

U.M.S.N.H.
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DEL
FLUIDO CELÓMICO, PROVENIENTE DE LA LOMBRIZ DE TIERRA Eisenia
foetida Y SU CARACTERIZACIÓN QUÍMICA”**

Tesis que presenta:

JAIME BALDERAS VILLALOBOS

Para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Asesor de tesis:

D.C. MARTÍN GERARDO RODRÍGUEZ

Morelia Mich. Enero 2009

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por regalarme la esencia que poseo junto con el don de la vida; ya que a través de ella puedo conocer la ciencia como un medio mas para llegar a su corazón. Por darme la oportunidad de darlo a conocer por medio de mis actos.

“He sido crucificado con Cristo, por eso ya no soy yo quien vive, si no es Cristo quien vive en mi” (Gal 2, 12)

A mi PADRE, por transmitirme excelentemente la fuerza de mis generaciones, para ser un hombre de bien; por amarme, comprenderme, y apoyarme en todos mis proyectos, por mostrarme que la naturaleza posee una riqueza infinita y hermosa. Gracias por enseñarme que los errores son oportunidades para crecer. Eres mi primer maestro y el mejor, por eso siempre te veré como... EL GRANDE.

A mi MADRE, cuya misión más grande es amar a Dios a través del ser humano, enseñándome a hacerlo de la mejor forma... amándome incondicionalmente. Gracias por el don de la vida, por enseñarme, que la ciencia no sirve para enriquecer nuestros bolsillos, sino para fortalecer el mundo que habitamos. Eres mi primer maestra y eres la mejor que he tenido, por lo tanto para mi siempre serás... LA GRANDE.

A mis hermanos, Orlando y Juan Manuel, por ser mis amigos y compartir conmigo la misma razón de nuestro existir... el amar. Gracias por ser mis “patrocinadores” junto con mis padres, en esta aventura. Este logro también de ustedes.

A Enciende una Luz “la banda”, por compartir conmigo alegrías y tristezas, por ser parte de mi vida. A través de ustedes he comprobado el valor de la amistad, ahora tengo con que comparar, lo que es un buen amigo.

A mi asesor de tesis, el D.C. Martín Gerardo Rodríguez, por iniciarme en este transito de cuestionamientos y búsqueda de respuestas. Por brindarme su amistad y conocimientos. Gracias Doc, por enseñarme que la ciencia no esta peleada con la humildad.

Al D.C Luís Cachón García, por su valioso apoyo en la caracterización química.

Al D.C Daniel Godínez Hernández, por brindarme todas las facilidades para la realización de esta tesis y por adoptarme como uno más de sus pupilos. Gracias Doc.

A Lolis, Denisse, Liz y Junior, por orientarme y apoyarme en la realización de mis experimentos.

ABREVIATURAS

Ca⁺²: Ión Calcio.

Cz: Cenizas

DMSO: Dimetil sulfóxido

DE: Después de Extracto

EADH: Extracto Acuoso Después de Hexano

EB: Energía Bruta

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina

EE: Extracto Etéreo

FC: Fibra Cruda

FDI: Fibra Dietética Insoluble

FND: Fibra Neutra Detergente

GC: Cromatografía de Gases

H⁺: Iones Hidrogeno

HL: Harina de Lombriz

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

kDA: Kilodaltones

MS: Espectrometría de Masas

MS: Materia Seca

N: Nitrógeno

RF: Factor de retención.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

TLC: Cromatografía en capa fina.

INDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	10
ANTECEDENTES.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 Un poco de historia.....	12
1.1.2 La lombriz de tierra en la antigüedad.....	14
1.2 Descripción general de las lombrices.....	16
1.2.1 Usos de las lombrices.....	16
1.3 Biología, Fisiología, Anatomía.....	19
1.3.1 Características particulares de la especie <i>eisenia foetida</i>	23
1.4 Condiciones para su cultivo.....	26
1.5 La lombriz de tierra en la zooterapia.....	27
1.6 Composición química de la lombriz de tierra.....	29
1.7 Caracterización de biomoléculas de la lombriz de tierra.....	33
1.8 Evaluación farmacológica.....	34
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS.....	37
4. OBJETIVOS.....	38
• Generales.....	38
• Específicos.....	38

