



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS  
"FRANCISCO GARCÍA SALINAS"  
UNIDAD ACADÉMICA DE ESTUDIOS NUCLEARES

Caracterización fitoquímica y determinación de  
metales pesados en *Croton dioicus Cav.* y  
*Phoradendron villosum Nutt.* usadas como tratamiento  
de diabetes mellitus

TESIS

para obtener el grado de Maestro en Ciencias Nucleares

*PRESENTA:*

Fernando Sánchez Lara

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Eduardo Manzanares Acuña

Dra. Rosalinda Gutiérrez Hernández

*Zacatecas, Zac., 22 de Mayo 2018.*



*Dedicado a mis hijos, mis grandes amores y mayor motivación para seguir adelante. A mi esposa por su apoyo y ánimo que me brinda día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales. 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 sincero agradecimiento a:

- Dr. Eduardo Manzanares Acuña y la Dra. Rosalinda Gutiérrez Hernández. Asesores de mi tesis y apoyo primordial, por creer en mi y por el apoyo constante en la realización de este trabajo.
- MC Hugo López del Rio. Por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.
- Dr. José de Jesús Balleza Cadengo. Por el apoyo en la identificación de las plantas usadas en este trabajo.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte económico para la realización de mi maestría.



# Resumen

La medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, utilizadas para mantener la salud, prevenir, diagnosticar y mejorar enfermedades físicas y mentales. El presente trabajo tuvo como finalidad llevar a cabo la cuantificación de metales pesados, identificación de oligoelementos y estudio fitoquímico de dos plantas medicinales, provenientes del estado de Zacatecas. Las especies vegetales estudiadas fueron: *Phoradendron villosum* y *Croton dioicus*. Se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico de extractos en agua, alcohol etílico, alcohol-agua y aceite de pepita de uva de cada especie vegetal y se analizó el contenido de plomo, arsénico, cobre y níquel por medio de fluorescencia de rayos X. Se constató que *Phoradendron villosum* y *Croton dioicus*, no poseen estudios científicos que validen su uso como tratamiento en diabetes mellitus, por lo cual están siendo usadas. En el análisis de metales pesados, no se detectó plomo. Por otra parte, el arsénico en las plantas se mantiene bajo el límite permitido según la Organización Mundial de la Salud. El níquel sale de los límites permitidos para *Phoradendron villosum* y el cobre excede los parámetros permitidos en ambas plantas. En los extractos de *Phoradendron villosum* y *Croton dioicus*, el arsénico, níquel y cobre fueron absorbidos en una cantidad muy pequeña evitando posible toxicidad al ser ingeridos. Las pruebas químicas dieron positivo para flavonoides en todos los extractos, negativo para carbohidratos y negativo para los extractos de alcohol etílico, alcohol-agua y aceite para *Croton dioicus*. Estos resultados fueron corroborados por espectrofotometría UV-Vis, encontrando más metabolitos dependiendo del extracto. La presencia de distintos antioxidantes genera expectativa de los usos y efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus lo cual justifica su uso como tratamiento alternativo en dicho padecimiento.



# Summary

Traditional medicine is the total sum of knowledge, skills and practices based on the theories, beliefs and experiences of different cultures, used to maintain health, prevent, diagnose and improve physical diseases and mental. This work was intended to carry out the quantification of heavy metals, trace elements and phytochemicals study of two medicinal plants, from the state of Zacatecas. The plant species studied were: *Phoradendron villosum* and *Croton dioicus*. We carried out the phytochemicals screening of extracts in water, ethyl alcohol, alcohol-water and grape seed oil of each plant species and analyzed the content of lead, arsenic, copper and nickel by means of X-ray fluorescence. It was found that *Phoradendron villosum* and *Croton dioicus*, do not possess scientific studies that validate their use as treatment in diabetes mellitus, for which they are being used. In the analysis of heavy metals, no lead was detected. On the other hand, the Arsenic in the plants is maintained under the limit allowed according to the World Health Organization. The nickel leaves the limits accepted for *Phoradendron villosum* and the copper exceeds the parameters accepted in both plants. In the extracts of *Phoradendron villosums* and *Croton dioicus*, the arsenic, nickel and copper were absorbed in a very small amount avoiding possible toxicity when ingested. The chemical tests were positive for flavonoids in all extracts, negative for carbohydrates and negative for the extracts of ethyl alcohol, alcohol-water and oil for *Croton dioicus*. These results were corroborated by UV-Vis spectrophotometry, finding more metabolites depending on the extract. The presence of different antioxidants generates expectation of the uses and protective effects in pathologies such as diabetes mellitus which justifies its use as an alternative treatment in this condition.



# Índice general

<b>Agradecimientos</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>V</b>
<b>Summary</b>	<b>VII</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Objetivos . . . . .	2
<b>2. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
2.1. Diabetes Mellitus . . . . .	5
2.1.1. Diabetes tipo 1 . . . . .	5
2.1.2. Diabetes tipo 2 . . . . .	6
2.1.3. Diabetes gestacional . . . . .	6
2.1.4. Estructura y síntesis de la insulina . . . . .	6
2.1.5. Homeostasis de la glucosa . . . . .	11
2.1.6. Medicamentos . . . . .	12
2.2. Etnofarmacología . . . . .	13
2.2.1. Uso de plantas medicinales . . . . .	13
2.2.2. Tratamiento etnobotánico para DM . . . . .	14
2.2.3. <i>Croton dioicus Cav.</i> . . . . .	14
2.2.4. <i>Phoradendron villosum Nutt.</i> . . . . .	16
2.2.5. Elementos esenciales y beneficiosos en las plantas . . . . .	17
2.3. Principios activos de las plantas medicinales . . . . .	20
2.3.1. Reacciones colorimétricas . . . . .	25
2.4. Extractos de plantas . . . . .	26
2.5. Análisis Elemental . . . . .	27
2.5.1. Espectroscopía de rayos x . . . . .	27
2.5.2. Fluorescencia de rayos x . . . . .	28
2.5.3. Esquema del equipo . . . . .	29
2.5.4. Metales pesados . . . . .	29
2.6. Espectrofotometría UV-Vis . . . . .	38
2.6.1. Aplicaciones . . . . .	38
2.6.2. Ley de Beer-Lambert . . . . .	39
2.6.3. Espectrofotómetro ultravioleta-visible . . . . .	40
2.6.4. Espectro UV-Vis . . . . .	40

<b>3. Metodología</b>	<b>43</b>
3.1. Lugar de recolección botánica . . . . .	43
3.2. Análisis elemental . . . . .	43
3.2.1. Preparación del material botánico . . . . .	43
3.2.2. Calibración del equipo . . . . .	43
3.2.3. Medición . . . . .	43
3.3. Extractos botánicos . . . . .	44
3.3.1. Limpieza del material botánico . . . . .	44
3.3.2. Obtención de extractos madre . . . . .	44
3.4. Determinación de metabolitos secundarios . . . . .	45
3.4.1. Flavonoides . . . . .	45
3.4.2. Carbohidratos . . . . .	45
3.4.3. Alcaloides . . . . .	45
3.5. Espectrofotometría UV-Vis . . . . .	46
3.5.1. Preparación de extractos . . . . .	46
3.5.2. Medición . . . . .	46
<b>4. Resultados</b>	<b>47</b>
4.1. Composición y metales pesados . . . . .	47
4.2. Análisis fitoquímico . . . . .	51
4.3. Espectrofotometría UV-Vis . . . . .	53
<b>5. Discusión</b>	<b>55</b>
<b>6. Conclusiones y trabajo futuro</b>	<b>59</b>
6.1. Conclusiones . . . . .	59
6.2. Líneas de trabajo futuro . . . . .	60

# Índice de figuras

2.1. Planta <i>Croton dioicus</i> . . . . .	15
2.2. Planta <i>Phoradendron villosum</i> . . . . .	16
2.3. Estructura química de algunos alcaloides conocidos de interés médico y psicofarmacológico. . . . .	21
2.4. Estructura química del fenol. . . . .	22
2.5. Estructura de los principales flavonoides. La diferencia entre ellos radica principalmente en el grupo –OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C. En la imagen se muestran en A) la estructura general de flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavanoles y F) Antocianidinas. . . . .	24
2.6. Esquema de un espectrómetro de fluorescencia de rayos X clásico. . . . .	29
3.1. Instrumentación para espectrometría de dispersión de rayos X. . . . .	44
3.2. Instrumentación para espectrometría UV-Vis. . . . .	46
4.1. Composición de la planta <i>Phoradendron villosum</i> en función del espectro de energía. . . . .	47
4.2. Metales pesados presentes en <i>Phoradendron villosum</i> . . . . .	48
4.3. Metales pesados absorbidos en extractos de <i>Phoradendron villosum</i> . . . . .	48
4.4. Composición de la planta <i>Croton dioicus</i> en función del espectro de energía. . . . .	49
4.5. Metales pesados presentes en <i>Croton dioicus</i> . . . . .	49
4.6. Metales pesados absorbidos en extractos de <i>Croton dioicus</i> . . . . .	50
4.7. En la parte superior se muestran los extractos de <i>Phoradendron villosum</i> y debajo los extractos de <i>Croton dioicus</i> . De izquierda a derecha se tienen los extractos en agua, alcohol, alcohol-agua y aceite respectivamente. . . . .	51
4.8. Espectros de absorción para distintas diluciones de los extractos de <i>Phoradendron villosum</i> . . . . .	53
4.9. Espectros de absorción para distintas diluciones de los extractos de <i>Croton dioicus</i> . . . . .	54



# Índice de cuadros

3.1. Concentraciones normales de algunos metales pesados en plantas. . .	44
3.2. Interpretación colorimétrica de flavonoides en la muestra. . . . .	45
3.3. Rangos del espectro donde se encuentran algunos metabolitos secundarios. . . . .	46
4.1. Resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales de los extractos de <i>Phoradendron villosum</i> . . . . .	51
4.2. Resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales de los extractos de <i>Croton dioicus</i> . . . . .	51
4.3. Resultados de la prueba de Shinoda según el color de la reacción. . .	52



# Capítulo 1

## Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome heterogéneo originada por la interacción genético-ambiental, caracterizada por una hiperglicemia crónica consecuencia de un déficit en la secreción o acción de la insulina. La mayoría de los casos de DM se divide en 2 categorías etiopatogénicas amplias:

- La DM tipo 1, cuya causa es la deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Es un proceso autoinmune.
- La DM tipo 2, causada por una combinación de resistencia a la insulina y una respuesta de secreción compensatoria de insulina inadecuada. Puede ocurrir a cualquier edad pero es más común en la adultez. Representa el 90-95 % de los casos de DM [1].

En la actualidad la diabetes mellitus, se está convirtiendo en un problema de salud global. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que en menos de 20 años las cifras se han triplicado [3]. Una mejoría en el cuidado de la diabetes aumentaría la esperanza de vida, por lo que será necesario aplicar los conocimientos existentes o desarrollar tecnologías capaces de prevenir la aparición de la enfermedad y de sus complicaciones, lo que contribuirá a reducir la carga económica que origina en la sociedad, que se concentra sobre todo en los gastos de hospitalización provocados por las complicaciones.

Se calcula que en el mundo existen más de 347 millones de personas con diabetes, y es probable que esta cifra aumente a más del doble para 2030. En 2012, 1.5 millones de muertes se debieron a diabetes, de las cuales alrededor de 80 % ocurrieron en países de ingresos bajos o medios [3]. En México la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año. Las tasas de mortalidad muestran una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 000 muertes anuales. En incidencia y prevalencia la tendencia es ascendente, más de 400 000 casos nuevos al año [1, 3].

El descontrol metabólico y las consecuentes complicaciones se agravan cuando en los servicios de salud no se realiza una detección oportuna y un seguimiento de grupos con factores de riesgo eficiente, aunado a que en la población hay una percepción inadecuada y desconocimiento del riesgo para desarrollar diabetes. Se debe señalar la asociación de altas tasas de comorbilidad que inciden en la gravedad de diabetes y la presencia cada vez mayor de complicaciones micro y macrovasculares por la falta de diagnóstico, tratamiento oportunos y de seguimiento a los pacientes.

La DM es una enfermedad multifactorial, por lo que los pacientes requieren tratamiento integral que incluya cambios en el estilo de vida, modificación de hábitos y plan individualizado de alimentación, actividad física adecuada, control mediante monitoreo de glucosa y tratamiento farmacológico constante.

Aunque la gran mayoría de los medicamentos actualmente registrados son obtenidos por síntesis química, muchos proceden de la naturaleza, en concreto de las plantas. Entre ellos destacan ciertos corticoides, antitumorales (Taxol), así como la aspirina y la morfina, por lo cual el empleo de plantas medicinales está aumentando de forma exponencial tanto para mejorar el estado de salud general como para tratar DM [19, 20, 21]. Desde una perspectiva etnofarmacológica es importante entender que esta enfermedad se encuentra en la interfaz del tratamiento convencional biomédico y local o tradicional. En todo el mundo se han estudiado varias plantas utilizadas tradicionalmente para el manejo de la diabetes por su actividad hipoglucémica, lo que refuerza el argumento de que las plantas medicinales podrían desempeñar un papel en el descubrimiento de nuevos compuestos. India, Asia, Marruecos, Israel y Sudáfrica han demostrado avances en el estudio de plantas regionales con resultados positivos [19, 23, 24, 25, 26] usando las familias con mayor efecto hipoglucémico: Leguminosae, Lamiaceae, Liliaceae, Cucurbitaceae, Astera-ceae, Moraceae, Rosaceae, Euphorbiaceae y Araliaceae [22, 23].

En México se dispone de datos sobre el uso de plantas con o sin medicación biomédica y, en algunos casos, los pacientes usaron estos tratamientos en lugar de los medicamentos convencionales, y se produjeron complicaciones graves incluyendo aumento de hospitalizaciones, cetoacidosis e hiperglicemia aguda [12]. Actualmente se tienen pocos ensayos que evalúen eficacia y seguridad y, normalmente, tienen deficiencias metodológicas y poco tamaño muestral para poder obtener conclusiones fiables. Por lo tanto, datos tan importantes como dosis eficaces, efectos adversos y contra indicaciones no están totalmente dilucidados [11].

Existen estudios farmacológicos y fitoquímicos de plantas usadas como tratamiento alternativo en México para DM 2, donde se analizó el potencial para el desarrollo de fitomedicamentos con un perfil validado de actividad: *Cecropia obtusifolia Bertol* [12, 13, 14, 15], *Equisetum myriochaetum Schlecht* [12, 16, 17], *Acosmium panamense* [12, 14, 18] todas con efecto hipoglucémico notable. En este contexto es importante recordar que el medicamento moderno metformina (una biguanida) es un derivado de un producto natural activo de la planta *Galega officinalis L.* y es de importancia obtener los principios activos de diversas plantas utilizadas en el tratamiento de DM 2 para monitorear los efectos de los compuestos obtenidos.

## 1.1. Objetivos

### Objetivos generales

Caracterizar toxicología por metales pesados e identificar los principios activos en los extractos de hoja, tallo y flor de *Croton dioicus Cav.* y *Phoradendron villosum Nutt.*

### Objetivos particulares

- Determinar compuestos predominantes y contenido de metales pesados en las plantas *Croton dioicus* y *Phoradendron villosum*.
- Obtener extractos madre en agua, alcohol etílico, alcohol-agua y aceite de pepita de uva a partir de hoja, tallo y flor de *Croton dioicus* y *Phoradendron villosum*.
- Identificar metales pesados que pasan a los extractos madre.
- Identificar metabolitos secundarios en los de extractos de *Croton dioicus* y *Phoradendron villosum*.



# Capítulo 2

## Marco Teórico

### 2.1. Diabetes Mellitus

La DM representa un conjunto de trastornos metabólicos con una alternación común, niveles elevados de glucosa en sangre conocidos como hiperglucemia, condición que puede ocasionar daño crónico en diferentes órganos y culminar en complicaciones graves que aumentan la mortalidad y disminuyen la calidad de vida de los pacientes. La hiperglucemia ocurre cuando el organismo pierde la capacidad para producir suficiente cantidad de insulina o ésta no es utilizada de forma efectiva. La insulina es una hormona que se produce en las células beta del páncreas y su acción permite la captación celular de la glucosa. En un inicio se pensaba que las dietas bajas en carbohidratos y altas en grasas eran adecuadas para disminuir el exceso de azúcar en sangre y orina. Otros médicos pensaban que las dietas altas en carbohidratos eran necesarias para recuperar los que se perdían en la orina. El tipo de diabetes depende con frecuencia de las circunstancias y características al momento de su diagnóstico. Los principales son la tipo 1, 2 y gestacional, sin embargo existen otros tipos menos comunes, de origen genético y la llamada prediabetes, en la cual hay alteraciones de la homeostasis de la glucosa pero sin llegar a cifras que indican la enfermedad.

#### 2.1.1. Diabetes tipo 1

La DM 1 se debe a destrucción de las células beta del páncreas, de tal manera que al inicio hay una deficiencia de insulina que más tarde evoluciona hacia una carencia total de la hormona. Constituye entre el 1 y 10% de la población con DM en el mundo. La velocidad de destrucción de las células beta es variable y determina la intensidad del cuadro clínico. En los lactantes y niños progresa con rapidez y en los adultos es más lento. Este tipo de pacientes presentan episodios de hipo e hiperglucemia y su sensibilidad a la insulina es normal en la mayoría de los casos [2]. Este tipo de diabetes puede ser autoinmune (DM1A) o idiopática (DM1B). La primera se debe a la destrucción de las células beta mediada por procesos autoinmunes y la idiopática se refiere a que no hay etiología conocida. No se sabe con exactitud cómo se produce el proceso de autodestrucción de las células beta pero se sugiere que existe fallo en la tolerancia mediada por el complejo de histocompatibilidad mayor [2]. La ausencia absoluta de insulina obliga a los pacientes con DM 1 a depender

de la aplicación de insulina exógena para mantener la homeostasis de la glucosa y evitar, complicaciones graves .

### 2.1.2. Diabetes tipo 2

Esta forma de DM, antes conocida como DM del adulto o diabetes mellitus no insulino dependiente, es la forma más frecuente, se calcula una incidencia de 97 a 98 % en México [3]. Inicia con frecuencia entre la cuarta y quinta década de la vida, y el riesgo de padecerla aumenta con la edad, obesidad, falta de ejercicio, sedentarismo y en mujeres que hayan padecido previamente DMG. Los síntomas aparecen de manera insidiosa, lo que habitualmente hace que se retarde el diagnóstico, la mayoría de los pacientes (80 %) son obesos y tiene resistencia a la insulina. El conocimiento reciente en la fisiopatología de DM, no sólo muestra que tienen defectos en la sensibilidad a la insulina y pérdida de la función de las células beta, sino que también tienen disfunción de las células del páncreas, aumento de la expresión del transportador de glucosa y sodio a través del túbulo contorneado proximal de la nefrona, alteraciones en el sistema de neurotransmisores cerebrales y aumento en la producción hepática de la glucosa, lo que hace a este tipo de DM una enfermedad compleja y con mucha frecuencia difícil de controlar. Al principio los pacientes no requieren de insulina para su control, pero la historia natural de DM 2 ha enseñado que, con el paso del tiempo, la mayoría de estos enfermos requerirán insulina para mantener concentraciones de glucemia dentro de lo aceptable.

### 2.1.3. Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es la intolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza o se diagnostica por primera vez durante el embarazo. A diferencia de los otros tipos de diabetes, la gestacional no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos bloqueadores de las otras hormonas en la insulina producida, una condición denominada resistencia a la insulina, que se presenta generalmente a partir de las 20 semanas de gestación. La respuesta normal ante esta situación es un aumento de la secreción de insulina, cuando esto no ocurre se produce la diabetes gestacional. En muchos casos los niveles de glucosa en sangre retornan a la normalidad después del parto. Su prevalencia global se sitúa entre 1 a 3 % [4].

