alternative for antiamebic medication.

These aqueous extracts should be further investigated to define their reliability as antiamebic medications through

Address reprint requests to: Ma. Teresa González Garza y Barrón, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, Administración de Correos No. 4, Apdo. Postal 20, Col. Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, México. Telefax: (+52) (81) 190-4035; E-mail: mtgonzal@mail.mty.itesm.mx  
Presenting author: Delia E. Cruz-Vega.

## Leaf extracts of *Carlownrightia cordifolia* induce macrophage nitric oxide production

Delia E. Cruz-Vega<sup>a,c</sup>, Abigail Aguilar<sup>b</sup>, Javier Vargas-Villarreal<sup>a</sup>,  
Ma. Julia Verde-Star<sup>c</sup>, Ma. Teresa González-Garza<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos No. 4, Apartado Postal 020, Col. Independencia, Monterrey, NL, 64720, México*

<sup>b</sup>*Herbario IMSS, Centro Medico Nacional Siglo XXI, Apartado Postal 21-580, 04000 México D.F. México*

<sup>c</sup>*División de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria, Apartado Postal F-16, San Nicolás de los Garza, NL, 66450, México*

Received 14 November 2000; accepted 7 September 2001

### Abstract

*Carlownrightia cordifolia* (Acanthaceae) is a medicinal plant used in northeastern Mexico as a traditional remedy against inflammation. As tissue release of nitric oxide (NO) has been correlated with both inflammatory and anti-inflammatory processes, the aim of this study was to determine the effect of *C. cordifolia* leaf extracts on macrophage NO production. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated and non-LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages were incubated with aqueous, ethanol, methanol and hexane extracts of *C. cordifolia* leaves. All extracts inhibited NO release from LPS-stimulated macrophages, with methanol and hexane extracts showing the greatest inhibition. On the other hand, macrophage cultures treated with extracts without LPS-stimulation produced high releases of NO. These unexpected results suggest two different ways by which leaf extracts may act, depending on cell status. On the other hand, data on NO activity in relation to inflammatory/anti-inflammatory auto-regulatory feedback and high concentrations of NO release by non-stimulated macrophages agreed with the hypothesis that NO may have an inhibitory effect in vascular inflammation. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Nitric oxide; Anti-inflammatory; Macrophages; Traditional medicine; *Carlownrightia cordifolia*

### Introduction

Nitric oxide (NO) has been correlated with the inflammatory process, in which multiple cytotoxic effects are related to the ability to increase vascular permeability and edema. This

\* Corresponding author. Tel.: +52-8-1904035; fax: +52-8-1904035.

E-mail address: mtgonzal@mail.mty.itsem.mx (M.T. González-Garza)



ON L'AVANT