5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Población	38
5.2 Animales	38
5.3 Obtención del fluido celómico de la lombriz	39
5.4 Fraccionamiento del fluido celómico	39
5.5 Separación de moléculas del fluido celómico por Técnicas cromatográficas.	40
5.5.1 Cromatografía en placa de silica gel TLC	40
5.5.2 cromatografía preparativa	41
5.5.3 Técnica de separación y purificación de algunos compuestos del fluido celómico (Columna)	41
5.6 Identificación de los compuestos presentes en el fluido celómico	42
5.7 Estudios de RMN	43
5.8 La evaluación de la actividad farmacológica	43
5.8.1 Prueba en tejido de las manchas obtenidas por cromatografía	44
5.9 Análisis Estadístico	45
6. RESULTADOS	46
6.1 Evaluación de los extractos obtenidos en aorta	46
6.2 Evaluación de los extractos obtenidos en traquea	50
6.3 Análisis cromatográfico	54
6.4 Cromatografía de gases	58
6.5 Resonancia Magnética Nuclear	65

7. DISCUSIÓN.....	67
8. CONCLUSIONES.....	69
9. PERSPECTIVAS.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura externa e interna de la lombriz.....	23
Figura 2. Corte transversal del cuerpo de la lombriz.....	25
Figura 3. Trazo representativo, el cual muestra el efecto del extracto en un anillo de aorta en estado basal.....	47
Figura 4. Curvas dosis -respuesta acumulativa a fenilefrina en aortas con endotelio, antes y después de un estímulo de 20 µl con extracto acuoso recuperado de hexano.....	47
Figura 5. Trazo representativo que muestra la contracción del anillo de aorta mantenida por el agonista después de un estímulo con el extracto acuoso.....	48
Figura 6. Grafico de barras de la tensión basal en anillos de aorta, después de una concentración media de fenilefrina antes y después del estímulo del extracto.....	49
Figura 7. Fuerza de contracción de anillos de aorta por el efecto del extracto acuoso recuperado de hexano desde su estado basal sin estímulo de agonista.....	49
Figura 8. Curvas dosis -respuesta acumulativas a carbacol, en anillos tráqueas con endotelio, antes y después de un estímulo de 20 µl con extracto acuoso recuperado de hexano.....	51
Figura 9. Fuerza contráctil inducida por una contracción media de carbacol, antes y después de un estímulo de extracto acuoso recuperado de hexano.....	52
Figura 10. Gráfico de el efecto de la fracción recuperada por cromatografía sobre aorta.....	53
Figura 11. Placa cromatográfica del extracto acuoso recuperado de hexano. Se observan las manchas en separación.....	54
Figura 12. Algunos de los compuestos separados por columna, contenidos en varios viales para su posterior recuperación a través de la evaporación del solvente.....	56
Figura 13. Fotografía que muestra la mancha con el compuesto buscado (autofluorescente) en solución de metanol.....	57
Figura 14. Cristales obtenidos por separación cromatográfica.....	57

Figura 15. Resonancia Magnética Nuclear de la fracción recuperada y cristalizada	65
---	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos de la lombriz transmitidos a través de l conocimiento empírico	18
Tabla 2. Composición química de la pared celular de la lombriz de tierra Eisenia foetida.....	29
Tabla 3. Contenido de aminoácidos de la especie Eisenia foetida.....	30
Tabla 4. Contenido de macro elementos de la especie Eisenia foetida.....	30
Tabla 5. Ácidos grasos del extracto crudo de la lombriz de tierra.....	31
Tabla 6. Ácidos grasos de harina de lombriz.....	32
Tabla 7. Manchas recuperadas por placa preparativa.....	55
Tabla 8. Cromatografía de gases de extractos metanólico, etanólico y con hexano, con columna HP5.....	58
Tabla 9. Cromatografía de gases de extractos metanólico, etanólico y con hexano, con columna FFAP.....	61

I. RESUMEN

La lombriz de tierra es un organismo utilizado en la degradación de materia orgánica, con un sistema de secreción capaz de producir gran cantidad de compuestos con actividad biológica. Hecho que ha quedado documentado en su uso como subproducto para la cura de enfermedades como paperas, trombosis, espasmos de músculo liso e hipertensión. Mucha de esta información ha sido obtenida de forma empírica. Por lo que en el presente trabajo se hizo uso de técnicas de separación e identificación de compuestos químicos y su evaluación, en un modelo de anillos de aorta y traquea de rata, para dilucidar su efecto farmacológico. Se hizo la caracterización de algunas sustancias cromóforas, poniendo especial interés en aquella que presentó un efecto farmacológico constrictor en el tono vascular de aorta y traquea, ambas con endotelio. Los resultados obtenidos nos han permitido una mejor comprensión de los usos de los animales para el tratamiento de enfermedades en humanos, y de la gran riqueza de sustancias útiles en la terapéutica, de la que esta dotada la naturaleza.