### 2.1.4. Estructura y síntesis de la insulina

La insulina es una hormona polipeptídica que es sintetizada y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. Estas células corresponden al 65 % de la totalidad de las células de los islotes. Químicamente, la insulina es una molécula pequeña, que contiene 254 átomos de carbono, 337 de hidrógeno, 65 de nitrógeno, 75 de oxígeno y 6 de azufre. Consta de dos cadenas polipeptídicas, una cadena A y una cadena B de 21 y 30 aminoácidos respectivamente, las dos cadenas están unidas por un par de enlaces disulfuros; un enlace intracatenario conecta los aminoácidos 6 y 11 (Leu -Leu) de la cadena A y otros dos enlaces intracatenarios conectan los aminoácidos 7-7 (Cys-Cys) y 19-20 (Cys-Cys) de las cadenas A y B.

Biológicamente, la insulina es una de las hormonas anabólicas más importantes, es necesaria para: 1) El transporte de glucosa y aminoácidos a través de las membranas celulares. 2) La formación de glucógeno en el músculo esquelético. 3) La síntesis de lípidos. 4) Síntesis de ácidos nucleicos y 5) La síntesis de las proteínas. Su principal función metabólica consiste en aumentar la velocidad del transporte de la glucosa hacia el interior de las células musculares y adiposas.

### Síntesis de la insulina

El gen que codifica para la insulina se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11, locus 11p 15. El ADN aporta el patrón para su transcripción en ARN mensajero (ARNm) con todas las instrucciones para la síntesis de la insulina, esto sucede en el núcleo de la célula. Posteriormente el ARNm es exportado al citoplasma y en el retículo endoplasmático rugoso ocurre la traducción de este a preproinsulina. El prefijo «pre» de la preproinsulina hace referencia a un péptido señal de 16 aminoácidos que se escinde de la cadena, por una reacción proteolítica que ocurre en las cisternas del retículo endoplasmático. La molécula resultante recibe el nombre de proinsulina, que es realmente la molécula precursora de la insulina. La proinsulina se libera a través de la membrana del retículo endoplasmático al Aparato de Golgi, pero antes de su liberación, la pro-insulina se pliega para formar los enlaces disulfuros que están presentes en el dímero de la insulina. El término «pre» se refiere a un péptido de conexión o péptido C que une las cadenas A y B del dímero de la insulina. La membrana del Golgi se engloba y encapsula la molécula de proinsulina en una vesícula o granulo secretor que recorre los discos aplanados del complejo de Golgi, en este recorrido se evalúa que la molécula esté correctamente sintetizada y que su juego de aminoácidos sea el dictado por el código genético del ARNm. Una vez verificada la secuencia de la molécula, la proinsulina se almacena en gránulos secretores sobre el Aparato de Golgi. Durante este proceso de concentración, dos tipos de enzimas desdoblán el péptido C: una endoproteasa dependiente de  $Ca^{2+}$  con actividad similar a la tripsina y una exopeptidasa con actividad similar a la de la carboxipeptidasa B. Estas enzimas cortan los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos 30-31 (Ala-Arg) y 63-1 (Arg-Gly) de la estructura de la proinsulina, y producen la insulina. La insulina y el péptido C desdoblado se concentran juntos en los gránulos y allí permanecen esperando el estímulo para la liberación de cantidades equimolares de insulina y péptido C hacia la sangre. La insulina puede permanecer estable en los gránulos, como hexámeros formados por tres unidades diméricas de insulina, gracias a la presencia intracelular del zinc. Existe la hipótesis de que una deficiencia de zinc podría afectar negativamente la producción y secreción de insulina, sin embargo al respecto existe aún controversia.

Las alteraciones en la síntesis de la preproinsulina o en su procesamiento a insulina son algunas de las causas de diabetes mellitus. Así, por ejemplo, en la diabetes insulino dependiente o tipo I, la disminución en la síntesis de esta hormona está relacionada con la destrucción de las células beta del páncreas, inducida por virus o por linfocitos citotóxicos; mientras que en un tipo de diabetes insulino resistente, la hormona es sintetizada pero con errores en su estructura lo que disminuye o anula su funcionalidad, estos errores en el proceso de síntesis se deben generalmente a la presencia de mutaciones en el gen que codifica para la insulina y que se traducen

en una estructura primaria defectuosa en la cadena B o una hiperproinsulinemia que puede ser de dos tipos, a saber: a) Proinsulinemia B- C, que corresponde a una mutación en el lugar de excisión entre la cadena B y el péptido de conexión C; b) Proinsulinemia A- C, corresponde a una mutación entre la cadena A y el péptido de conexión C.

### Secreción de la insulina

Los gránulos secretorios de insulina que se encuentran disponibles en el citoplasma de la célula beta son traslocados a la membrana gracias a una serie de reacciones que empiezan con la entrada de la glucosa a la célula a través del transportador Glut 2. Inmediatamente la glucosa es fosforilada a glucosa 6-fosfato, reacción que es catalizada por una enzima glucocinasa, este proceso ocurre con el fin de que la glucosa permanezca en el citosol de la célula a y pueda ser utilizada en el metabolismo energético. En el citosol la glucosa 6-fosfato es oxidada en dos moléculas de piruvato, produciéndose también dos moléculas de ATP y de NADH. El conjunto de reacciones involucradas en este proceso es denominado glucólisis, la cual se ha dividido en dos etapas; en la primera, la célula debe hacer una inversión de energía; en la segunda, se da una recuperación y producción de energía. En la etapa de inversión de energía se hidrolizan dos moléculas de ATP en ADP por cada molécula de glucosa que se metaboliza, la energía liberada por esta hidrólisis hace posible las reacciones endergónicas acopladas.

La primera reacción de la glucólisis comprende la fosforilación de la glucosa en glucosa 6-fosfato, reacción que como ya se mencionó, es catalizada por la glucocinasa. Esta es una enzima clave en el proceso de secreción de la insulina y se ha comprobado que una disminución en su actividad esta relacionada con la diabetes mellitus insulino resistente postrecepción. El piruvato, producto de la glucólisis, es el sustrato para la síntesis de Acetil CoA, un intermediario del metabolismo energético de la célula. La síntesis de Acetil CoA es catalizada por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa y requiere de la presencia de las siguientes coenzimas: Tiamina pirofosfato, ácido lipoico, Coenzima A, FAD<sup>+</sup> y NAD<sup>+</sup>. El Acetil CoA es transportado a la matriz mitocondrial, donde es utilizado completamente en una serie cíclica de diez reacciones oxidativas conocidas como el ciclo del ácido cítrico (CTA). El producto final de este ciclo son los equivalentes de reducción NADH y FADH, (3 NADH y 1 FADH) y una molécula de GTP, por cada Acetil CoA. Los equivalentes de reducción transfieren sus electrones a un complejo enzimático que se encuentra localizado en la membrana mitocondrial interna y que es denominado la cadena transportadora de electrones, el cual funciona de la siguiente forma: Los electrones del NADH son transferidos al Complejo I (Complejo NADH deshidrogenasa), mientras que los electrones del FADH son transferidos al Complejo II (flavoproteína succinato deshidrogenasa), para ser luego transferidos a la Coenzima Q, el Complejo II (citocromos bc1), el citocromo c y finalmente a la citocromo oxidasa o Complejo IV (citocromos a1a3), el oxígeno molecular es el aceptor final de electrones, produciéndose agua.

Durante el transporte de los electrones se genera un gradiente de protones en el espacio intermembranal de la mitocondria, provenientes de la matriz del organelo y que fueron transportados a través de los complejos I, III y IV. El gradiente

de protones, junto con el potencial de membrana, constituye la base del mecanismo de acoplamiento que impulsa la síntesis de ATP. En este proceso los protones son devueltos a la matriz de la mitocondria por la enzima F1F0-ATPasa que esta embebida en la membrana mitocondrial interna, en un proceso conocido como fosforilación oxidativa.

La ganancia neta de ATP a partir de la oxidación completa de la glucosa en la célula beta del páncreas es de 38 moléculas. La elevación del ratio ATP/ADP en la célula beta es el disparador de los eventos moleculares que activan la traslocación de los gránulos de insulina hacia la membrana citoplasmática y la secreción de la hormona. El ATP inhibe los canales de  $K^+$  sensibles a este, lo que ocasiona la despolarización de la membrana y apertura de los canales de calcio voltaje dependiente. Las altas concentraciones de ATP y  $Ca^{2+}$  intracelular activan al citoesqueleto, promoviendo la formación de los cilios contráctiles que permiten la traslocación de los gránulos secretorios de insulina desde el aparato de Golgi hasta la membrana celular donde se fusionan a esta y mediante exocitosis liberan la hormona hacia la circulación. Adicionalmente, la entrada de glucosa a la célula beta incrementa los niveles de AMP cíclico (cAMP), por un mecanismo que parece no involucrar la activación de la adenil ciclasa; el cAMP activa a través de la proteína cinasa A, la fosforilación y activación de ciertas proteínas claves en el incremento de los procesos de traslación y transcripción del mRNA de la insulina.

En algunos pacientes con diabetes mellitus insulino resistente la síntesis de la hormona ocurre normalmente pero existen daños a nivel del receptor Glut 2 de las células beta lo que interfiere con la secreción de niveles de insulina que permitan superar la resistencia.

### **Cascada de señalización de la insulina**

Antes de hablar de los mecanismos de acción de la insulina deberíamos tener conocimiento sobre los receptores insulínicos, encargados del reconocimiento de la hormona. Estos son proteínas tetrámicas, conformados por dos cadenas alfa y dos cadenas beta unidas entre sí por puentes disulfuro. Los receptores poseen una región extracitoplasmática conformada por las dos cadenas alfa y el extremo amino terminal de las cadenas beta. Además, posee otra región intracitoplasmática formada exclusivamente por las cadenas beta en la cual hay tres dominios característicos, uno de ellos es el dominio Tirosina cinasa (TK). La insulina liberada por el páncreas, como respuesta al aumento en los niveles de glucosa en sangre, es transportada en la circulación hacia las células diana en donde es reconocida por la porción extracelular del receptor insulínico. Esta interacción produce un cambio conformacional en el dominio TK del receptor, promoviendo su auto fosforilación, este proceso activa una cascada de eventos moleculares que lleva a la fosforilación de la proteína IRS-1 (sustrato del receptor de la insulina 1). Este punto de la cascada es de gran importancia, por que a partir de él se activan las rutas implicadas en la traslocación del Glut-4, proteína integral de membrana encargada de transportar la glucosa desde la sangre hacia el citosol de las células insulino dependientes. La cascada de señalización de la insulina activa también importantes procesos anabólicos, mecanismos de crecimiento y diferenciación celular, en cuyo paso inicial esta involucrado la fosforilación del dominio TK.

### Interrelaciones metabólicas en la DM

En la digestión, los carbohidratos que provienen de la dieta son transformados en glúcidos de seis átomos de carbono (principalmente glucosa) mediante procesos mecánicos y químicos; estos últimos corresponden a reacciones de hidrólisis catalizadas por las amilasas (salival y pancreática) y la amilo 1,6-glucosidasa. La elevación de la glicemia, después de la digestión de alimentos ricos en carbohidratos, estimula la secreción de insulina en el páncreas, la cual al unirse a su receptor en las células adiposas y de músculo esquelético activa la cascada de señalizaciones que permite la entrada de glucosa a estas células, normalizando los niveles en sangre.

En el individuo no diabético, la glucosa es utilizada para la síntesis de glicógeno hepático y muscular mediante un proceso denominado glicogénesis, una de las enzimas claves de esta ruta es la glicógeno sintetasa, la cual es regulada positivamente por la insulina. Cuando los niveles de glucosa disminuyen a nivel plasmático, el glicógeno es utilizado para la síntesis hepática de glucosa, la cual es liberada a la circulación para restablecer la glicemia. Este proceso se denomina glicógenolisis y es activado por la hormona glucagón, secretada por las células  $\alpha$  del páncreas. El glucagón, a través del cAMP activa al enzima glicógeno fosforilasa e inhibe al glicógeno sintetasa, lo que promueve la glicógenolisis. En los estados de ayuno temprano la glucosa proveniente de la glicógenolisis hepática ingresa a las células que la requieren como fuente primaria de energía. Una de estas células son los eritrocitos, a ellos ingresa la glucosa a través del transportador Glut 1 y es utilizada para la síntesis de ATP mediante la glicólisis, en este proceso se genera lactato y  $\text{NAD}^+$ . El lactato es liberado a la circulación sanguínea e ingresa a los hepatocitos donde puede ser transformado nuevamente en glucosa por medio de gliconeogénesis. Esta glucosa puede ser almacenada en forma de glicógeno, utilizada en la síntesis de aminoácidos glucogénicos o para la síntesis de lípidos por medio de la lipogénesis.

### Diabetes mellitus insulino dependiente

En los individuos que padecen diabetes mellitus tipo I, la insulina es deficiente como consecuencia de la destrucción de las células beta. Debido a que las células alfa del páncreas son funcionales en estos pacientes, ellos pueden producir el glucagón y por tanto realizar glicógenolisis. Los pacientes no presentan problemas para hacer síntesis de glucosa por medio de la gliconeogénesis. Sin embargo, la baja producción de insulina trae como consecuencia una disminución del número de transportadores de glucosa Glut 4 en el músculo esquelético y en las células adiposas. El resultado es entonces una hiperglicemia persistente después de la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos. El organismo del diabético responde ante los bajos niveles de glucosa en las células dependientes de insulina, como si estuviera en un estado de ayuno prolongado o inanición, movilizand sus reservas de lípidos y proteínas para obtener la glucosa, lo cual agrava la hiperglicemia.

En el caso del tejido adiposo este empieza a movilizar sus lípidos, los ácidos grasos y el glicerol liberados se unen a lipoproteínas plasmáticas y son transportados al hígado. El metabolismo incrementado de los ácidos grasos y la disminución de la lipogénesis, como producto del déficit de NADPH, da origen al incremento de la síntesis de los cuerpos cetónicos ácido  $\alpha$ -Hidroxiacetato, acetoacetato y acetona, a partir del Acetil CoA. Las altas concentraciones de cuerpos cetónicos consumen

progresivamente las reservas alcalinas, desencadenando una acidosis metabólica. Debido a que la insulina interviene en la captación de los triglicéridos en las células, una secreción deficiente de esta hormona se relaciona con la hipertrigliceridemia característica en estos pacientes.

Adicionalmente, la ausencia de insulina disminuye la entrada de los aminoácidos a las células musculares, lo que incrementa el catabolismo de sus proteínas. Los aminoácidos glucogénicos liberados por la proteólisis quedan disponibles para la gluconeogénesis hepática lo que genera un balance negativo del nitrógeno, que conduce al agotamiento de las proteínas y al desgaste tisular.

### **Diabetes mellitus insulino resistente**

En este tipo de diabetes, el paciente puede sintetizar la insulina en forma normal, sin embargo no puede utilizarla para la regulación del metabolismo de la glucosa, aminoácidos y lípidos. Esta situación puede ser consecuencia de: a) defectos en la estructura de la insulina, b) disminución en el número de receptores de la insulina y/o en su afinidad por la hormona, c) Producción insuficiente de insulina por las células b que pueda superar la resistencia.

La resistencia a la insulina es muy común en individuos obesos; se ha demostrado que el número de receptores para la insulina está disminuido en personas obesas. Por otra parte, el aumento de la grasa visceral se ha relacionado con el aumento de la producción de la resistina y de citoquinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), estos pueden bloquear la cascada de señalización de la insulina, disminuyendo el número de transportadores de la glucosa Glut 4. La respuesta del organismo frente a estos eventos es aumentar la secreción de la insulina, es por esto que estos pacientes suelen presentar hiperinsulinemia. En los individuos con diabetes mellitus tipo II, la glucosa proveniente de la glicógenolisis hepática no puede ser utilizada por las células musculares y adiposas, esto debido a la resistencia a la insulina. El metabolismo hepático favorece la síntesis de lípidos a partir del glicerol y de los ácidos grasos que provienen de la dieta y/ o de las reservas del tejido adiposo, lo que favorece el desarrollo de un hígado graso. Los triglicéridos, que son liberados a la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), se van acumulando lo que favorece la hipertrigliceridemia.

#### **2.1.5. Homeostasis de la glucosa**

La homeostasis de la glucosa está determinada por la carga exógena que entra al organismo proveniente de la dieta y por la glucosa de origen endógeno producida por la gluconeogénesis y glucogenólisis. El aumento en las concentraciones de glucosa sérica actúa como secretagogo de la insulina. La insulina es una hormona que suprime la producción de glucosa hepática e incrementa su captación en tejidos periféricos, principalmente en músculo, para la síntesis de glucógeno y en tejido adiposo para la síntesis de triglicéridos. Estos efectos metabólicos permiten que las concentraciones de glucosa se mantengan normales. En los diabéticos, la respuesta de las células beta se encuentra alterada, motivando falla en la acción de la insulina. Los tejidos periféricos y el hígado se hacen resistentes a la acción de la hormona. En etapas tempranas de la DM 2 los pacientes usualmente tienen concentraciones

de insulina normales o ligeramente elevadas en ayuno. Esto se debe principalmente al hiperinsulinismo compensatorio secundario a la resistencia a la insulina. Cuando existe hiperglucemia sostenida, con valores mayores de 250 mg/dl, se altera la función de las células beta, esto conduce a disminución de los niveles de insulina. La disminución de la secreción de insulina o su falta de acción origina un incremento en la producción hepática de glucosa que contribuye a una mayor hiperglucemia, acentuada por la disminución en la utilización de glucosa dentro de las células y directamente por la disminución de la insulina. Finalmente, la glucotoxicidad sostenida por estas alteraciones produce un deterioro mayor de las células beta y defectos a nivel del receptor de la insulina, lo que incrementa aún más la resistencia a la insulina. Este ciclo de acontecimientos convierte a la DM en una enfermedad crónica degenerativa.

### 2.1.6. Medicamentos

Actualmente existen diferentes clases de medicamentos orales: secretagogos de insulina, sensibilizadores de insulina e inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa, cada uno con mecanismo de acción diferente. La elección del medicamento debe individualizarse y depende de factores como la edad, peso, de los niveles de hiperglucemia, presencia de otras enfermedades, aceptación y educación del paciente.

#### Secretagogos de insulina

- Sulfonilureas: Ayudan a reducir la hiperglucemia al mejorar la sensibilidad de las células beta pancreáticas a los niveles de glucosa en sangre, con lo cual aumenta la secreción de insulina. Se absorben vía gastrointestinal y alcanzan un nivel adecuado en plasma aproximadamente entre 2 y 4 horas después de tomarla. A este grupo pertenecen la Tolbutamida, Clorpropamida, Glibenclamida, Glipicida, Glimepirida y tienen como efectos adversos la hipoglucemia y el aumento de peso de aproximadamente de 2 a 5 kg.
- Meglitidinas: Son hipoglucemiantes orales a partir de aminoácidos. Estimulan a las células beta pancreáticas, cerrando los canales de potasio sensibles al ATP en la membrana, permitiendo la apertura de canales de calcio para activar el proceso de exocitosis de los gránulos de insulina. Forman parte de este grupo la repaglinida y nateglinida, los cuales son de acción corta, por lo tanto su uso es para corregir hiperglucemia posprandial.

#### Sensibilizadores de la Insulina

- Biguanidas: Estos medicamentos no se unen a proteínas plasmáticas, no requieren biotransformación y se eliminan por vía renal. La metformina forma parte de este grupo y se considera el medicamento de elección para pacientes con DM 2 que muestran el síndrome de resistencia a la insulina.
- Tiazolinedionas o ciglitazonas: Son medicamentos sensibilizadores a la insulina que disminuyen a la vez la resistencia a la insulina a nivel muscular y de tejido adiposo. En este grupo se encuentran la pioglitazona y rosiglitazona.

### Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa deben administrarse con los alimentos, ya que retrasan la digestión de oligosacáridos y disacáridos en un proceso lento.

### Terapia con insulina

Las acciones de la insulina son complejas, al igual que sus mecanismos de acción, aún no completamente dilucidados. El desarrollo de algunos de sus efectos, se lleva a cabo, en solo algunos minutos (oxidación de la glucosa), mientras que otras acciones necesitan varias horas, como la incorporación de la timidina al DNA, estímulo de la síntesis proteica. Las acciones de la insulina, pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) acciones de crecimiento (estímulo de la síntesis de DNA), y b) Acciones metabólicas. También pueden clasificarse estas acciones, en aquellas que significan : a) Estímulo al transporte de nutrientes (aminoácidos, glucosa, iones), a través de las membranas celulares y b) Modulación de la actividad de enzimas intracelulares que intervienen en los procesos metabólicos más importante.