II. ANTECEDENTES

El uso de los animales o productos derivados de ellos para el tratamiento de las enfermedades representa un arsenal de sustancias, potencialmente medicinales, esta área de la terapéutica se cultiva desde la aparición de las culturas (Kangmin 2004; Costa-Neto 2005) y en la actualidad, aporta una gran cantidad e ingredientes para la preparación de medicinas preventivas de tratamiento y curativas en las sociedades modernas. Cabe señalar que las culturas antiguas acumularon una gran cantidad e información, la cual fue útil para la fabricación de medicamentos, por parte de la industria farmacéutica (Alves y Rosa 2005). Al respecto se han utilizado animales vertebrados o invertebrados, provenientes del mar o de la tierra de donde se han obtenidos principios activos con actividades farmacológicas específicas y un alto potencial para nuevas aplicaciones. La importancia de hacer estudios farmacológicos con animales como fuente de principios activos lo tenemos en su potencial económico y la necesidad de la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos medicamentos (Alves y Rosa 2005). Así podemos mencionar: la obtención de sustancias activas a partir del veneno de una serpiente que llevo al descubrimiento de los compuestos captopril y enalapril, mejor conocidos como inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA, Bisset 1991); la obtención de la tetradotoxina que inhibe la neurotransmisión y a dosis bajas tiene una excelente actividad como narcótico y analgésico. Otras veces, los compuestos obtenidos pasan a ser herramientas de investigación farmacológica o bioquímica como ocurre con algunas drogas antivirales, antibióticos y estimulantes cardiacos. (Higa 1996)

Los invertebrados son una fuente potencial de principios activos: insectos, arañas y gusanos son ejemplos de obtención de sustancias. El caso mas impactante lo tenemos en el uso actual de la sanguijuela como succionador de sangre en hematomas, no obstante los investigadores han encontrado en su secreción actividades de sustancias como anticoagulantes, anestésicas locales, vasodilatadores y antibióticas, las cuales están bajo estudio (Tasiemski et. al. 2004).

“ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DEL FLUIDO CELÓMICO, PROVENIENTE DE LA LOMBRIZ DE TIERRA Eisenia foetida Y SU CARACTERIZACIÓN QUÍMICA”

1. INTRODUCCION

1.1 UN POCO DE HISTORIA.

A través de la evolución, el hombre en su búsqueda de una mejor forma de vivir y atendiendo al instinto innato de supervivencia, ha ido adaptando los recursos naturales para su beneficio incorporando todo un reservorio empírico de conocimientos, manteniéndose a lo largo de las generaciones en una determinada línea filogenética, transmitida de persona a persona y en algunos casos, por medio de documentos escritos o pictográficos.

Hay que tener en cuenta que la medicina alopática viene utilizándose desde aproximadamente unos 300 años, en cambio las medicinas naturales y tradicionales, tienen más de 5000 años de experiencia continua. Ya que en el caso de la medicina tradicional China o Ayurvédica de la India, tienen más de 4000 o 5000 años, a lo largo de los cuales los médicos han aplicado constantemente sus tratamientos (Arrieta 2004 et. al). Existiendo un intercambio restringido entre pueblos, pero estableciendo comunicación con otros médicos de otros grupos y etnias; reorganizando sus conocimientos, compartiendo sus secretos y normalizando sus prácticas escribiéndolas. (Arrieta 2004 et. al). De esta manera los vínculos entre la medicina tradicional y la diversidad biológica de los sistemas naturales junto con sus poderes curativos, siempre ha implicado la atención y medicamentos, de plantas y especies animales. Debido a que esta nos proporciona infinidad de recursos como son; cortezas, partes animales, sustancias minerales y otros materiales. Las interconexiones entre este tipo de medicina y el medio ambiente biótico puede verse en los beneficios para la salud derivados de la existencia de un

complemento completo de las especies, especialmente al considerar la importancia de los antiguos como una fuente primaria de la atención de la salud y el 80 por ciento de la población del mundo (Alves y Rosa 2007).

La Organización Mundial de la Salud estima aproximadamente el 80% de todo el mundo más de seis millones de personas dependen principalmente de la medicina basada sobre los animales y las plantas. En la época moderna, dentro de las sociedades. La “Zooterapia” constituye una importante alternativa entre muchas otras terapias conocidas prácticamente en todo el mundo. Animales salvajes y domésticos junto con sus derivados (por ejemplo, pezuñas, piel, huesos, plumas y colmillos) forma ingredientes importantes en la medicina preventiva, en la protección y curación. De las 252 sustancias químicas esenciales que han sido seleccionados por la Organización Mundial de la Salud, el 11,1% proceden de plantas, y el 8,7% de los animales. Y de las 150 recetas medicamentos actualmente en uso en los Estados Unidos de América, 27 tienen origen animal (Mojan y Jaroli 2008).