## 2.2. Etnofarmacología

La etnofarmacología surgió en la década de los 60's en el ámbito de los agentes psicoactivos. En 1983 Holmstedt y Brunh definen a la etnofarmacología como "La exploración interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados por el hombre". Schultes (1991) vierte una nueva definición como: "La observación, identificación, descripción e investigación experimental de los efectos de las drogas utilizadas en la medicina tradicional". Con este enunciado se puntualizó el estudio de la etnofarmacología, así como cada uno de los aspectos que debe comprender un estudio completo. La Etnofarmacología es una ciencia interdisciplinaria, ya que abarca las observaciones en campo, así como también la descripción del uso y preparación de los remedios, la determinación botánica del material obtenido, también engloba los estudios fitoquímicos que son muy importantes para aislar los compuestos presentes en las plantas, así como los estudios farmacológicos. Algunos de los productos botánicos altamente utilizados incluyen canela, *Gymnema sylvestre*, alholva, melón amargo, ginseng, nopal y aloe vera.

### 2.2.1. Uso de plantas medicinales

La OMS estructuró en 1985 un Programa de Medicina Tradicional Herbolaria, reconociendo la existencia de 119 sustancias de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes, útiles en más de 60 categorías terapéuticas y obtenidas principalmente de 91 especies. El estudio de las plantas medicinales más utilizadas por la población y su evaluación con métodos científicos actuales sus efectos farmacológicos y tóxicos han permitido su incorporación a la llamada medicina moderna, estos medios tradicionales con verdadera efectividad, han ido ganando prestigio en la práctica médica actual [51]. El 75 % de la población mundial utiliza las plantas medicinales, y el uso tradicional fundamental es en forma de cocción de las plantas enteras o de sus partes y no de sus principales componentes aislados o purificados.

Se estima en 5 mil el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica, que es una pequeña fracción del total estimado en 3 millones de especies [52]. La utilización de extractos totales de las plantas ejerce en muchos de los casos un efecto más beneficioso sobre el organismo humano que la acción del compuesto aislado y produce menos efectos secundarios indeseables. Este postulado constituye el fundamento de la Fitoterapia, que tantos adeptos gana actualmente en el mundo entero [52]. La OMS ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requeridas para su administración en humanos [53]. Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos se ha confirmado en las poblaciones rurales que las usan, y los mecanismos de la actividad hipoglucémica de estas plantas se ha comenzado a estudiar. Estos remedios son aparentemente efectivos, producen efectos secundarios mínimos o no los producen y son de bajo costo comparados con los agentes hipoglucémicos sintéticos orales [53].

### 2.2.2. Tratamiento etnobotánico para DM

Los primeros tratamientos registrados para la DM implican el uso de plantas. Más de 400 tratamientos tradicionales se han registrado, pero sólo un pequeño número de estos han recibido evaluación científica y médica para evaluar su eficacia. Los tratamientos tradicionales desaparecieron en las sociedades occidentales desde la disponibilidad de la insulina, pero algunos son prescritos por profesionales de la medicina alternativa o tomadas por los pacientes como suplementos [27]. Las plantas antidiabéticas tradicionales pueden proporcionar una fuente útil de nuevos compuestos hipoglucémicos orales para el desarrollo como entidades farmacéuticas, o como simples complementos dietéticos para las terapias existentes. Al usar *Cinnamomum cassia* con 60 personas durante 40 días los niveles de glucosa en sangre disminuyeron de 209 a 157 mg/dL en promedio, con una dosis de 1 gr/d [30]. La planta *Equisetum myriochaetum Schlecht* tiene efectos hipoglucémicos a los 90 minutos de ser administrada en ratones diabéticos, sin mostrar cambios en los niveles de insulina, aun así la glucosa disminuyó de 209 a 157 mg/dL en promedio, con una dosis de 1 gr/d [12]. *Acacia arabica* muestra efectos hipoglucémicos solo en ratas normales [19]. Algunas de estas terapias están restringidas por sus propiedades farmacocinéticas y efectos secundarios acompañantes [28]. Mientras que sus modos de acción compensan parcialmente las alteraciones metabólicas en diabéticos, pero no corrigen necesariamente las lesiones bioquímicas fundamentales.

### 2.2.3. *Croton dioicus Cav.*

#### Sinonimia popular

Suapatle, zorrillo tlate, kanda kankja.

#### Origen y descripción botánica

Planta de 15 a 50 cm de altura, de olor desagradable y apariencia aterciopelada. Las hojas son angostas, de color verde-blancuzco. Las flores se encuentran en

racimos a veces abundantes o escasos. Los frutos son pubescentes y tienen unas semillas de color café. Originaria de México. Habita en climas semiseco y templado desde los 2000 a los 2400 msnm. Asociada a matorral xerófilo, bosque espinoso, pastizal y bosque de encino.



Figura 2.1: Planta *Croton dioicus*.

### Composición química de la planta

Contiene aceites esenciales, ácidos grasos, resinas, principios amargos, principios pécticos, principios albuminoides, ácido tánico y gomas.

### Uso popular de la planta

Con las hojas, se prepara una infusión que se toma muy diluida contra el vómito y las hinchazones. Se dan baños con el cocimiento de esta planta, junto con eucalipto (*Eucaliptus* sp.), para aliviar el cansancio de las coyunturas. La raíz molida con agua se bebe como purgante. La planta reposada en alcohol, se amarra a la cintura para aliviar el dolor.

### Usos farmacológicos y terapéuticos

El Instituto Médico Nacional de México la describe como: anestésico, emetocatórtico, antisifilítico y para la hidropesía.

### Efectos tóxicos de la planta en estudio

Los principios tóxicos que contiene la planta son los glucósidos y resinas. Genera pérdida de control muscular, espasmos, violentos, salivación excesiva, pulso variable e irritación de las mucosas en ganado.

### 2.2.4. *Phoradendron villosum* Nutt.

#### Sinonimia popular

Injerto de encino

#### Origen y descripción botánica

Registrado en municipios con altitudes de 2,000 a 2,600 m. En bosques de encino, bosque de Juniperus-encino y bosque de encino-pino. Es un arbusto dioico hasta de 80 cm de alto, densamente aterciopelado-tomentoso, de color verde o verde-amarillento, ramas desprovistas de catáfilos, tallos por lo común rollizos; hojas ova-das, obovadas o lingüiforme, ápice y base obtusos, de 1 a 5 cm de largo y de 0.5 a 2.7 cm de ancho; inflorescencias agrupadas en las axilas de las hojas, de 1 a 2.8 cm de largo; flores de 2 a 2.5 mm de diámetro; fruto globoso, blanco en fresco, blanco-verdoso, al deshidratarse de color morado, de 2.5 a 3.5 mm de ancho, con el ápice pubescente.



(a) *Phoradendron Villosum* parasitando encino.



(b) *Phoradendron Villosum*.

Figura 2.2: Planta *Phoradendron villosum*.

#### Composición química de la planta

Se reporta contenido de alcaloides, carotenoides, terpenos y flavonoides.

#### Uso popular de la planta

El principal uso que se le da a esta planta es en problemas del riñón, pulmonares, dolor de espalda, dolor de pecho y diabetes.

#### Usos farmacológicos y terapéuticos

No se cuenta con antecedentes del uso medicinal ni estudios químicos o farmacológicos que convaliden su efectividad.

### Efectos tóxicos de la planta en estudio

Las plantas del género *Phoradendron* contienen abundante cantidad de fenoles tóxicos. La ingesta directa de frutos puede provocar gastroenteritis aguda y a veces trastornos circulatorios y respiratorios.

#### 2.2.5. Elementos esenciales y beneficiosos en las plantas

Los elementos esenciales para las plantas son 17 incluyendo O, H y C provenientes de  $H_2O$ ,  $CO_2$  y aire, los demás corresponden a los nutrientes minerales, los cuales, según la cantidad absorbida por la planta, se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, los cuales se encuentran en el tejido de las plantas en concentraciones superiores a 0,1 %, con base en la masa seca. Los micronutrientes son requeridos en los tejidos de las plantas en concentraciones menores a 100  $\mu g/g$  de masa seca. Con estos elementos y la luz del sol, las plantas son capaces de sintetizar todos los compuestos que necesitan. Sin embargo, otros elementos minerales, son considerados beneficiosos porque son esenciales para algunas especies de plantas bajo ciertas condiciones.

#### Macroelementos primarios

- Nitrógeno: El nitrógeno es absorbido por las raíces de las plantas, preferentemente, en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ) o de amonio ( $NH_4^+$ ). Una de las funciones más importantes del nitrógeno es la de tener una acción directa sobre el incremento de la masa seca porque favorece el desarrollo del tallo, el crecimiento del follaje y contribuye en la formación de frutos y granos. Un exceso de este elemento provoca un crecimiento excesivo del follaje, un escaso desarrollo en el sistema radical y un retardo en la formación de flores y frutos.
- Fósforo: El fósforo es absorbido predominantemente como anión monovalente fosfato ( $H_2PO_4^-$ ) y en menor cantidad como anión divalente ( $HPO_4^-$ ). El fósforo juega un papel importante en el metabolismo energético de la planta, porque hace parte de las moléculas ADP y ATP. Forma parte de los ácidos nucleicos ADN y ARN y, además, participa en la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de almidón. La deficiencia de fósforo afecta el desarrollo debido a que la producción de proteínas es muy baja y la síntesis de almidón, celulosa y sacarosa se reducen.
- Potasio: Este nutriente mineral es el más abundante en el citoplasma, y su importancia fisiológica radica en el papel que juega en el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas. Por otra parte, contribuye a la economía del agua porque regula la apertura estomatal, importante para la absorción de  $CO_2$  y el control de la transpiración. La deficiencia de este nutriente produce un estancamiento en el desarrollo de la planta.

### Macroelementos secundarios

- **Azufre:** Las raíces de las plantas absorben el azufre en forma de aniones de sulfato y su contenido en los tejidos vegetales es variable. El azufre forma parte de proteínas y vitaminas como la tiamina y la biotina, y es componente de numerosas enzimas, además, es componente de los sulfolípidos, los cuales son constituyentes de la membrana y ayudan a regular el transporte de iones.
- **Calcio:** Es un elemento esencial porque interviene en la estabilidad de la membrana plasmática y en la integridad de la célula, ya que es componente básico de la lámina media de la pared celular, en forma de pectatos de calcio. Estos pectatos le confieren consistencia y cierto grado de rigidez a la pared celular. Una deficiencia de calcio puede provocar mayor absorción del magnesio, provocando síntomas de fitotoxicidad.
- **Magnesio:** Es absorbido por las plantas como un catión divalente, su absorción puede ser afectada por relaciones altas de Ca/Mg, en cuyo caso las plantas absorben menos magnesio. La deficiencia de magnesio puede acentuarse con dosis altas de potasio. El magnesio tiene funciones importantes dentro de la planta: es el átomo central de la molécula de la clorofila, interviene en la síntesis de proteínas, en el metabolismo del fósforo, en la respiración y en la activación de varios sistemas enzimáticos en las plantas.

### Macroelementos primarios

- **Nitrógeno:** El nitrógeno es absorbido por las raíces de las plantas, preferentemente, en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Una de las funciones más importantes del nitrógeno es la de tener una acción directa sobre el incremento de la masa seca porque favorece el desarrollo del tallo, el crecimiento del follaje y contribuye en la formación de frutos y granos. Un exceso de este elemento provoca un crecimiento excesivo del follaje, un escaso desarrollo en el sistema radical y un retardo en la formación de flores y frutos.
- **Fósforo:** El fósforo es absorbido predominantemente como anión monovalente fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y en menor cantidad como anión divalente ( $\text{HPO}_4^-$ ). El fósforo juega un papel importante en el metabolismo energético de la planta, porque hace parte de las moléculas ADP y ATP. Forma parte de los ácidos nucleicos ADN y ARN y, además, participa en la fotosíntesis, la respiración y la síntesis de almidón. La deficiencia de fósforo afecta el desarrollo debido a que la producción de proteínas es muy baja y la síntesis de almidón, celulosa y sacarosa se reducen.
- **Potasio:** Este nutriente mineral es el más abundante en el citoplasma, y su importancia fisiológica radica en el papel que juega en el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas. Por otra parte, contribuye a la economía del agua porque regula la apertura estomatal, importante para la absorción de  $\text{CO}_2$  y el control de la transpiración. La deficiencia de este nutriente produce un estancamiento en el desarrollo de la planta.

### Microelementos

- Boro: Este elemento es básicamente transportado por el xilema, lo que implica que su distribución en las plantas está determinada principalmente por la transpiración ya que es un elemento poco móvil. El papel de boro en la nutrición de las plantas es de los menos comprendidos. Sin embargo, es conocido que la deficiencia de boro inhibe la elongación de la raíz y la síntesis de ADN. Igualmente, la deficiencia de boro induce la acumulación de fenoles que al ser activados por la luz producen radicales superóxidos que pueden dañar las membranas.
- Cloro: El cloro es fácilmente tomado por las plantas en su forma de ión inorgánico y es altamente móvil dentro de la misma. Este elemento está involucrado en la fotosíntesis, ya que es requerido para la fotólisis del agua, además, juega un papel importante en la regulación estomática, sirviendo de anión acompañante al potasio en su entrada y salida de las células guardas.
- Cobre: El cobre es un catión divalente que junto con el hierro y el manganeso interviene en la síntesis de la clorofila. En las plantas deficientes de cobre se presenta marchitamiento en las hojas jóvenes, lo cual resulta de dificultades en el transporte del agua, debido a una insuficiente lignificación en las células del xilema. Es importante en la fotosíntesis, por lo que su deficiencia repercute en bajas tasas fotosintéticas y, por lo tanto, bajos niveles de carbohidratos.
- Hierro: Es un elemento asociado con el desarrollo de los cloroplastos, la síntesis de ferredoxina y de la clorofila. Actúa en varios procesos metabólicos como la fotosíntesis y la reducción del nitrógeno.
- Manganeso: El manganeso es importante en el proceso fotosintético, ya que junto con el cloro, participa en la fotólisis del agua. Por otra parte, la presencia de este elemento en el fotosistema favorece la fotofosforilación, la reducción del CO<sub>2</sub>, y la reducción del nitrito y del sulfato. Además, parece ser constituyente estructural de los ribosomas. Por tal razón, su deficiencia podría ocasionar una fuerte reducción de la tasa fotosintética.
- Molibdeno: La importancia del molibdeno radica en que es un constituyente esencial de las enzimas que tienen que ver con la fijación biológica de nitrógeno y con la reducción de nitrato a amonio; estas enzimas son la nitrogenasa y la nitrato reductasa respectivamente. Por estas razones, las deficiencias de molibdeno están correlacionadas con el metabolismo del nitrógeno.
- Zinc: El zinc es absorbido por la planta como catión divalente o quelato vía radical o foliar. Este micronutriente se requiere para el mantenimiento de las biomembranas, donde forma complejos con grupos fosfolípidos y sulfidrilos, protegiendo los lípidos de membrana y proteínas frente a daños oxidativos, por lo tanto, su deficiencia ocasiona un aumento en la permeabilidad de las membranas.

- Níquel: Su importancia radica en que hace parte de la enzima ureasa que disocia la urea en  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$ . En plantas con deficiencia de níquel, la concentración de urea aumenta en las hojas hasta niveles tóxicos.

### Elementos esenciales beneficiosos

Estos elementos estimulan el crecimiento y el desarrollo en las plantas pero no se consideran esenciales porque no cumplen con los criterios de esencialidad. Sin embargo, se ha encontrado que algunos de estos minerales son esenciales para ciertas especies de plantas, bajo condiciones específicas. Este criterio se aplica especialmente al sodio, al silicio y al cobalto, aunque el selenio y el aluminio podrían ser beneficiosos para algunas plantas.

- El sodio es considerado un elemento beneficioso por tres aspectos: es esencial para ciertas especies, puede reemplazar funciones del potasio en las plantas y tiene un efecto positivo en el desarrollo vegetal. En cuanto a las funciones del sodio y el potasio, algunas plantas pueden aumentar su masa seca con sodio aunque existan deficiencias de potasio.
- El silicio evita la toxicidad que pueda causar el manganeso, redistribuyéndolo en el tejido foliar, evitando la formación de puntos necróticos en las hojas causados por el manganeso. En forma general, el silicio mejora la resistencia contra patógenos y parásitos, y protege contra pérdidas de agua por transpiración cuticular.
- El cobalto es necesario para la fijación del nitrógeno en las leguminosas y es un mineral esencial para los rumiantes ya que es constituyente de la vitamina B12. Se ha demostrado que en ambientes pobres de cobalto la fijación del nitrógeno es escasa. La disponibilidad del cobalto aumenta en medios ácidos y disminuye con la presencia de óxidos cristalinos de manganeso.
- El selenio forma proteínas al igual que el azufre, pero las proteínas que tienen selenio no son funcionales. Pese a que no se reportan otros beneficios, este es un elemento esencial para animales y humanos.
- El aluminio es beneficioso en bajas concentraciones para las plantas con alta tolerancia al aluminio. Sin embargo, son más conocidos los efectos negativos en condiciones de pH bajo porque precipita el fósforo e inhibe la división celular. Además, disminuye la absorción de fósforo, calcio, magnesio, potasio, hierro y boro.

## 2.3. Principios activos de las plantas medicinales

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los

glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos. Actualmente se considera como una referencia indispensable para determinar la calidad para el empleo de las mismas, especialmente cuando van a ser empleadas en medicamentos fitoterápicos o especialidades farmacéuticas. Así mismo, es una herramienta muy útil para determinar absorción de sustancias tóxicas por las plantas, residuos de plaguicidas, y las posibles consecuencias derivadas de procesos de contaminación atmosférica, de las aguas o de los suelos. En taxonomía vegetal, permite la identificación química de especies y quimiotipos. Dichos metabolitos, dadas sus propiedades curativas han sido los cimientos de la medicina, incrementando su arsenal terapéutico cada día, utilizados en la elaboración de fármacos o fitofármacos. Entre los metabolitos secundarios principales se encuentran:

- Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, generalmente intracíclico, muchos de ellos son insolubles o poco solubles en agua, y reaccionan con los ácidos para formar sales. Existen sustancias relacionadas con los verdaderos alcaloides, pero cuyo nitrógeno es alifático y se llaman protoalcaloides. Estos compuestos no representan un grupo homogéneo de compuestos, sea desde el punto de vista químico, bioquímico, ecológico o fisiológico [35]. Las plantas producen los alcaloides mediante un proceso metabólico y constituyen sustancias de reserva capaces de proveer nitrógeno [36]. Se pueden clasificar de la siguiente manera: a) Alcaloides derivados de la ornitina y la lisina.; b) Alcaloides derivados de la tirosina y la fenilalanina; c) Alcaloides derivados del triptófano; d) Alcaloides derivados del ácido nicotínico; e) Alcaloides derivados de la histidina.

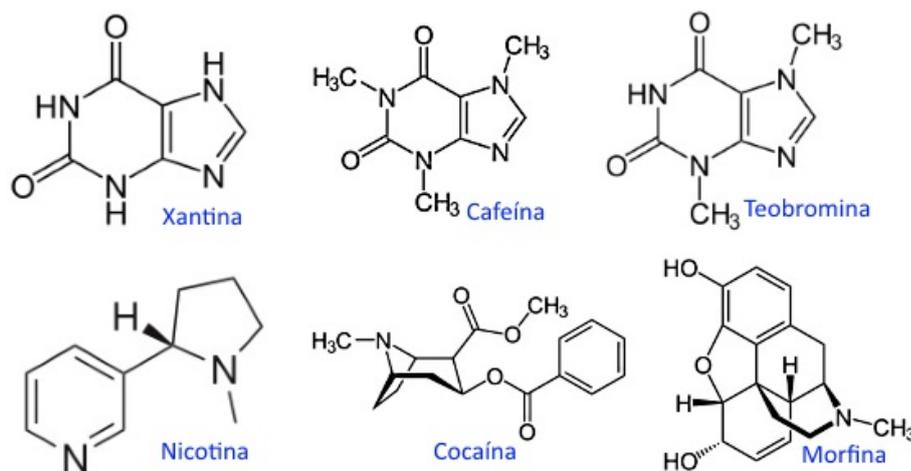


Figura 2.3: Estructura química de algunos alcaloides conocidos de interés médico y psicofarmacológico.

- Los fenoles, nombre popular de los hidroxibencenos, comprende aproximadamente 8000 compuestos, con uno o más grupos hidróxidos, incluyendo derivados funcionales (entre ellos ésteres, metil ésteres y glucósidos), su origen

es en el mundo vegetal y están presentes en el reino animal por ingestión de éstos. La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. La forma más común de encontrarlo en la naturaleza es en forma de glucósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos [37]. Entre los principales grupos de compuestos fenólicos se encuentran a) los fenoles simples que son poco frecuentes y se encuentran en las plantas en forma de heterósidos, b) ácidos fenólicos, compuesto de un anillo fenólico y una función orgánica de ácido carboxílico y puede estar unidos a azúcares, c) los taninos que poseen un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica; d) las cumarinas que son derivados de la benzo-a-pirona, muchas de ellas son fenólicas, por lo que se incluyen dentro de los derivados fenólicos, e) los lignanos que son compuestos que poseen una estructura constituida por dos unidades de fenilpropano. f) las quinonas que son compuestos aromáticos con dos grupos cetona, son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles; g) los flavonoides que constituyen un grupo amplio de fenoles naturales, se encuentran tanto como agliconas libres o en forma de heterósidos. Estos compuestos reducen el riesgo de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades crónicas como la enfermedad cardiovascular, hipertensión, cáncer y diabetes [38].

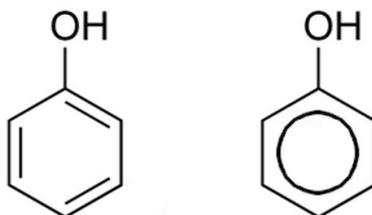


Figura 2.4: Estructura química del fenol.

- Los taninos son compuestos fenólicos secundarios de elevadas masas moleculares (500 a 20000 uma). En la naturaleza pueden encontrarse dos tipos de taninos: condensados e hidrolizables, según su estructura química. Los taninos condensados o pro-antocianidínicos, liberan tras una hidrólisis ácida una antocianidina. Químicamente se trata de polímeros de flavanoles. Sin embargo, los taninos hidrolizables son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad. La mayoría tiene una, masa molecular entre 600 y 3000 uma después de una hidrólisis ácida se liberan ácido gálico o ácido elágico. Se denominan galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Los elagitaninos están estructurados como moléculas lineales de glucosa enlazadas a las funciones carboxilo de los grupos hexahidroxidifénicos del ácido elágico, mientras que los galotaninos están constituidos por núcleos de glucosa en forma cíclica que forman enlaces con la función ácida del ácido gálico. En ambos casos se trata de estructuras de una complejidad relativa [39]. Los taninos son

bioactivos como antioxidantes y antimicrobianos. También se utilizan como antisépticos y astringentes [40]. Sin embargo, son considerados indeseables debido a que precipitan proteínas, inhiben las enzimas digestivas y afectan la utilización de vitaminas y minerales. Por lo que la importancia del monitoreo de la dosificación de las cantidades de taninos hidrolizables y condensados presentes en alimentos es importante por estos efectos [41].

- Los flavonoides son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos, unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C6-C3-C6. Los flavonoides naturales suelen presentar, al menos, tres hidroxilos fenólicos y se encuentran, generalmente, combinados con azúcares en forma de glucósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres. Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B [42, 43]. En los tipos de flavonoides se encuentran: a) Las flavonas y los flavonoles están presentes en muchos vegetales y son los flavonoides más comunes. Los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en la posición C-3 que puede estar metilado o glicosilado de este grupo, son los más comunes los derivados de la quercetina.; b) Las flavanonas y los flavanonoles, estos compuestos existen en muy pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Por su baja concentración y su característica incolora, ellos han sido grandemente desatendidos. En cambio sus glucósidos son bien conocidos, como son la hesperidina y naringina de la corteza de los frutos cítricos.; c) Los antocianos siempre se encuentran como glucósidos, después de la clorofila, son el grupo más importante de pigmentos en las plantas, son visibles al ojo humano y proporcionan los colores malva, rosa, violeta y azulado a numerosas flores y frutos, constituyen hasta aproximadamente 30 % de su masa. Tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero, además, poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.; d) Los isoflavonoides tienen el anillo B en la posición 3 a diferencia de los flavonoides que lo tienen en la posición 2.; e) Las isoflavonas son todas coloreadas y están mucho menos distribuidas en las plantas; de hecho están casi restringidas a las leguminosas y se destacan por su papel como fitoalexinas.; f) Las chalconas y las dihidrochalconas son poco abundantes, pues se convierten en flavanonas en medio ácido y la reacción es fácilmente observable in vitro, ya que las chalconas son mucho más coloreadas que las flavanonas, particularmente en medio básico donde son anaranjadas-rojizas.; g) Los Sulfatos de flavonoides son bisulfatos, aunque pueden aparecer como sales.; h) Los Biflavonoides son dímeros de flavonoides, raramente encontrados como glucósidos, y tienen una distribución muy restringida, aparecen predominantemente en las gimnospermas [44].

Estas moléculas se caracterizan por ser esencialmente medicamentos para la insuficiencia venosa situándose su acción a nivel de las pequeñas venas o de los capilares donde disminuye la permeabilidad y aumenta la resistencia de los capilares (acción vitamínica P). Además, algunos flavonoides tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación, rol atribuido fundamentalmente al flavonoide quercetina, aunque

aparece en menor intensidad en otros como genisteína y luteolina [44]. Otras muchas propiedades son atribuidas a los flavonoides, tales como: antialérgica, antiulcérica, antiinflamatoria, antiagregante plaquetaria (sobre todo antocianósidos y derivados de flavonas y flavonoles) y diurética.

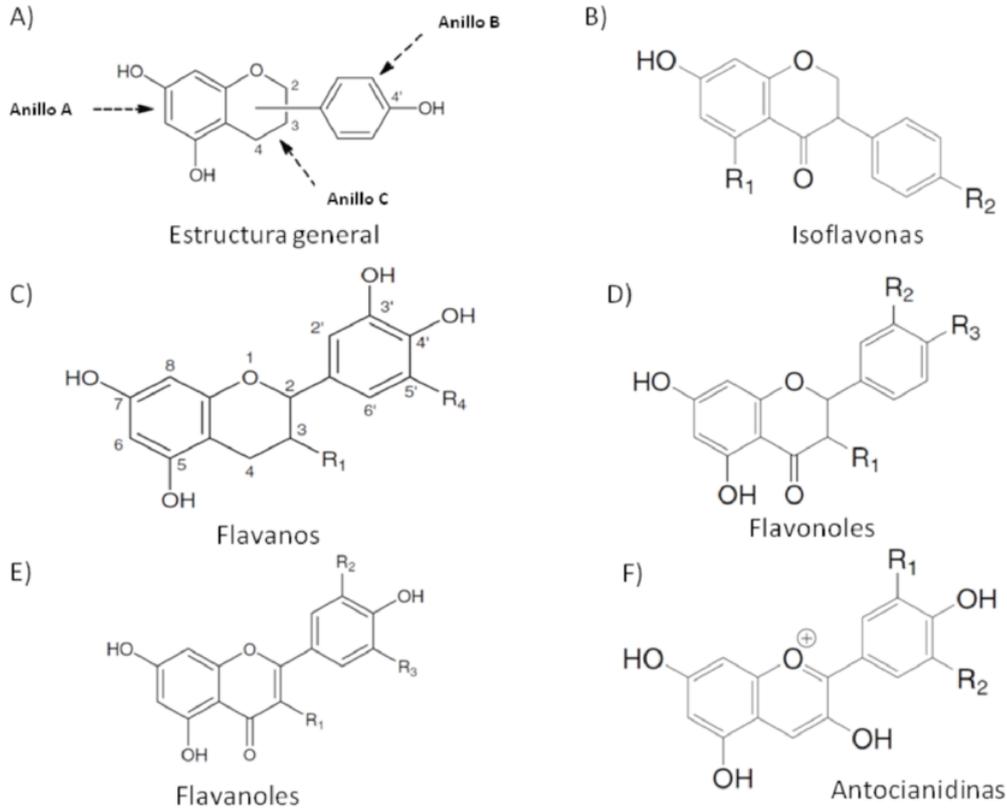


Figura 2.5: Estructura de los principales flavonoides. La diferencia entre ellos radica principalmente en el grupo  $\text{-OH}$  y en el grado de saturación que presenta el anillo C. En la imagen se muestran en A) la estructura general de flavonoides, B) Isoflavonas, C) Flavanos, D) Flavonoles, E) Flavonoles y F) Antocianidinas.

- Las saponinas, la palabra proviene del latín *sapo* que significa jabón, son compuestos glucosídicos, coloidales hidrosolubles que producen espuma cuando se agita la solución acuosa y son excelentes agentes emulsionantes. Muchos de estos glucosídicos tienen la fórmula general  $(C_nH_{2n-8}O_{10})$ , poseen una estructura que contiene dos partes: glucona y aglucona. La parte glucona está compuesta por azúcares simples de 1 a 5 unidades; mientras que la parte aglucona, conocida como sapogenina, la cual tiene un esqueleto de tipo triterpénico (C30) o de tipo esteroidal (C27). La diferencia entre ellos está en que el tipo esteroidal ha eliminado 3 de sus radicales metilos y presenta un sistema policíclico característico de esterano; y algunos de los triterpénicos no poseen el esterano y conservan los radicales metilo en su estructura. Por lo general, las saponinas ejercen una poderosa acción hemolítica porque interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos [45]. El poder hemolítico es característico de las saponinas tipo triterpénicas, pero varía según los sustituyentes de la estructura. Si la parte glucona es monodesmosídica (el azúcar o azúcares se

unen por una única posición a la sapogenina), la saponina es hemolítica, pero si es bidesmosídica (el azúcar o azúcares se unen por dos puntos a la genina) no lo es. Las saponinas con alto poder hemolítico resultan muy tóxicas si se administran por vía intravenosa, porque contactan directamente con la sangre, mientras que por vía oral su toxicidad es muy baja. Es importante resaltar que la mayoría de las saponinas hemolíticas son icotóxicas [46].

Las saponinas presentan actividades biológicas como: antimicrobiana, anticancerígenas, antifúngica, antiinflamatoria, analgésica, adrenocorticotrópica, antiulcerante, hemolítica, espermicida, hipoglicemiante, insecticida, contraceptiva, cardiovascular, cicatrizante, citotoxicidad, espasmolítica, expectorante [46]. Se les atribuye un efecto protector del cáncer de estómago e intestino. También, las saponinas son capaces de captar y combinarse con el colesterol alimentario en el intestino, e impedir así que pueda llegar a la sangre. Además puede captar los ácidos biliares primarios y facilitar su eliminación del cuerpo [47].

- Los glucósidos cianogénicos (GC) estructuralmente están formados por un azúcar, un grupo ciano y un derivado carbonílico (aldehído o cetona). Casi todas las sustancias cianógenas son cianohidrinas unidas a un azúcar cuya hidrólisis enzimática libera un cianuro; este proceso también se conoce como cianogénesis [48]. La cianogénesis está considerada como un mecanismo de protección a la planta contra depredadores e inclusive herbívoros. Estos principios activos tienen la capacidad de almacenar nitrógeno reducido y azúcar, utilizado en su metabolismo primario cuando sea exigido. La mayor parte de ésta se lleva a cabo por la hidrólisis de la  $\beta$ -glucosidasa, dando lugar a la producción de azúcares y una cianhidrina que se degrada fácilmente a HCN con una cetona u aldehído. La toxicidad de los glucósidos cianogénicos se debe a la producción de HCN, desencadenando procesos de intoxicación por cianuro y de varias enfermedades crónicas. Este HCN es altamente fitotóxico y alelopático, inhibe la respiración celular en plantas y animales e interfiere en otros procesos íntimamente relacionados con el crecimiento [49]. Este proceso puede llevarse a cabo en cualquier parte de la planta como raíces, hojas, flores, frutos, etc. y/o en algún estado fenológico en particular. Eyjólfsson (1970) clasificó los glucósidos cianogénicos en cuatro grupos en función de la estructura química de la aglicona: Glucósidos derivados de la 2-hidroxi-2-fenilalanina o derivados de ésta. Se trata de compuestos que tienen sustituyentes o grupos hidroxilo o alquilo en el anillo aromático, como es el caso de la amigdalina. Glucósidos derivados de las agliconas alifáticas saturadas. Glucósidos con la aglicona que contiene un doble enlace en posición alfa o beta al grupo nitrilo. Glucósidos con la aglicona alicíclica insaturada, como por ejemplo la ginocardina. Se conocen aproximadamente 25 glucósidos cianogénicos diferentes, de los cuales la amigdalina, la durrina, la linamarina, la lotaustralina, la prunasina y la taxifilina son los de mayor importancia en las plantas comestibles [50].

### 2.3.1. Reacciones colorimétricas

Las pruebas colorimétricas o pruebas rápidas se utilizan en el análisis de metabolitos para obtener una indicación de presencia o ausencia en la muestra en cuestión.

El color obtenido en cada prueba particular puede variar en función de las condiciones del ensayo, la cantidad de sustancia presente y los materiales extraños que contenga la muestra. Una reacción colorimétrica es una técnica química en la que en una solución acuosa, un sustrato, reacciona con un reactivo para generar un cambio de color.

Para efectuar una prueba colorimétrica se coloca una pequeña cantidad de la muestra en la cavidad de una placa de gotas, se añade una pequeña cantidad del reactivo de que se trate y se observa si se produce algún cambio de color. Los reactivos de las pruebas colorimétricas deben ponerse a prueba con sustancias conocidas cuando se preparan, y al efectuar la prueba de la muestra debe ejecutarse también un ensayo en blanco para excluir los falsos positivos. Muchas de las pruebas colorimétricas son inespecíficas y sirven para comprobar (o excluir) la presencia de una amplia variedad de compuestos. Sin embargo, otras reacciones colorimétricas pueden ser más específicas y demostrar la presencia o ausencia de ciertos grupos funcionales. Aplicando una serie de pruebas colorimétricas diferentes a la muestra de una sustancia desconocida, se puede descartar posibilidades y aproximarse así a la posible identidad del compuesto o los compuestos presentes. En fitoquímica es una técnica común utilizada para descubrir si una planta o algunas de sus estructuras presenta o no algún metabolito secundario.

## 2.4. Extractos de plantas

Los principios activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas o bien pueden ser administrados tal y como se encuentran en la planta desecada o en la planta fresca. A lo largo de la historia la fitoterapia, a través de la fitoquímica, ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas, los cuales son el propósito de esta investigación. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta que se va a emplear, concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. Cuando se utiliza el agua como vehículo extractivo reciben el nombre genérico de tisanas: son preparaciones acuosas en las que se aprovecha el poder de extracción que el agua posee. Manteniendo el agua en contacto con la planta ésta cede parte de sus principios activos a la misma, cede aquellas sustancias que son solubles en agua. Ocurre un fenómeno de difusión celular. Una vez que la planta ha sido inhibida, es decir, impregna el agua, vuelve a reconstruir el estado que tenía la planta fresca. En la planta seca los protoplasmas celulares están retraídos hacia las paredes celulósicas de rigidez indeformable, con lo cual se llenan de finas películas de aire, el cual es expulsado por el fenómeno de la imbibición y sustituido por agua. La difusión celular y, por tanto, la extracción de principios activos durará mientras no se alcance un equilibrio osmótico entre protoplasma celular y líquido extractivo, en este caso agua. Según la textura o los componentes de la planta, existen varios procedimientos extractivos: Infusión, decocción, maceración, digestión, lixiviación y diálisis.

Otra forma, radicalmente distinta de extracción de principios activos, son los zumos o jugos, que pueden ser acuosos o grasos. Así se tiene, zumo de naranja, aceite de oliva, resinas de coníferas, bálsamos diversos e, incluso jugos animales.

Normalmente, se emplean para este tipo de extracción prensas hidráulicas, calor o diversos artilugios mecánicos, como licuadoras. El agua tiene un poder extractivo relativamente pequeño, comparada con otros disolventes también empleados. Uno de ellos y el más usado es el alcohol etílico en diversas graduaciones. Muchas de las preparaciones extractivas se realizan con este disolvente. Otros disolventes utilizados pueden ser: éter, cloroformo, acetona o propilenglicol. La destilación se emplea cuando los principios activos que se quiere obtener sean particularmente volátiles ya que en los métodos anteriores gran parte de estas esencias se pierden por ser evaporadas al aplicar calor. Existe una destilación seca, empleada para obtener sustancias como el metanol o ácido acético, en la cual no se moja en ningún líquido la materia de la cual se van a extraer esas sustancias. La destilación típica es llamada destilación húmeda, en la cual se añade a la planta agua o alcohol como proceso previo antes de la propia destilación. Algunas destilaciones se hacen en un medio donde previamente se hace el vacío, con lo cual las esencias se evaporan a temperaturas inferiores, evitándose oxidaciones y la descomposición de la esencia. Se puede elevar la concentración de principios activos por medio de la evaporación del disolvente, sea alcohol o sea agua. Dado que esta evaporación dañaría y alteraría los principios activos, deberá siempre hacerse al vacío. Existen diversos aparatos para tal efecto, según sea el resultado que se quiera conseguir:

- Concentraciones a vacío.
- Nebulizadores.
- Liofilizadores.

## 2.5. Análisis Elemental

El análisis elemental es un proceso en el que se investiga una muestra de suelo, agua potable, minerales o compuestos químicos para determinar su composición elemental e isotópica, este puede ser cualitativo y cuantitativo.

### 2.5.1. Espectroscopía de rayos x

La espectroscopía de rayos x es un conjunto de técnicas espectroscópicas para la determinación de la estructura electrónica de materiales mediante el uso de excitación de rayos x. Los rayos x interactúan con la materia a través de los electrones que la forman y que se están moviendo a velocidades mucho menores que la de la luz. Cuando la radiación electromagnética x alcanza un electrón cargado éste se convierte en fuente de radiación electromagnética secundaria dispersada.

Según la longitud de onda y de las relaciones de fase de esta radiación dispersada, nos podemos referir a procesos elásticos, o inelásticos (dispersión Compton), dependiendo de que no cambie, o cambie, la longitud de onda, y de coherencia o incoherencia según que las relaciones de fase se mantengan en el tiempo y en el espacio, o no.

Los intercambios de energía y momento que se producen pueden incluso dar lugar a la expulsión de un electrón fuera del átomo, seguido de la ocupación del nivel de este

electrón por electrones de niveles superiores. Todos estos tipos de interacciones dan lugar a diferentes procesos en el material como pueden ser: refracción, absorción, fluorescencia, dispersión Rayleigh, dispersión Compton, polarización, difracción y reflexión. El índice de refracción de todos los materiales, con relación a los rayos X, es próximo a la unidad, por lo que el fenómeno de la refracción de rayos X es despreciable.

La interacción de los r-X con la materia esencialmente ocurre mediante dos procesos:

- Algunos fotones del haz incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyen la radiación dispersada exactamente con la misma longitud de onda que la radiación incidente (origina el fenómeno de la difracción).
- Los fotones pueden sufrir una serie de choques inelásticos al incidir sobre un blanco y su energía incrementa la temperatura de la muestra o da lugar al fenómeno de fluorescencia.

Los rayos dispersados estarán completamente en fase si esa diferencia de fase es igual a un número entero  $n$  de longitudes de onda esta relación se conoce como Ley de Bragg y establece la condición esencial que debe cumplirse para que ocurra la difracción. Aunque físicamente no es un proceso de reflexión los términos planos de reflexión y rayo reflejado se usan con frecuencia para referirse a los planos de difracción o rayos difractados respectivamente. Puesto que los átomos están dispuestos periódicamente en una red los rayos dispersados por ellos tienen unas relaciones de fase definidas entre ellos; estas relaciones de fase son tales que en la mayoría de las direcciones se produce una interferencia destructiva pero en unas pocas direcciones se produce una interferencia constructiva y se forman rayos difractados.

### 2.5.2. Fluorescencia de rayos x

Para que se dé el proceso de fluorescencia de rayos X, primero tiene que ocurrir la absorción fotoeléctrica por el elemento. La absorción fotoeléctrica por la muestra sucede cuando un fotón altamente energético proveniente de una radiación de rayos X interactúa con la materia. Cuando los átomos de la muestra a analizar absorben esta alta energía, un electrón de los más cercanos al núcleo de las capas internas K o L es expulsado del átomo. En este proceso de absorción, parte de la energía del fotón incidente de rayos X es utilizada para romper la energía de enlace del electrón interno del elemento y la energía restante acelera el electrón expulsado. Después de que el electrón es expulsado, el átomo queda en un estado altamente excitado y por lo tanto muy inestable. Para que se reestablezca la estabilidad, los electrones de las capas adyacentes llenarán el espacio vacante, al pasar un electrón de otra capa y con una energía diferente al del electrón saliente hay una diferencia de energía, la cual se emite en forma de radiación de rayos X. Precisamente, este proceso de emitir rayos X es conocido como fluorescencia de rayos X. El fotón de rayos X emitido tendrá una energía específica igual a la diferencia entre las dos energías de enlace de un electrón de las capas interna y adyacente, y esta energía es única para cada elemento.

### 2.5.3. Esquema del equipo

Al identificar la longitud de onda o energía de cada una de las radiaciones características, podemos conocer los elementos que componen la muestra, y si podemos medir sus intensidades, podemos conocer sus respectivas concentraciones. El equipo instrumental que se utiliza para este fin es el espectrómetro de fluorescencia de rayos X, llamando así porque el espectro de fluorescencia policromático emitido por la muestra al ser excitada por un haz de radiación producido por un tubo de rayos X, es descompuesto en sus componentes monocromáticas en función de sus longitudes de onda, al difractarse en un monocristal de espaciado conocido. El haz difractado para cada posición angular del monocristal incide sobre un detector, generalmente un detector de gas proporcional de flujo o de centelleo, que convierte los fotones en impulsos eléctricos.

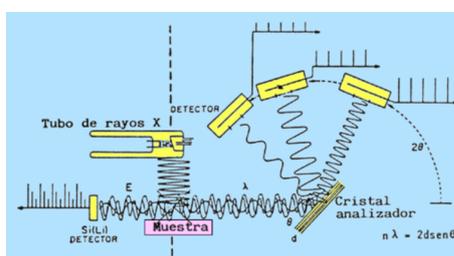


Figura 2.6: Esquema de un espectrómetro de fluorescencia de rayos X clásico.

De acuerdo con la ley de Bragg,  $n\lambda = 2dsen\theta$ , midiendo el valor del ángulo  $\theta$  al que se difracta cada una de las radiaciones que constituyen el espectro emitido por la muestra, como el espaciado  $d$  del cristal analizador es conocido, se puede calcular la longitud de onda de cada una. En los últimos años ha tenido un gran desarrollo una variante de ésta, que es la espectrometría de dispersión de energías de rayos X. Esta surge de la utilización de semiconductores, principalmente de Si(Li), como detectores de los rayos X. La relativamente elevada resolución de éstos (entre 160-180 eV) permite descomponer el espectro de fluorescencia en sus componentes monocromáticas en función de la diferencia entre sus energías. En este caso el propio detector actúa como agente separador. En un espectrómetro de dispersión de energías de rayos [Fig. 2.6], el detector recibe el espectro total emitido por todos los elementos de la muestra a la vez. Para cada fotón de rayos X incidente el detector genera un impulso eléctrico cuya altura será proporcional a la energía del fotón. Los distintos impulsos eléctricos generados son separados y almacenados en función de su valor con ayuda de un analizador de altura de impulsos multicanal.

### 2.5.4. Metales pesados

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas. Los ejemplos de metales pesados o algunos metaloides, incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb), entre otros. Los metales pesados son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes cultivos. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de

un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada a la concentración de dicho producto químico en el ambiente.

En un pequeño grado se pueden incorporar a organismos vivos (plantas y animales) por vía del alimento y lo pueden hacer a través del agua y el aire como medios de traslocación y dependiendo de su movilidad en dichos medios. Como elementos traza, algunos metales pesados [cobre (Cu), selenio (Se), zinc (Zn)] son esenciales para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos y en particular en el cuerpo humano. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento. Los metales pesados están presentes en el suelo como componentes naturales del mismo o como consecuencia de las actividades antropogénicas. En los suelos se pueden encontrar diferentes metales, formando parte de los minerales propios; como son silicio (Si), aluminio (Al), hierro (Fe), calcio (Ca), sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg). También puede encontrarse manganeso (Mn), que generalmente se presenta en el suelo como óxido y/o hidróxido, formando concreciones junto con otros elementos metálicos. Algunos de estos metales son esenciales en la nutrición de las plantas, así son requeridos algunos de ellos como el Mn, imprescindible en el fotosistema y activación de algunas enzimas para el metabolismo vegetal.

Se consideran entre los metales pesados elementos como el plomo, el cadmio, el cromo, el mercurio, el zinc, el cobre, la plata, entre otros, los que constituyen un grupo de gran importancia, ya que algunos de ellos son esenciales para las células, pero en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, organismos del suelo, plantas y animales, incluido el hombre. En la corteza terrestre existe una similitud entre la distribución de níquel (Ni), cobalto (Co) y hierro (Fe). En los horizontes superficiales del suelo (capa arable), el Ni aparece ligado a formas orgánicas, parte de las cuales pueden encontrarse formando quelatos fácilmente solubles. También de forma natural puede encontrarse el zinc (Zn) en los suelos, y es un nutriente requerido por las plantas para su desarrollo. Dentro de los metales pesados, los denominados oligoelementos, pueden servir como micronutrientes para los cultivos, ya que son requeridos en pequeñas cantidades y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasado cierto umbral se vuelven tóxicos, como el B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Fe, Se y Zn y el metaloide As. También hay metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejada disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos, elementos tales como el Cd, Hg, Pb, Sb, Bi, Sn, Tl. Cuando el contenido de metales pesados en el suelo alcanzan niveles que rebasan los límites máximos permitidos causan efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, y un disturbio funcional en otros componentes del ambiente así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo, el término que se usa o se emplea es contaminación de suelos. En el suelo, los metales pesados como iones libres, pueden tener acción directa sobre los seres vivos lo que ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. La contaminación en suelos por metales pesados ocurre cuando estos son irrigados con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales y filtraciones de presas de jales.

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías: la primera, quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo u ocupando sitios de intercambio; segunda, específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo; tercera, asociados con la materia orgánica del suelo y cuarta, precipitados como sólidos puros o mixtos. Por otra parte, pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas; pueden pasar a la atmósfera por volatilización y pueden ser movilizados a las aguas superficiales o subterránea.

### Plomo

El plomo es un metal pesado, azulado, suave y maleable, usado en varios procesos industriales. El plomo existe naturalmente en la corteza terrestre, de donde es extraído y procesado para usos diversos. Cuando el plomo es ingerido, inhalado o absorbido por la piel, resulta ser altamente tóxico para los seres vivos en general y para los humanos en particular. Se sospecha que es tóxico para los sistemas endócrino, cardiovascular, respiratorio, inmunológico, neurológico, y gastrointestinal además de poder afectar la piel y los riñones. El plomo no es biodegradable y persiste en el suelo, en el aire, en el agua y en los hogares. Nunca desaparece sino que se acumula en los sitios en los que se deposita y puede llegar a envenenar a generaciones de niños y adultos a menos que sea retirado. La exposición al plomo, aún a niveles bajos, afecta a niños y a adultos. En cantidades muy pequeñas, el plomo interfiere con el desarrollo del sistema neurológico, causa crecimiento retardado y problemas digestivos. En casos extremos causa convulsiones, colapsos e incluso la muerte. La exposición a cantidades sumamente pequeñas de plomo puede causar a largo plazo daños medibles e irreversibles en niños aún cuando éstos no muestren síntomas particulares. Se ha encontrado que una concentración de 7 microgramos de plomo por decilitro de sangre causa daños irreversibles en el sistema neurológico de los infantes. El plomo en la sangre de los niños puede provocar que un genio en potencia solo llegue a un nivel de aprovechamiento promedio o que un niño que hubiera tenido habilidades promedio quede discapacitado de por vida. Hay estudios que han relacionado una baja de 5.8 puntos en las pruebas de cociente intelectual, por cada diez microgramos por decilitro en la sangre de un niño.

El límite máximo permisible de plomo en la sangre de un niño según la Norma Oficial Mexicana, es de  $10 \mu\text{g}/\text{dL}$ , sin embargo es importante resaltar que este nivel no es seguro ni es normal, ni es deseable. Las autoridades médicas reconocen que no se ha identificado un umbral a partir del cual se presenten los efectos dañinos del plomo. La Academia Americana de Pediatría recomienda como nivel deseable de plomo en la sangre de los niños la cantidad de cero. Es importante recalcar que tampoco existe un nivel de plomo en sangre que pueda ser considerado normal. El plomo causa anemia en los niños y en los adultos al impedir la formación de moléculas que transportan el oxígeno. En los adultos, la exposición a niveles sumamente bajos de plomo causa incrementos pequeños pero significativos en la presión arterial y no existe evidencia de que haya un umbral para este efecto. También en los adultos, el plomo causa enfermedades renales y afecta la fertilidad. La hipertensión causada por la exposición al plomo, contribuye a que mueran miles de personas cada año, especialmente personas entre las edades de 35 y 50 años. Las fuentes de

contaminación por plomo son múltiples e incluyen a las fundidoras, minas, fábricas de baterías, algunas pinturas, la loza de barro vidriado cocida a baja temperatura y las gasolinas con tetraetilo de plomo (dejadas de usar en México en 1997). En nueve sistemas de clasificación de riesgo citados por el Fondo para la Defensa Ambiental o Environmental Defense Fund el plomo aparece como un material que es más peligroso que la mayoría de los productos químicos. Se le considera dentro del 10 % de los materiales más peligrosos para la salud humana.

Es recomendable vigilar los niveles del plomo en la sangre para valorar la exposición a este peligroso metal. Se recomienda tener hábitos de higiene estrictos, sobre todo en los niños para evitar que el plomo entre por la boca. Como protección se debe evitar fumar, reducir la ingestión de bebidas alcohólicas y consumir cereales, frutas y hortalizas de cultivo orgánico.

### Arsénico

Existen tres grandes grupos de compuestos de arsénico (As): a) compuestos de arsénico inorgánico; 2) compuestos de arsénico orgánico; b) gas arsina y arsinas sustituidas. El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y principalmente en los minerales sulfurosos. La arsenopirita es la forma más abundante. El arsénico elemental se utiliza en aleaciones con el fin de aumentar su dureza y resistencia al calor, como en las aleaciones con plomo para la fabricación de municiones y de baterías de polarización. También se utiliza para la fabricación de ciertos tipos de vidrio, como componente de dispositivos eléctricos y como agente de adulteración en los productos de germanio y silicio en estado sólido. El tricloruro de arsénico ( $\text{AsCl}_3$ ) se utiliza en la industria cerámica y en la fabricación de arsenicales con contenido de cloro. El trióxido de arsénico ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) o arsénico blanco se utiliza en la purificación de gases sintéticos y como materia prima para todos los compuestos de arsénico. También se utiliza como conservante de cuero y madera, como mordente en la industria textil, como reactivo en la flotación de minerales y para la decoloración y refinamiento en la fabricación del vidrio. El arsenito cálcico [ $\text{Ca}(\text{As}_2\text{H}_2\text{O}_4)$ ] y el aceto arsenito cúprico (considerado generalmente como  $\text{Cu}(\text{COOCH}_3)_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2$ ) son insecticidas. El acetoarsenito cúprico se utiliza también en la fabricación de pinturas para barcos y submarinos. El arsenito sódico ( $\text{NaAsO}_2$ ) se utiliza como herbicida, como inhibidor de la corrosión y como agente de secado en la industria textil. El trisulfuro de arsénico es un componente del cristal de transmisión de infrarrojos y un agente para eliminar el pelo en el curtido de las pieles. También se utiliza en la fabricación de material pirotécnico y de semiconductores. Aun cuando es posible que cantidades muy pequeñas de algunos compuestos de arsénico tengan un efecto benéfico, como indican algunos estudios en animales, los compuestos de arsénico, y en especial los inorgánicos, se consideran venenos muy potentes. La toxicidad aguda varía notablemente según el compuesto, dependiendo de su valencia y solubilidad en los medios biológicos. Los compuestos trivalentes solubles son los más tóxicos. La captación de compuestos de arsénico inorgánico en el tracto gastrointestinal es casi completa, aunque puede ser más lenta en las formas menos solubles, como el trióxido de arsénico en forma particular. La captación tras la inhalación es también casi completa, ya que incluso el material menos soluble depositado sobre la mucosa respiratoria se transfiere al tracto gastrointestinal, donde se absorbe. La exposición

profesional a los compuestos de arsénico inorgánico puede producirse por inhalación, ingestión o contacto con la piel, con la consiguiente absorción. Se pueden observar efectos agudos en la vía de entrada si la exposición es excesiva. La dermatitis puede surgir como síntoma agudo, pero con mayor frecuencia es resultado de la toxicidad por exposición prolongada, y en ocasiones es posterior a la sensibilización. La exposición a dosis elevadas de compuestos de arsénico inorgánico puede producirse como una mezcla de inhalación e ingestión o como resultado de accidentes en industrias en las que se manejan grandes cantidades de arsénico (por ejemplo, trióxido de arsénico). Dependiendo de la dosis, se pueden presentar diversos síntomas y, si ésta es excesiva, puede resultar fatal. Se han observado síntomas de conjuntivitis, bronquitis y disnea, seguidos por molestias gastrointestinales y vómitos, y posteriormente, síntomas cardíacos y shock irreversible, con un curso temporal de horas. En un caso fatal, se describieron niveles de arsénico en sangre superiores a 3 mg/l. La exposición a dosis subletales de compuestos de arsénico irritantes en el aire (por ejemplo, el trióxido de arsénico) puede producir síntomas relacionados con lesiones agudas en las membranas mucosas del aparato respiratorio y síntomas agudos por exposición cutánea. En estos casos, se observa una irritación grave de la mucosa nasal, la laringe y los bronquios, además de conjuntivitis y dermatitis. En algunos individuos se pueden observar perforaciones del tabique nasal algunas semanas después de la exposición. Se cree que la exposición reiterada permite desarrollar cierta tolerancia contra la intoxicación aguda. Sin embargo, este fenómeno no está bien documentado en la literatura científica. Se han descrito efectos debidos a la ingestión accidental de arsenicales inorgánicos, fundamentalmente de trióxido de arsénico. Sin embargo, es muy raro que se produzcan este tipo de accidentes en la industria actual. La intoxicación se caracteriza por profundas lesiones gastrointestinales, que originan vómitos y diarrea graves, que pueden producir shock y la subsiguiente oliguria y albuminuria. Otros síntomas agudos son el edema facial, calambres musculares y alteraciones cardíacas. Los síntomas pueden aparecer unos minutos después de la exposición al tóxico en solución, pero pueden retrasarse varias horas si el compuesto de arsénico se encuentra en estado sólido o si se ha ingerido con una comida. Cuando se ingiere en forma de partículas, la toxicidad depende también de la solubilidad y del tamaño de las partículas del compuesto ingerido. La dosis letal de trióxido de arsénico ingerido oscila entre 70 y 180 mg. La muerte puede sobrevenir en un plazo de 24 horas, aunque el curso habitual es de 3 a 7 días. La intoxicación aguda con compuestos de arsénico suele ir acompañada de anemia y leucopenia, especialmente granulocitopenia. En los supervivientes, dichos efectos revierten generalmente en 2 ó 3 semanas. También se observa hepatomegalia reversible, pero las pruebas de función hepática y las enzimas hepáticas suelen ser normales. En las personas que sobreviven a una intoxicación aguda, es frecuente que aparezcan alteraciones neurológicas periféricas algunas semanas después de la ingestión. La intoxicación crónica con arsénico puede presentarse en trabajadores expuestos durante un tiempo prolongado a concentraciones excesivas de compuestos de arsénico en suspensión aérea. Los rasgos más sobresalientes son los efectos locales sobre la mucosa del tracto respiratorio y la piel. También puede afectar a los sistemas nervioso y circulatorio y al hígado, y puede llegar a producirse cáncer del tracto respiratorio. En el caso de una exposición a largo plazo al arsénico a través de la comida, el agua o la medicación, los síntomas son en cierto modo distintos de los que surgen tras la exposición por inhalación. Do-

minan en el cuadro clínico los síntomas abdominales vagos: diarrea o estreñimiento, enrojecimiento de la piel, pigmentación e hiperqueratosis. Además, puede producirse una afectación vascular, que en una región dio lugar a gangrena periférica. En la intoxicación crónica por arsénico son habituales la anemia y la leucopenia. La afectación hepática se ha observado con mayor frecuencia en las personas expuestas durante largo tiempo por vía oral que en las expuestas por inhalación, especialmente en los trabajadores de viñedos, cuya vía de exposición principal parece ser el vino contaminado. Existe una mayor incidencia de cáncer de la piel en este tipo de intoxicación. La exposición prolongada al arsénico inorgánico por la ingestión de agua puede dar lugar a trastornos vasculares periféricos con fenómeno de Raynaud. En un área de Taiwan, China, se observó gangrena periférica (la llamada enfermedad del pie negro). En las personas expuestas profesionalmente no se han observado manifestaciones tan graves en la vasculatura periférica, pero en los trabajadores expuestos durante largo tiempo a arsénico inorgánico suspendido en el aire se han observado cambios leves con fenómeno de Raynaud y una mayor prevalencia de baja presión sanguínea periférica en condiciones de frío.

Los arsenicales orgánicos, como los que se utilizan en pesticidas y medicamentos, también pueden ser tóxicos, aunque sus efectos adversos no están totalmente documentados en humanos. Se han descrito efectos tóxicos en el sistema nervioso de animales experimentales tras la administración en la alimentación de dosis elevadas de ácido arsanílico, que se utiliza frecuentemente como aditivo en los piensos para aves y porcinos. Los compuestos de arsénico orgánico que se encuentran en alimentos de origen marino, como los camarones, los cangrejos y los peces están en forma de arsinocolina y arsinobetaina. Se sabe que las cantidades de arsénico orgánico presentes en pescados y mariscos pueden consumirse sin efectos nocivos. Estos compuestos se excretan rápidamente, principalmente en la orina. Se ha descrito un gran número de casos de intoxicación aguda con un alto índice de mortalidad. La arsina es uno de los agentes hemolíticos más potentes en la industria. Su actividad hemolítica se debe a su capacidad para reducir drásticamente el contenido de glutatión de los eritrocitos. Los signos y síntomas de la intoxicación por arsina se relacionan principalmente con la hemólisis, que se desarrolla tras un período de latencia que depende de la intensidad de la exposición. La inhalación de 250 ppm de gas arsina es letal instantáneamente. La exposición de 25 a 50 ppm durante 30 minutos es letal y a 10 ppm puede ser letal si la exposición es más prolongada. Los signos y síntomas de la intoxicación son los característicos de una hemólisis aguda y masiva. Inicialmente, se produce una hemoglobinuria indolora, trastornos gastrointestinales, como náuseas, y posiblemente vómitos. También pueden presentarse cólicos y dolor abdominal. A continuación, se observa ictericia, acompañada por anuria y oliguria. Pueden existir indicios de depresión de la médula ósea. Tras una exposición aguda e intensa, se puede desarrollar neuropatía periférica, que puede persistir durante varios meses después de la intoxicación. Se sabe poco sobre la exposición repetida o crónica a la arsina, pero puesto que el gas arsina se metaboliza a arsénico inorgánico en el organismo, se puede suponer que existe el riesgo de síntomas similares a los de una exposición prolongada a los compuestos de arsénico inorgánico. Para el diagnóstico diferencial se debe tener en cuenta la anemia hemolítica aguda, que puede deberse a otros agentes químicos, como la estibina, o a otros fármacos, y las anemias immunohemolíticas secundarias. Las arsinas sustituidas no producen hemólisis co-

mo efecto principal, pero son potentes irritantes locales y pulmonares y venenos sistémicos. El efecto local sobre la piel produce ampollas circunscritas en el caso de la dicloro(2-clorovinil-)arsina (lewisita). Los vapores producen tos espasmódica con esputos densos o con sangre, que progresa como edema pulmonar agudo. El dimercaprol (BAL) es un antídoto eficaz si se administra en las primeras etapas de la intoxicación.

## Cobre

El cobre (Cu) es maleable y dúctil, un excelente conductor del calor y la electricidad, y su capacidad funcional se altera muy poco con la exposición al aire seco. Si se encuentra en una atmósfera húmeda con anhídrido carbónico, se cubre con una capa verde de carbonato. El cobre es un elemento esencial del metabolismo humano. El cobre se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales en los que el  $^{63}\text{Cu}$  constituye el 69.1 % y el  $^{65}\text{Cu}$  el 30.9 % del elemento. El cobre está ampliamente distribuido en todos los continentes y forma parte de la mayoría de los organismos vivos. Aunque se han descubierto algunos depósitos naturales de cobre metálico, generalmente se extrae en forma de sulfuros, como es el caso de la covelita ( $\text{CuS}$ ), la calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y la bornita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_3$ ); o de óxidos, como la malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ); la crisocola ( $\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y la calcantita ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Debido a sus propiedades eléctricas, más del 75 % del cobre que se produce se utiliza en la industria eléctrica. Entre otros usos de este metal se encuentra la fabricación de cañerías para el agua, material para techumbres, baterías de cocina, equipos químicos y farmacéuticos y producción de aleaciones de cobre. El cobre metálico también se utiliza como pigmento y como precipitante del selenio. Las aleaciones no ferrosas más ampliamente utilizadas son las de cobre y zinc (latón), estaño (bronce), níquel (metal monel), aluminio, oro, plomo, cadmio, cromo, berilio, silicón o fósforo. El sulfato de cobre se utiliza como algicida y molusquicida en el agua; como fungicida vegetal, mezclado con cal; como mordente en galvanoplastia; como agente espumante para la separación por flotación del mineral de sulfuro de zinc; y como agente para el curtido del cuero y la conservación de pieles. El sulfato de cobre neutralizado con cal hidratada, conocido como mezcla de Burdeos, se utiliza para la prevención del mildiu en viñedos. El óxido cúprico se ha utilizado como componente de las pinturas para los fondos de las embarcaciones y como pigmento para vidrio, cerámica, esmaltes, vitrificado de porcelanas y gemas artificiales. También se utiliza en la fabricación de rayón y otros compuestos de cobre, como agente para el pulido de cristales ópticos y como disolvente para los minerales de cromo y hierro. El óxido cúprico se utiliza como componente del fundente en la metalurgia del cobre, en los compuestos pirotécnicos, en los fundentes para la soldadura del bronce y en productos agrícolas, como insecticidas y fungicidas. El óxido cúprico negro se utiliza para corregir las deficiencias de cobre en el suelo y como complemento de piensos. Los cromatos de cobre son pigmentos, catalizadores para la hidrogenación en fase líquida y fungicidas para las patatas. Una solución de hidróxido cúprico con un exceso de amoníaco se utiliza como disolvente de la celulosa en la fabricación del rayón (viscosa). El hidróxido cúprico se utiliza en la fabricación de los electrodos de baterías y para el tratamiento y la coloración del papel. También se utiliza como pigmento, aditivo para piensos, mordente para teñir textiles y como componente de fungicidas

e insecticidas. Los complejos aminados de clorato cúprico, ditionato cúprico, azida cúprica y acetilidos cuprosos son explosivos, pero no son importantes desde el punto de vista industrial o sanitario. El acetiluro de cobre ha sido causa de explosiones en las fábricas de acetileno, por lo que se ha eliminado el uso del cobre en la construcción de dichas plantas. Fragmentos de cobre metálico o de aleaciones de cobre pueden alojarse en los ojos, produciendo lo que se conoce como chalcosis, que puede dar lugar a uveítis, abscesos y pérdida de los ojos. Los trabajadores que fumigan los viñedos con la mezcla de Burdeos pueden padecer lesiones pulmonares (conocidas como pulmón de fumigador de viñedos) y granulomas hepáticos cargados de cobre. La ingestión accidental de sales de cobre solubles es generalmente inocua, ya que la inducción del vómito libera al paciente de gran parte del cobre. A pesar de que en los trabajos químicos de referencia se indica que las sales de cobre son tóxicas, en la práctica esto sólo es cierto cuando las disoluciones se utilizan de forma incontrolada, con fines suicidas o como tratamiento tópico de áreas con quemaduras graves. Cuando se ingiere sulfato de cobre, también conocido como piedra azul o azul vitriolo, en cantidades del orden de gramos, se producen náuseas, vómitos, diarrea, sudoración, hemólisis intravascular y posible fallo renal; en raras ocasiones, se observan también convulsiones, coma y la muerte. Cuando se beben aguas carbonatadas o zumos de cítricos que han estado en contacto con recipientes, cañerías, grifos o válvulas de cobre se puede producir irritación del tracto gastrointestinal, que pocas veces llega a ser grave. Este tipo de bebidas son suficientemente ácidas para disolver niveles de cobre irritantes. Existe un informe de úlceras corneales e irritación cutánea, con baja toxicidad de otro tipo, en un minero de cobre que cayó en un baño electrolítico, aunque la causa pudo haber sido la acidez más que el cobre. En algunos casos en que se utilizaron sales de cobre para el tratamiento de quemaduras, se observaron concentraciones elevadas de cobre sérico y manifestaciones tóxicas. La inhalación de polvos, humos o nieblas de sales de cobre puede causar congestión nasal y de las mucosas, y ulceración con perforación del tabique nasal. Los humos desprendidos durante el calentamiento del cobre metálico pueden producir fiebre, náuseas, gastralgias y diarrea. Los efectos tóxicos crónicos atribuibles al cobre sólo parecen existir en personas que han heredado una pareja específica de genes recesivos autosómicos y que, como consecuencia, desarrollan una degeneración hepatolenticular (enfermedad de Wilson). La mayor parte de la alimentación diaria que consume el hombre contiene de 2 a 5 mg de cobre, que prácticamente no se retiene en el organismo. El contenido corporal de cobre en una persona adulta es de 100 a 150 mg y es casi constante. En individuos normales (sin enfermedad de Wilson), casi todo el cobre está presente como parte integrante y funcional de una docena de proteínas y sistemas enzimáticos, como el citocromo oxidasa, la dopaoxidasa y la ceruloplasmina sérica. En personas que ingieren grandes cantidades de ostras o mariscos de concha, hígado, setas, nueces y chocolate, alimentos todos ellos ricos en cobre, o en mineros que trabajan y comen durante 20 años o más en un ambiente cargado con un 1 ó 2% de polvo de minerales de cobre, pueden llegar a observarse concentraciones hasta 10 veces superiores a lo normal. Sin embargo, aún no se ha descrito ningún caso de toxicidad crónica primaria por cobre (perfectamente definida a partir de las observaciones de pacientes con toxicosis por cobre crónica heredada como disfunción y lesiones estructurales hepáticas, del sistema nervioso central, de los riñones, los huesos y los ojos) excepto en personas que padecen la enfermedad de Wilson. Sin

embargo, los depósitos excesivos de cobre hallados en el hígado de pacientes con cirrosis biliar primaria, colestasis y cirrosis infantil de la India pueden contribuir a la gravedad de la enfermedad hepática característica de estos procesos.

## Níquel

El níquel (Ni) representa entre un 5 y un 50 % del peso de los meteoritos y se encuentra en forma de minerales, combinado con azufre, oxígeno, antimonio, arsénico y/o sílice. Los depósitos de minerales de importancia comercial están constituidos principalmente por óxidos (como minerales de laterita que contienen óxidos de níquel y hierro mezclados) y sulfuros. La pentlandita el principal mineral de sulfuro, se deposita habitualmente junto con pirrotita, calcopirita y pequeñas cantidades de cobalto, selenio, telurio, plata, oro y platino. Los principales depósitos de minerales de níquel se encuentran en Canadá, Rusia, Australia, Nueva Caledonia, Indonesia y Cuba. A los minerales sulfuro que contienen níquel, cobre y hierro, se aplican métodos mecánicos de concentración, como la flotación y la separación magnética, después de triturar y moler el mineral. El concentrado de níquel se convierte en residuo sulfurado de níquel mediante calcinación o sinterización. A continuación, este residuo sulfurado se refina por electrólisis o mediante el proceso Mond. Durante el mismo, el residuo se somete a triturado y calcinación y se trata con monóxido de carbono a 50 °C para formar níquel carbonilo gaseoso ( $\text{Ni}(\text{CO})_4$ ), que se descompone a temperaturas de entre 200 y 250 °C para depositar el polvo de níquel puro. La producción mundial de níquel es de aproximadamente 70 millones de kg/año. El níquel y los compuestos de níquel se encuentran entre las causas más frecuentes de dermatitis alérgicas por contacto. Este problema no se limita a las personas expuestas profesionalmente a los compuestos de níquel, sino que se observa en la población en general debido a la exposición al níquel contenido en monedas, joyas, relojes y aprestos de tejidos. En las personas expuestas al níquel, la dermatitis comienza generalmente como un eritema papular en las manos. La piel se vuelve gradualmente eczematosa y, en la fase crónica, suele desarrollarse liquenificación. La sensibilización al níquel también produce conjuntivitis, neumonitis eosinófila y reacciones locales o sistémicas a las prótesis que contienen níquel (por ejemplo, clavos intraóseos, piezas dentarias, válvulas cardíacas artificiales y cables de los marcapasos). La ingestión de agua contaminada con níquel o de alimentos ricos en níquel puede exacerbar el eczema de las manos en las personas sensibles a este metal. Los trabajadores de las refinerías de níquel y de las industrias de galvanoplastia expuestos a la inhalación de polvo de níquel o aerosoles de compuestos solubles de níquel pueden desarrollar enfermedades crónicas de las vías respiratorias altas, como rinitis hipertrófica, sinusitis nasal, anosmia, poliposis nasal y perforación del tabique nasal. Los estudios epidemiológicos realizados sobre trabajadores de refinerías de níquel en Canadá, Gales, Alemania, Noruega y Rusia ponen de manifiesto un aumento en la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón y de las cavidades nasales. También se ha descrito una mayor incidencia de otro tipo de tumores malignos, como carcinomas de la laringe, riñón, próstata o estómago y sarcoma de tejidos blandos en determinados grupos de trabajadores de las refinerías de níquel, aunque es discutible la significación estadística de estas observaciones. El aumento del riesgo de cáncer de pulmón y de las cavidades nasales se ha observado principalmente en los trabajadores que

participan en los procesos que conllevan una elevada exposición al níquel, como la calcinación, fundido y electrólisis. Aunque el riesgo de este tipo de cánceres se ha asociado generalmente con la exposición a los compuestos insolubles de níquel, como el subsulfuro o el óxido de níquel, también se ha relacionado con la exposición a compuestos solubles de níquel durante los procesos de electrólisis. Los estudios epidemiológicos sobre el riesgo de cáncer entre los trabajadores de las industrias en que se utiliza el níquel arrojan, por lo general, resultados negativos, pero estudios más recientes ponen de manifiesto un riesgo de cáncer de pulmón ligeramente superior entre los trabajadores que participan en los procesos de soldadura, triturado y galvanizado, y en la fabricación de baterías. En efecto, suelen estar expuestos a polvo y humos que contienen mezclas de metales cancerígenos, como níquel y cromo o níquel y cadmio. Basándose en una evaluación de los estudios epidemiológicos, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) concluyó en 1990 que: existen pruebas suficientes en humanos del potencial cancerígeno del sulfato de níquel y de las combinaciones de sulfuros y óxidos de níquel presentes en la industria del refinado del níquel. No existen, sin embargo, pruebas concluyentes en humanos de la carcinogenicidad del níquel y sus aleaciones.

## 2.6. Espectrofotometría UV-Vis

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano). En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas. Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado.

### 2.6.1. Aplicaciones

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa y cualitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

- Las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos. Por ejemplo, el color de una solución diluida de sulfato de cobre es muy azul; agregando amoníaco se intensifica el color y cambia la longitud de onda de absorción máxima.
- Los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos

orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico. La tirosina, por ejemplo, aumenta su máximo de absorción y su coeficiente de extinción molar cuando aumenta el pH de 6 a 13, o cuando disminuye la polaridad de los disolventes.

Aunque los complejos de transferencia de carga también dan lugar a colores, éstos son a menudo demasiado intensos para ser usados en mediciones cuantitativas. La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV-VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración.

El espectrofotómetro UV/Vis puede utilizarse como detector para la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). La presencia de un analito da una respuesta que puede ser proporcional a la concentración. Para resultados precisos, la respuesta del instrumento al analito debe compararse con la respuesta a un estándar, lo que es muy similar al uso de curvas de calibración. La respuesta (por ejemplo, el pico de altura) para una concentración particular se conoce como factor de respuesta.

### 2.6.2. Ley de Beer-Lambert

La espectrometría UV-Vis se utiliza con mayor frecuencia en forma cuantitativa para determinar las concentraciones de especies absorbentes en solución, usando la Ley de Beer-Lambert:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon cL \quad (2.1)$$

donde  $A$  es la absorbancia medida,  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda,  $I$  es la intensidad de transmisión,  $L$  la longitud de ruta a través de la muestra, y  $c$  la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda,  $\epsilon$  es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular.

La absorbancia y extinción  $\epsilon$  a veces son definidas en términos de logaritmo natural en lugar de logaritmo de base 10.

La ley de Beer-Lambert es útil para la caracterización de muchos compuestos, pero no sirve como relación universal para la concentración y absorción de todas las sustancias. En moléculas complejas de gran tamaño, como los tintes orgánicos (Xylenol Naranja o Rojo Neutro, por ejemplo), a veces se encuentra una relación polinómica de segundo orden entre la absorción y la concentración.

### 2.6.3. Esopectrofotómetro ultravioleta-visible

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se llama espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra ( $I$ ), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra ( $I_0$ ). La relación  $I / I_0$  se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje.

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz, y un detector. El detector suele ser un fotodiodo o un CCD. Los fotodiodos se usan con monocromadores, que filtran la luz de modo que una sola longitud de onda alcanza el detector. Las rejillas de difracción se utilizan con CCDs, que recogen la luz de diferentes longitudes de onda en píxeles.

Un espectrofotómetro puede ser único o de doble haz. En un instrumento de un solo haz, toda la luz pasa a través de la célula muestra. La  $I_0$  debe medirse retirando la muestra. Este fue el primer diseño, y todavía está en uso en la enseñanza y laboratorios industriales.

En un instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar a la muestra. Un haz se utiliza como referencia, y el otro haz de luz pasa a través de la muestra. Algunos instrumentos de doble haz tienen dos detectores (fotodiodos), y el haz de referencia y el de la muestra se miden al mismo tiempo. En otros instrumentos, los dos haces pasan a través de un bloqueador que impide el paso de un haz. El detector alterna entre la medida del haz de muestra y la del haz de referencia.

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas, aunque la absorbancia de los gases e incluso de los sólidos también puede medirse. Las muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de ruta,  $L$ , en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.

### 2.6.4. Espectro UV-Vis

Un espectro ultravioleta-visible es esencialmente un gráfico de absorbancia de luz frente a una longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible. Este espectro puede ser producido directamente con los espectrofotómetros más sofisticados, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples. La longitud de onda se representa con el símbolo  $\lambda$ . Del mismo modo, para una determinada sustancia, puede hacerse un gráfico estándar del coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) frente a la longitud de onda ( $\lambda$ ). Este gráfico estándar sería efectivamente la concentración corregida y, por tanto, independiente de la concentración. Para una sustancia determinada, la longitud de onda en la cual se produce el máximo de absorbancia en el espectro se llama  $\lambda_{max}$ .

Las reglas de Woodward-Fieser son un conjunto de observaciones empíricas que pueden utilizarse para predecir  $\lambda_{max}$ , la longitud de onda de la absorción UV-Vis, para compuestos orgánicos conjugados como dienos y cetonas.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es, sin embargo, una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en la anchura de la hendidura (ancho de banda efectivo) en el espectrofotómetro.



# Capítulo 3

## Metodología

### 3.1. Lugar de recolección botánica

La investigación botánica se llevo a cabo en las comunidades Laguna del Carretero (longitud: -102.805000, latitud: 22.279722. [*Phoradendron villosum* Nutt.].) y Río Florido (longitud: -102.989722, latitud: 23.344167. [*Croton dioicus* Cav.].) de los municipios de Villanueva y Fresnillo respectivamente, en el estado de Zacatecas. La identificación de ambas plantas fue realizada por el Dr. José de Jesús Balleza Cadenango docente de la Unidad Académica de Agronomía perteneciente a la Universidad Autónoma de Zacatecas.

### 3.2. Análisis elemental

#### 3.2.1. Preparación del material botánico

Se limpiaron y lavaron todas las partes de las plantas (tronco, flor y hojas) con abundante agua para quitar impurezas del medio ambiente. Se dejaron secar a temperatura ambiente con circulación de aire por 3 días. Después del secado las muestras se trituraron en un molino de cuchillas rotatorias.

#### 3.2.2. Calibración del equipo

Se midieron muestras estándares en polvo certificadas por el NIST con diferentes concentraciones para generar una curva de calibración para Cu, As, Ni y Pb.

#### 3.2.3. Medición

Las muestras molidas de cada planta se depositaron en porta muestras y a continuación se colocaron dentro del espectrómetro de dispersión de rayos X MiniPal marca Philips modelo Pw4051 con lampara de Rodio (Detector SDD, Resolución del detector <160 eV MnK $\alpha$ , Rango de energía 0-24 keV.). Con ayuda del software MiniPal-Minimate se obtuvo la composición predominante de las plantas y el contenido de metales pesados [33, 34].



(a) Portamuestras.

(b) Espectrómetro.

Figura 3.1: Instrumentación para espectrometría de dispersión de rayos X.

Elemento	Rango normal (ppm)
As	5-40
Cu	0-60
Ni	2-110
Pb	10-150

Cuadro 3.1: Concentraciones normales de algunos metales pesados en plantas.

### 3.3. Extractos botánicos

#### 3.3.1. Limpieza del material botánico

Se lavaron todas las partes de las plantas y se eliminaron cuerpos extraños. A continuación se cortaron pedazos pequeños de 1-2 cm que se dejaron secar a temperatura ambiente con circulación de aire por 16 días.

#### 3.3.2. Obtención de extractos madre

Las plantas secas se sometieron a cuatro extracciones: agua, alcohol-agua, alcohol etílico y aceite de pepita. Para el extracto alcohol-agua se llenó al 60 % de capacidad cada frasco con material botánico y del volumen total de cada envase se llenó con 90 % de agua corriente y 10 % de alcohol. En el extracto alcohólico se llenó con muestras botánicas de la misma manera que el extracto alcohol-agua y el volumen total del envase se llenó con alcohol. Para el extracto con aceite de pepita se usaron las muestras trituradas para llenar los frascos al 50 %, a continuación se llenó con aceite de pepita a un 75 % del volumen para luego ser puesto a baño María a una temperatura de 85° a 95° C durante 30 minutos. Los extractos previamente descritos permanecieron en reposo durante 30 días [31].

El extracto con agua se preparó llenando frascos al 60 % de su capacidad con material botánico y el volumen total se llenó con agua corriente previamente calentada a 90 °. El extracto se dejó en reposo durante 3 días [31].

### 3.4. Determinación de metabolitos secundarios

A partir de los extractos se desarrollaron las pruebas bioquímicas para la identificación de los compuestos presentes.

#### 3.4.1. Flavonoides

##### Prueba de Shinoda

Para la realización de esta prueba se colocaron 20 gotas de los diferentes extractos en tubos de ensaye, se agregaron de 2 a 3 virutas de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, para finalmente observar el cambio de coloración que varió con respecto al tipo de flavonoides de la muestra.

Tipo de flavonoides	Color de la reacción
Flavonas y flavonoles	Amarillo a rojo
Flavanonoles	Rojo a magenta
Flavanonas	Azul magenta, violeta, rojo
Isoflavonas	Amarillo rojizo
Isoflavononas, auronas, chalconas	No hay cambio de color

Cuadro 3.2: Interpretación colorimétrica de flavonoides en la muestra.

##### Prueba de reactivo alcalino

Para esta prueba se requirió 1 mL de extracto, al que se le añadieron unas gotas de hidróxido de sodio diluido. Un color amarillo intenso se produjo en el extracto de las plantas, que se vuelve incoloro tras la adición de unas pocas gotas del hidróxido; esta coloración amarilla intensa indica presencia de flavonoides altamente hidroxilados.

#### 3.4.2. Carbohidratos

##### Prueba de lugol

Para su realización, se tomó 1 mL de cada uno de los extractos en tubos de ensaye y se les añadió de 2 a 3 gotas de solución de lugol. Si se observa un color azulado-violeta en la mezcla, será positivo a la presencia de polisacáridos.

#### 3.4.3. Alcaloides

##### Prueba de Mayer

Para esta prueba se añadieron 1.2 mL de cada uno de los extractos, se añadieron 0.2 mL de ácido clorhídrico diluido 1:1 con agua tridestilada y 0.1 mL de reactivo de Mayer (1.358 gr. de bicloruro de mercurio y 5 gr. de yoduro de potasio por cada 100 ml. de agua destilada). La formación de precipitado de color amarillento confirma la presencia de alcaloides.

## 3.5. Espectrofotometría UV-Vis

### 3.5.1. Preparación de extractos

Se prepararon diluciones 1:5, 1:10, 1:100 y 1:200 de cada uno de los extractos debido a la alta concentración de metabolitos. Se diluyó con agua trdestilada, alcohol etílico, alcohol-agua (1:1) y aceite de pepita de uva respectivamente para cada extracto.

### 3.5.2. Medición

Las diluciones de cada extracto se depositaron en cubetas de cuarzo para su medición. Antes, se usó un blanco para cada extracto para poder generar las curvas. Las lecturas se llevarón a cabo en un espectrómetro serie 67 modelo 6700 marca Jenway (Rango de longitud de onda 180-1100nm, resolución de longitud de onda 0.1nm, resolución 0.1% T, 0.001A.) en un rango de 180 a 800 nm, sabiendo que cada metabolito se encuentra en una región determinada del espectro [31, 32].

Metabolito secundario	Rango de $\lambda$ (nm)
Flavonoides	200-300
Alcaloides	300-390
Carotenoides	400-500
Taninos	500-600
Clorofila	620-690

Cuadro 3.3: Rangos del espectro donde se encuentran algunos metabolitos secundarios.



(a) Cubeta de cuarzo.

(b) Espectrómetro UV-Vis.

Figura 3.2: Instrumentación para espectrometría UV-Vis.

# Capítulo 4

## Resultados

### 4.1. Composición y metales pesados

El análisis cualitativo de los elementos está comprendido entre el sodio y el plutonio. La planta *Phoradendron villosum* muestra en su espectro de energías una composición de potasio, calcio, hierro y manganeso con mayor proporción [Fig. 4.1]. El pico de rodio se debe a la emisión de la lampara del espectrómetro.

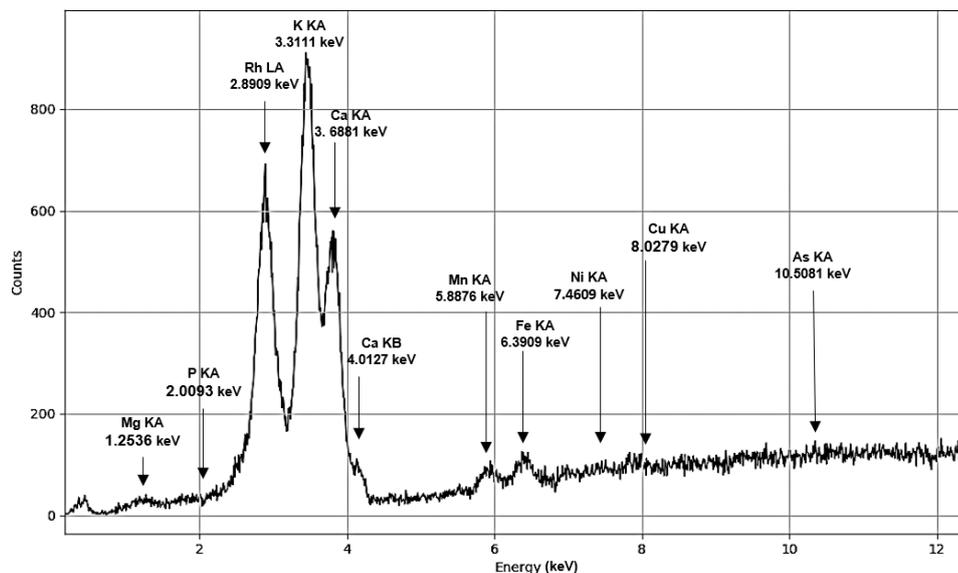


Figura 4.1: Composición de la planta *Phoradendron villosum* en función del espectro de energía.

El análisis de metales pesados mostró que la planta *Phoradendron villosum* contiene cobre, arsénico y níquel, sin mostrar niveles de plomo [Fig. 4.2]. Debido a que la planta no es consumida directamente, se realizó el estudio de metales para ver que porcentaje pasa a cada extracto. El contenido de cobre inicialmente era de 123.221 ppm, pasando a los extractos entre 4 y 4.5 ppm, equivalente a un rango de 3 a 3.6 %. El arsénico presentó niveles de 13.257 ppm quedando entre 0.06 y 0.7 %. El níquel paso a los extractos con un porcentaje entre 2 y 2.5 % [Fig. 4.3].

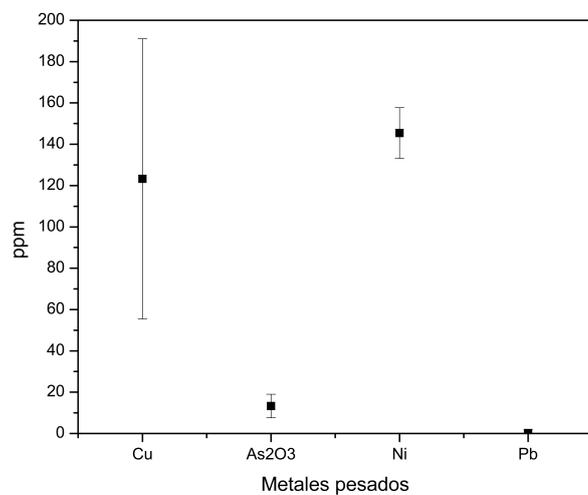
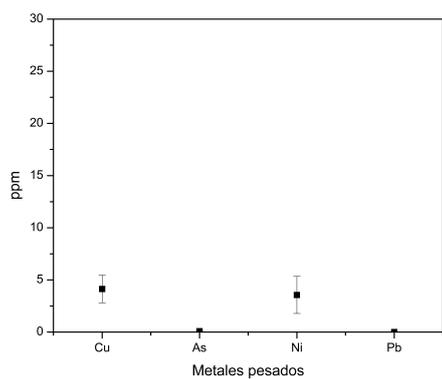
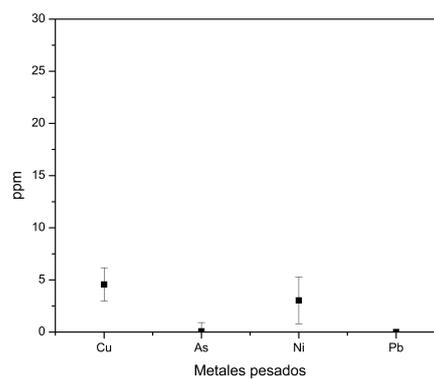


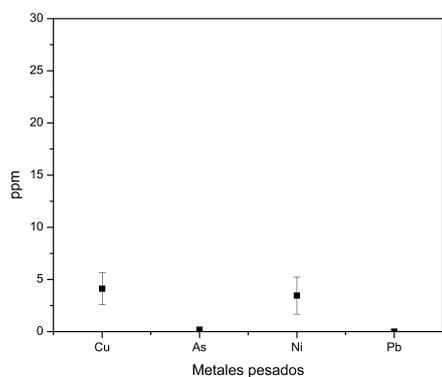
Figura 4.2: Metales pesados presentes en *Phoradendron villosum*.



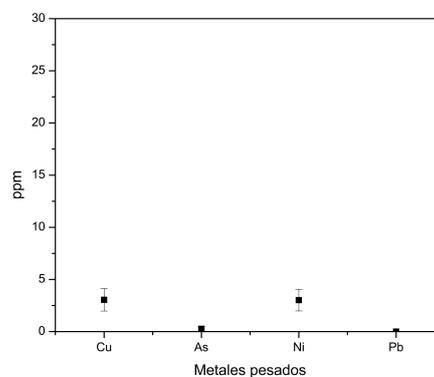
(a) Extracto en agua.



(b) Extracto en alcohol.



(c) Extracto en alcohol-agua.



(d) Extracto en aceite.

Figura 4.3: Metales pesados absorbidos en extractos de *Phoradendron villosum*.

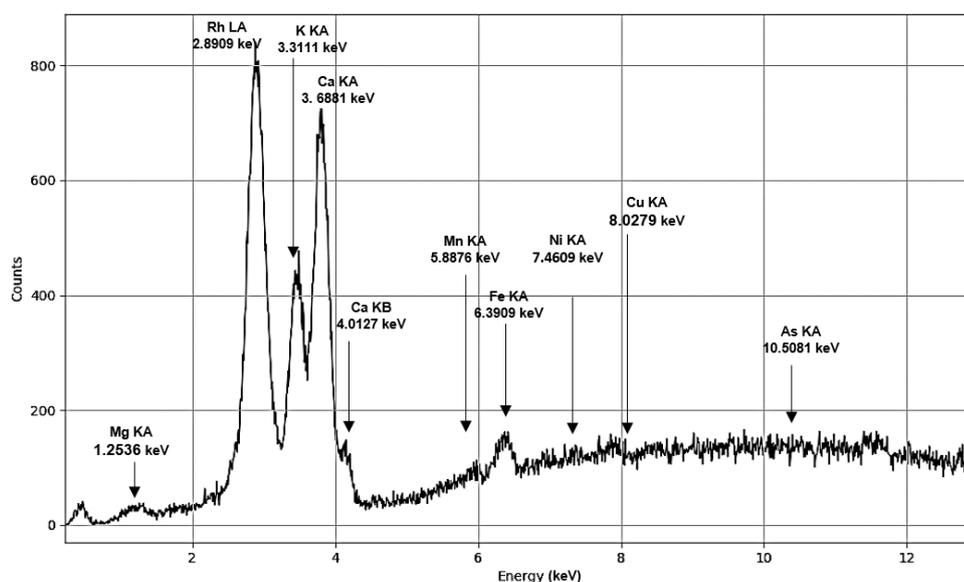


Figura 4.4: Composición de la planta *Croton dioicus* en función del espectro de energía.

La planta *Croton dioicus* tiene como elementos predominantes el potasio, hierro y calcio [Fig. 4.4]. El análisis de metales pesados mostró que la planta contiene niveles similares de arsénico a *Phorandendron villosum*, así como niveles menores de cobre y níquel, además para el estudio de plomo los resultados fueron negativos [Fig. 4.5]. El contenido porcentual de cobre en los extractos oscila entre 3 y 4.5 % con respecto al encontrado en la planta. El arsénico presentó niveles entre 1.2 y 3.5 % y el níquel paso a los extractos con un porcentaje entre 2.8 y 3.7 % [Fig. 4.6].

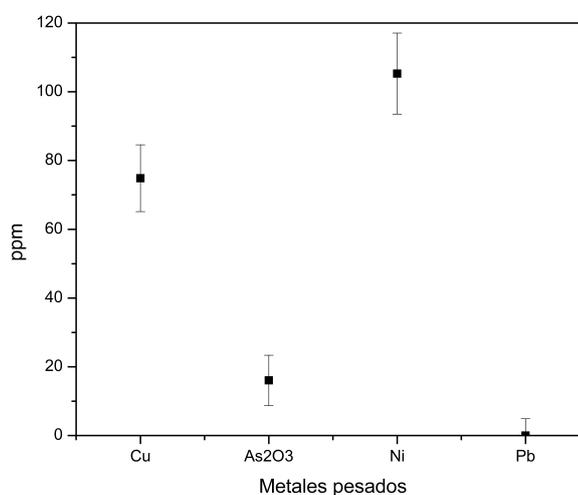
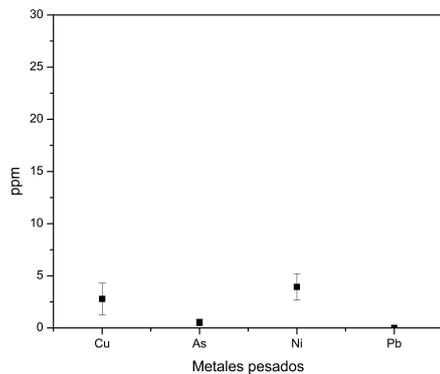
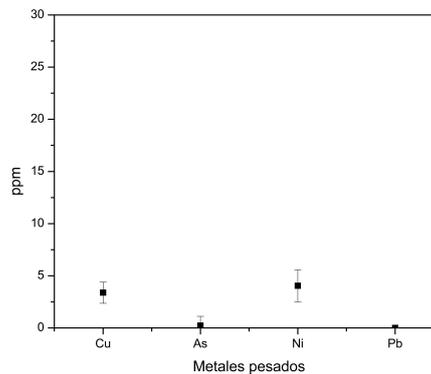


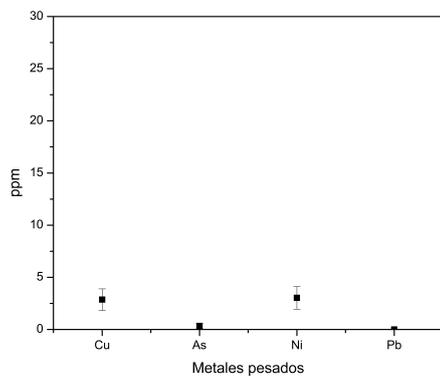
Figura 4.5: Metales pesados presentes en *Croton dioicus*.



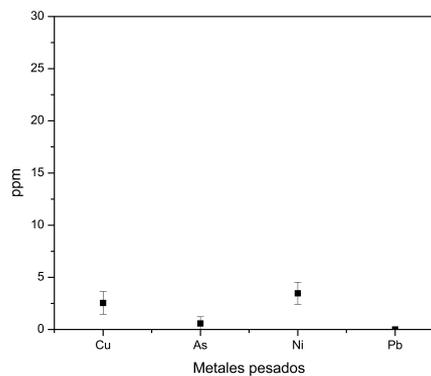
(a) Extracto en agua.



(b) Extracto en alcohol.



(c) Extracto en alcohol-agua.



(d) Extracto en aceite.

Figura 4.6: Metales pesados absorbidos en extractos de *Croton dioicus*.

## 4.2. Análisis fitoquímico

Para la determinación parcial de los compuestos responsables de la actividad biológica, se efectuaron reacciones químicas indicativas de la presencia de grupos funcionales, tomando como estándares los extractos.



Figura 4.7: En la parte superior se muestran los extractos de *Phoradendron villosum* y debajo los extractos de *Croton dioicus*. De izquierda a derecha se tienen los extractos en agua, alcohol, alcohol-agua y aceite respectivamente.

Los resultados obtenidos de los extractos en agua (a), alcohol (al), alcohol-agua (aa) y aceite de pepita (ac), revelaron la presencia de flavonoides y alcaloides en ambas muestras como se muestra a continuación:

Grupo funcional	Extracto a	Extracto al	Extracto aa	Extracto ac
Carbohidratos	-	-	-	-
Flavonoides hidroxilados	+	-	-	+
Flavonoides	+	-	+	-
Alcaloides	+	+	+	+

Cuadro 4.1: Resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales de los extractos de *Phoradendron villosum*.

Grupo funcional	Extracto a	Extracto al	Extracto aa	Extracto ac
Carbohidratos	-	-	-	-
Flavonoides hidroxilados	+	+	+	+
Flavonoides	-	+	-	+
Alcaloides	+	-	-	-

Cuadro 4.2: Resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales de los extractos de *Croton dioicus*.

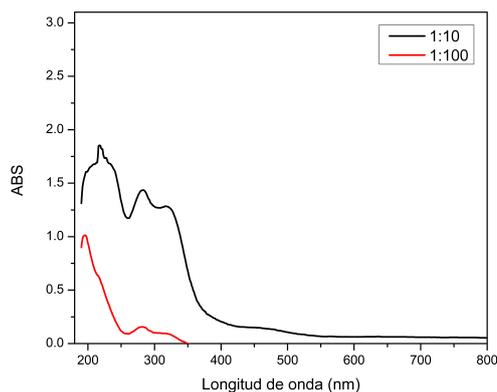
La prueba de Shinoda para los extractos mostró los siguientes resultados:

<b>Extracto</b>	<b><i>Phoradendron v.</i></b>	<b><i>Croton d.</i></b>
Agua	Flavanonas y flavanoles	Isoflavononas, auronas y chalconas
Alcohol	Isoflavononas, auronas y chalconas	Flavanonoles
Alcohol-agua	Flavonas y flavonoles	-
Aceite	Isoflavononas, auronas y chalconas	Flavonas y flavonoles

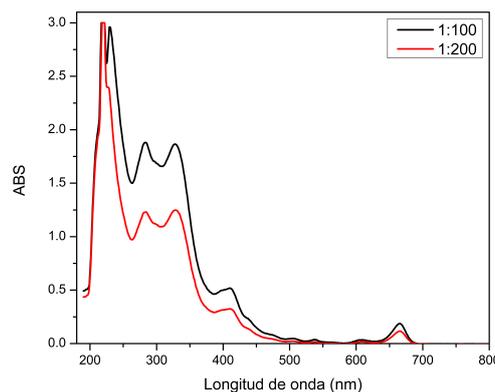
Cuadro 4.3: Resultados de la prueba de Shinoda según el color de la reacción.

### 4.3. Espectrofotometría UV-Vis

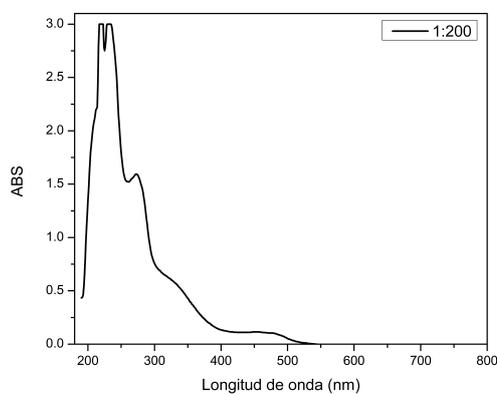
Los espectros de absorción para cada extracto mostrarán diferentes compuestos debido a la polaridad de cada solvente usado. El extracto en agua de *Phoradendron villosum* muestra picos de absorción en la región donde se identifican los flavonoides y alcaloides, mostrando mayor claridad en la dilución 1:10 [Fig. 4.8 (a)] .



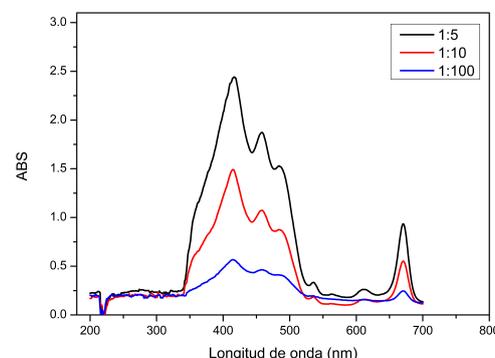
(a) Extracto en agua.



(b) Extracto en alcohol.



(c) Extracto en alcohol-agua.

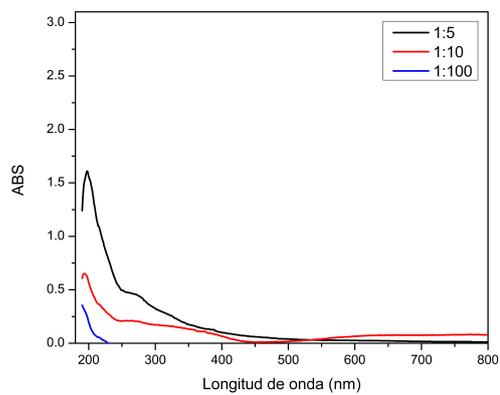


(d) Extracto en aceite.

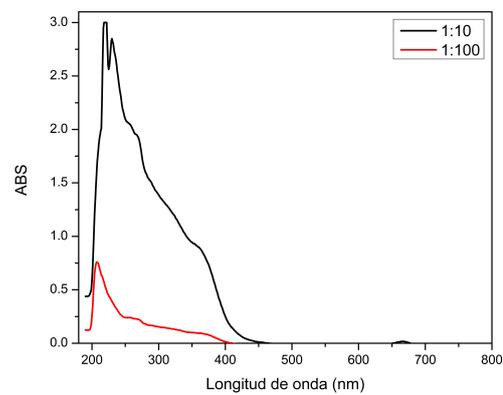
Figura 4.8: Espectros de absorción para distintas diluciones de los extractos de *Phoradendron villosum*.

El extracto en alcohol presenta picos en el intervalo de los flavonoides, alcaloides, carotenoides y la clorofila [Fig. 4.8 (b)]. En el caso del extracto en alcohol-agua solo se hacen presentes los flavonoides [Fig. 4.8 (c)]. Para el aceite se identifican tres picos en la zona de los carotenoides, un pico muy pequeño para taninos y dos de clorofila [Fig. 4.8 (d)].

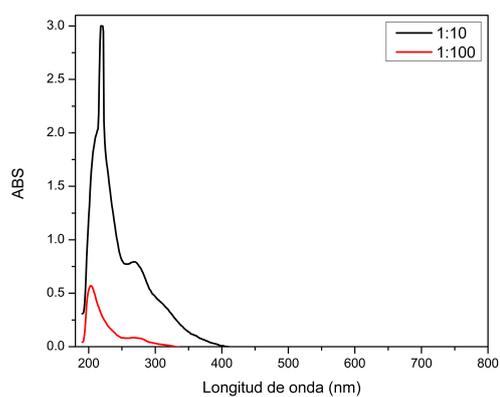
Los extractos en agua, alcohol y alcohol-agua de la planta *Croton dioicus* se identifican solo flavonoides [Fig. 4.9 (a, b, c)]. El extracto en aceite, presenta alcaloides, carotenoides y clorofila con una intensidad de absorción muy baja [Fig. 4.9 (d)].



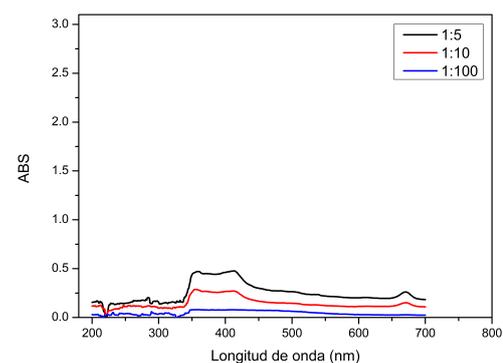
(a) Extracto en agua.



(b) Extracto en alcohol.



(c) Extracto en alcohol-agua.



(d) Extracto en aceite.

Figura 4.9: Espectros de absorción para distintas diluciones de los extractos de *Croton dioicus*.

# Capítulo 5

## Discusión

El principal objetivo del estudio de las plantas medicinales es validar la eficacia de su uso como remedios caseros contribuyendo de esta manera con su valor científico, generalmente usadas 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 y cantidad empleada, los cuales deberán tomarse en cuenta, cuando se pretende valorar una planta. Por otra parte los resultados científicos 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. 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; debido a que se extraen diferentes compuestos dependiendo del tratamiento de la muestra.

Se debe destacar el contenido atómico, esto permite evaluar el ciclo de vida de la planta. Es también importante determinar el nivel de riesgo ambiental de los metales pesados sobre las plantas para conocer la viabilidad de su ingesta, todo esto está relacionado con la necesidad de hacer frente al deterioro ambiental pues en Zacatecas es de importancia el tema de envenenamiento, debido al funcionamiento de las minas adyacentes al estado, situadas en el centro de la ciudad de Vetagrande y en los municipios de Fresnillo, Villa de Cos, Mazapil, Concepción del Oro y Zacatecas. A consecuencia de estos incrementos de concentraciones de metales en los suelos por prácticas inapropiadas, el aumento de la biodisponibilidad de los mismos para los múltiples cultivos ha estado causando daños, fitotoxicidad y con ello están provocando un riesgo latente para la salud de animales y los hombres.

La planta *Phoradendron villosum* muestra una composición predominante de K, Ca, Mn, Fe y la planta *Croton dioicus* solo presenta como componentes mayoritarios K, Ca y Fe. Los elementos K, Ca y Fe ambos en las plantas estudiadas, indican un buen metabolismo de carbohidratos y proteínas, estabilidad en la absorción del magnesio evitando toxicidad por el mismo y un equilibrio en el desarrollo de los cloroplastos y clorofila respectivamente. Para *Phoradendron villosum* el Mn nos indica un adecuado proceso fotosintético. Es importante recalcar que los elementos no mencionados debido a su baja concentración en las plantas ayudan en su ciclo de vida y reproducción. Respecto a los metales pesados en *Phoradendron villosum*

no hay niveles de plomo, el arsénico esta dentro de los parámetros y tanto el níquel como el cobre salen de los límites permitidos. Para *Croton dioicus* no se encontraron niveles de plomo, el arsénico y níquel están dentro de los parámetros y el cobre excede los criterios de toxicidad en 14.857 ppm. El exceso de cobre en plantas puede competir con la absorción de hierro y, en ocasiones, de molibdeno o zinc. La amenaza de toxicidad por cobre puede reducir la ramificación y finalmente provocar el deterioro de la planta. Para el níquel normalmente, las toxicidades ocurren en plantas si es que los niveles en los tejidos sobrepasan entre los 80 y 120 ppm; causando manchas en las hojas (lo que corresponde a una deficiencia inducida de zinc) y la posterior supresión de la expansión de las hojas. Se observa que los valores de metales pesados en los extractos tanto en *Phoradendron villosum* como en *Croton dioicus* pasan en porcentajes diferentes dependiendo del solvente usado, bajando los niveles considerablemente evitando toxicidad.

A partir de la presencia de los grupos químicos tales como flavonoides, taninos, carotenoides y alcaloides, detectados por UV-Vis se puede investigar sobre los posibles efectos de los extractos vegetales. Así, la presencia de flavonoides y taninos podría crear expectativas sobre efectos antimicrobianos, antioxidantes, antitumorales y analgésicos. Los carotenoides presentan actividad antioxidante y el hallazgo de alcaloides también podría otorgar a estas especies vegetales efectos antimicrobianos y de uso en la farmacología de los neurotransmisores. La posibilidad de que estos efectos se presenten o no dependerá del tipo de compuesto asociado al grupo químico, su concentración y asociación con otros compuestos.

Se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intra como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres, principalmente el radical superóxido ( $O_2^-$ ), incrementando el daño por estrés oxidativo, promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la DM, así mismo está involucrado en la apoptosis de las células  $\beta$  pancreáticas y la resistencia a la insulina. Los radicales peróxido de hidrógeno e hidroxilo se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos radicales libres ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA. Los flavonoides pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios (Fe, Cu, Zn), catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica, previenen la agregación plaquetaria y protegen las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus. Además tanto taninos como carotenoides tienen efecto antioxidante reduciendo el estrés oxidativo y aumentando la supervivencia celular dependiendo de la concentración usada. La planta *Croton dioicus* en sus extractos agua, alcohol y alcohol-agua se observa la presencia de flavonoides lo que indica una fuente anti radicales libres. El caso del extracto en aceite solo cuenta con una concentración de carotenoides muy baja, esto sugiere que este extracto no tendría beneficios específicos sobre DM.

El extracto en agua de *Phoradendron villosum* muestra contenido de flavonoides y alcaloides, teniendo mayor concentración de flavonoides que el extracto de *Croton dioicus*, aunando la distinta morfología, indicando un metabolito distinto dentro de la misma familia, lo que sugiere una acción diferente. El extracto en alcohol presenta flavonoides y carotenoides, mostrando una posible actividad antioxidante mayor y para el extracto en aceite se presentan carotenoides en una cantidad considerable.



# Capítulo 6

## Conclusiones y trabajo futuro

### 6.1. Conclusiones

Las plantas medicinales constituyen una rica fuente de químicos bioactivos que están libres de efectos adversos y tienen excelente acción farmacológica que puede favorecer el desarrollo de nuevos agentes antidiabéticos. La mayor parte de los esfuerzos deben enfocarse a evaluar los productos naturales y las plantas para el descubrimiento de inhibidores enzimáticos potencialmente útiles u otros que pueden ser útiles para el tratamiento de la diabetes. En los extractos de *Phoradendron villosum* y *Croton dioicus*, el arsénico, níquel y cobre fueron absorbidos en una cantidad muy pequeña evitando posible toxicidad. Los extractos de *Croton dioicus* en las pruebas químicas y espectrometría UV-Vis, dieron en conjunto positivo para flavonoides, alcaloides y carotenoides. Para *Phoradendron villosum* dieron positivo para flavonoides, alcaloides, carotenoides y taninos dependiendo de la muestra. Los extractos en alcohol y alcohol-agua de *Croton dioicus* y *Phoradendron villosum* tienen mayor concentración de flavonoides, indicando mejor efecto antioxidante. El caso del extracto alcohólico de *Phoradendron villosum* contiene además carotenoides potenciando su efecto. Sin embargo la forma más común y práctica de consumir dichos extractos es en té, teniendo contenido de distintos flavonoides el extracto en agua de *Croton dioicus* y *Phoradendron villosum* aunando su morfología, sin poder especificar cual tiene mayor potencial en diabetes mellitus. En base al contenido de las plantas se entiende que pueden tener efecto anti-radicales libres, esto justificado por su alto contenido de antioxidantes y estudios previos indican que la presencia de flavonoides poseen un efecto regulador en el tratamiento de la diabetes, los cuales se encontraron presentes en las dos especies vegetales.

## 6.2. Líneas de trabajo futuro

- Monitorear si el contenido de metales pesados se debe a la especie vegetal o al uso de sustancias químicas en el suelo donde se encuentran las especies vegetales.
- Aislar y caracterizar los compuestos activos con probable efecto sobre la diabetes mellitus.
- Efectuar estudios con los compuestos activos para comprobar sus efectos anti-radicales e hipoglucémicos.
- Estudiar otras especies mexicanas para buscar un efecto biológico sobre la diabetes mellitus similar o mejor a la que podrían tener *Phoradendron villosum* y *Croton dioicus*.

# Bibliografía

- [1] ALMAGUER HERRERA, A., MIGUEL SOCA, P. E., REYNALDO SERÁ, C., MARIÑO SOLER, A. L., & OLIVEROS GUERRA, R. C., *Actualización sobre diabetes mellitus. Correo Científico Médico*, **16**,(2012).
- [2] LÓPEZ STEWART, G., *Diabetes Mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. Medwave*, **56**, (2009).
- [3] WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Informe mundial sobre la diabetes*, (2016).
- [4] FID, *Diabetes Atlas de la FID. Asamblea General de las Naciones Unidas, 5ta. ed.*, (2012).
- [5] POLLAK C, F., & VÁSUEZ A., T., *Diabetes autoinmune (latente) del adulto. Rev Med Chile*, **140**, (2012).
- [6] ASCHNER, P., *Guías ALAD sobre el diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 con medicina basada en evidencias*, **438**, (2005).
- [7] CRUZ, M., MONTOYA, C., GUTIERREZ, M., WACHET, N. & KUMATE, J. , *Polimorfismo de genes relacionados con diabetes tipo 2. Revista Médica IMSS*, **40**, (2012).
- [8] PINILLA ROA, LANCHEROS PÁEZ, VIASUS PÉREZ, AGUDELO CALDERÓN, GAITAN & PINEDA, F., *Guía de atención de la diabetes mellitus tipo 2. Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública*, (2007).
- [9] ISEA, VILORIA, PONTE N. & GÓMEZ M. , *Complicaciones macrovasculares de la diabetes mellitus: caediácas, vasculocerebrales y enfermedad arterial periférica. Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, **10**, (2012).
- [10] LUTZ C. & PRZYTULSKI K., *Nutrición y dietoterapia 5ta. ed. México: Mc. Graw Hill*, (2012).
- [11] M. EDDOUKS, M. MAGHRANI, A. LEMHADRI, M., OUAHIDI, H. JOUAD, *Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco. Journal of Ethnopharmacology*, **82**, (2002).
- [12] ADOLFO ANDRADE-CETTO & MICHAEL HEINRICH, *Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology*, **99**, (2005).

- [13] ANDRADE-CETTO, A., *Estudio Etnofarmacológico de Equisetum myriochaetum Schlechtendal & Cham y Cecropia obtusifolia Bertol. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México*, (1999).
- [14] HEINRICH, M., *Ethnobotanik der Tieflandmixe (Oaxaca, México) und phytochemische Untersuchung von Capraria biflora L. (Scrophulariaceae). Dissertationes Botanicae*, **144**, (1989).
- [15] PÉREZ GUERRERO, C.M., HERRERA, R., ORTÍZ, M., ÁLVAREZ DE SOTOMAYOR & FERNANDEZ, M.A., *A pharmacological study of Cecropia obtusifolia Bertol aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology*, **5**, (2001).
- [16] ANDRADE-CETTO, A., WIEDENFELD, H., REVILLA-MONSALVE, M.C., ISLAS, A.S., *Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on Streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology*, **72**, (2000).
- [17] REVILLA-MONSALVE, M.C., ANDRADE-CETTO, A., ISLAS-ANDRADE, S., WIEDENFELD, H., *Hypoglycemic effect of Equisetum myriochaetum aerial parts on type 2 diabetic patients. Journal of Ethnopharmacology*, **81**, (2002).
- [18] RANJITH, W.H., DHARMARATNE, N.P., DHAMMIKA, N., IKHLAS, A.K., *Kavalactones from Piper methysticum, and their <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analyses. Photochemistry*, **59**, (2002).
- [19] GROVER, J.K., YADAV, S. & VATS, V., *Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. Journal Ethnopharmacology*, **81**, (2002).
- [20] WHO/ACADIA, *Rapport de la Journée Internationale de, diabetes*, (1992).
- [21] ADA, *Clinical practice recommendation, Screening for diabetes. Diabetes care*, **20**, (1997).
- [22] CHUNG-HUNG CHAN, GEK-CHENG NGOH, ROZITA YUSOFF, *A brief review on anti diabetic plants: Global distribution, active ingredients, extraction techniques and acting mechanisms Pharmacognosy Reviews*, **6**, (2012).
- [23] PATEL DK, KUMAR R, LALOO D, HEMALATHA S PATEL DK ET AL., *Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (2012).
- [24] ZOHARA YANIV, AMOTS DAFNIB, JACOB FRIEDMAN & DAN PALEXITCH, *Plants used for the treatment of diabetes in Israel. Journal of Ethnopharmacology*, **19**, (1987).
- [25] M. EDDOUKS, M. MAGHRANI, A. LEMHADRI, M.L. OUAHIDI, H. JOUAD, *Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco. Journal of Ethnopharmacology*, **82**, (2002).

- [26] MANISHA MODAK, PRIYANJALI DIXIT, JAYANT LONDHE, SAROJ GHASKADBI & THOMAS PAUL A. DEVASAGAYAM, *Indian Herbs and Herbal Drugs Used for the Treatment of Diabetes. J. Clin. Biochem. Nutr.*, **40**, (2007).
- [27] CLIFFORD J. BAILEY & CAROLINE DAY, *Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. Diabetes care*, **12**, (1989).
- [28] BAILEY C. J. & NATTRASS M., , *Non-insulin dependent diabetes mellitus: treatment with metformin. In Clinical Endocrinology and Metabolism*, (1988).
- [29] MELANDER A., *Non-insulin dependent diabetes mellitus: treatment with sulphonylureas. In Clinical Endocrinology and Metabolism*, (1988).
- [30] LAURA SHANEMCWHORTER, *Botanical Dietary Supplements and the Treatment of Diabetes. Current Diabetes Reports*, (2005).
- [31] DOMÍNGUEZ, XORGE ALEJANDRO, *Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa México*, (1980).
- [32] OLGA LOCK, *Colorantes naturales, Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú*, (1997).
- [33] BOWIE & I. THORNTON, *Environmental geochemistry and health : report to the Royal Society British National Committee for Problems of the Environment*, (1985).
- [34] ALINA KABATA PENDIAS, *Trace Elements in Soils and Plant, 3 ed. CRC Press*, (2001).
- [35] ANAYA A., *Ecología Química. Primera Edición. México: editorial Plaza y Valdés*, (2003).
- [36] SALINAS P. & BERMÚDEZ M., *Principios activos y utilización terapéutica de las plantas tóxicas del género Datura. Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, (1996).
- [37] BRAVO L., *Poliphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev*, **56**, (1988).
- [38] GIMENO E., *Compuestos fenólicos. Ámbito farmacéutico nutrición. OFFARM*, **56**, (2004).
- [39] ÁLVAREZ J., *Tanino: La revolución enológica. Rev. Enología*, **2**, (2007).
- [40] ABASUM T., AHMAD S., AKHLAQ N. & AHMAN R., *Estimation of tannins in different food products. Int. J. Agri. Biol.*, **3**, (2001).
- [41] CHUNG KT., WONG T., WEI C., HUNG Y. & LIN Y., *Tannins and human health:A review. Food Sci. Nutr.*, **38**, (1998).
- [42] BEHERA B., VERMA N., SONONE A. & MAKHIJA U., *Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Bioresource technology*, **99**, (2008).

- [43] PAPETTI A., DAGLIA M., ACETI C., QUAGLIA C. & GAZZANI G., *Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. J. Agric. Food Chem*, **54**, (2006).
- [44] MARTÍNEZ FLÓREZ S., GONZÁLEZ GALLEGO J., CULEBRAS JM. & TUÑÓN M., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp.*, **17**, (2002).
- [45] MAN S., GAO W., ZHANG Y., HUANG L. & LIU CH., *Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. Fitoterapia*, **81**, (2010).
- [46] GUZMÁN B, CRUZ D., ALVARADO J. & MOLLINEDO P., *Cuantificación de saponinas en muestras de cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen. Revista Boliviana de Química*, **30**, (2013).
- [47] BRUNETON J., *Saponósidos, Farmacognosia. Fitoquímica de Plantas Medicinales. Editorial Acribia. España*, (2001).
- [48] RINGUELET J. & VIÑA S. , *Productos naturales vegetales. Argentina: Editorial Universidad de la Plata*, (2013).
- [49] GONZALEZ E. & SOTOMAYOR C., *Efecto alelopático de glucosidos cianogénicos sobre plántulas de duraznero *Nemaguard*. Cien. Inv. Agr.*, **32**, (2005).
- [50] QUIROGA P. & OLMOS V. , *Revisión de la toxicocinetica y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. Acta Toxicol Argent*, **17**, (2009).
- [51] BEYRA, A., *Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). Anales del jardín botánico de Madrid*, **61**, (2004).
- [52] SANCHEZ, L. A., *Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Rev Cubana Farm.*, **34**, (2000).
- [53] KUMAR, S. S., PRASHANT KUMAR, R., JAISWAL, D. & WATAL, *Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*. eCAM*, **5**, (2007).