Desde tiempos antiguos los animales, sus partes, y sus productos han constituido parte del inventario de los medicamentos las sustancias utilizadas en diversas culturas. Este fenómeno es caracterizado por una amplia distribución geográfica y muy profundos orígenes históricos (Lev 2006). La curación de las enfermedades humanas mediante el uso de la terapéutica sobre la base de los medicamentos obtenidos a partir de animales o, en última instancia derivados de ellas se conoce como zooterapia. En la sociedad moderna, la zooterapia constituye una importante alternativa entre muchas otras conocidas en todo el mundo. Varios intereses en investigación y actividades en los ámbitos de la etnobiología y etnomedicina, han aumentado enormemente en la última década. Desde tiempos antiguos los animales, sus partes y sus productos han constituido parte del inventario de los medicamentos y las sustancias utilizadas en diversas culturas (Mahawar y Jaroli 2007).

La utilización médica de los animales comenzó a aparecer con la invención de la escritura, y se encuentra en los archivos, papiros, y otros principios de fuentes históricas escritas relacionados con la medicina. Los datos sobre el uso de los animales en la terapéutica, se han encontrado en civilizaciones tan antiguas como las egipcias y mesopotámicas, que dejaron su huella en las diversas sociedades que más tarde surgieron en la costa oriental del mar mediterráneo. Fuentes históricas del antiguo Egipto mencionan en sus medicamentos, usos de las sustancias derivadas de animales, por ejemplo, el ganado ,la leche, la miel de abeja, sangre de lagarto, órganos de buey, el hígado de la golondrina , las extremidades de murciélagos, espermatozoos de la ballena gris ámbar, y las glándulas de ciervo almizclero (Lev 2006).

1.1.2 LA LOMBRIZ DE TIERRA EN LA ANTIGÜEDAD.

La lombriz era conocida en la antigüedad como el arado o el intestino de la tierra, debido a que los griegos observaron que al excavar las galerías en el terreno se volvía poroso y facilitaba la oxigenación y permeabilidad del agua. En el antiguo Egipto la reina Cleopatra, le confirió la categoría de animal sagrado, y se castigaba con la pena máxima el intento de sacarlas de Egipto hacia otros lugares. Se consideraba que la fertilidad del Nilo puede deberse a la actividad de la lombriz de tierra en los suelos, que reciclaban los nutrientes y los dejaban disponibles para los cultivos anuales.

Antiguamente ciertas tribus nómadas africanas elegían un determinado territorio para labrar la tierra, teniendo en cuenta la población de lombrices. Calculaban el número de ejemplares por los diminutos montículos de tierra. Diseminados en el suelo. Este conocimiento primitivo se vio confirmado por las investigaciones realizadas en materia de agricultura moderna.

Al comienzo de la era industrial en el siglo XVIII, y en coincidencia con la importante migración de la población, se fue perdiendo la tradición del reciclado de otro tipo de residuos orgánicos, por medio de lombrices.

A fines del siglo XIX el biólogo Charles Darwin, se dedicó al estudio de las lombrices. Sus libros más famosos, *El libro origen de las especies* por medio de la selección natural y *el origen de l Hombre*, tal vez opacaron otro, no menos famoso, aparecido en 1881. Titulado: *la formación de la tierra vegetal por la acción de las lombrices*. Podemos considerar esta obra por como el inicio de una serie de investigaciones que hoy han transformado la lombricultura en una actividad zootécnica muy importante que permite mejorar la producción agrícola.

Charles Darwin estableció en suelos de Inglaterra estadísticas que demostraron que la cantidad e lombrices por hectárea eran de 130000 en los jardines y cerca de la mitad en campo abierto. Basado en estos cálculos comprobó que el humus producido por las lombrices varía entre 13 y 45 toneladas por hectárea.

En la primera mitad del siglo XX, Hug Carter estableció uno de los primeros criaderos a escala industrial de la lombriz roja californiana en estados unidos de América.

A partir de la década de 1950, la universidad de California (EE.UU.) comenzó a realizar estudios sobre lombricultura y sus efectos benéficos sobre la agricultura, entre ellos realizo una selección de alimentos preparados, y manteniendo algunos parámetros, como temperatura, humedad y aireación. Estos trabajos permitieron seleccionar un grupo de lombrices más longeva con ciclos de reproducción más cortos (Barbado 2004 et. al.).

1.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS LOMBRICES.

De las más de 8000 especies conocidas solamente se han clasificado unas 2500 y solo tres de ellas han podido ser domesticadas. La lombriz de tierra *Eisenia foetida* es la mas conocida y utilizada en mas del 80 % de los criaderos del mundo.

Desde el punto de vista ecológico se clasifican en:

Epigeas: Viven sobre la superficie del suelo, se alimentan de materia orgánica y producen Humus.

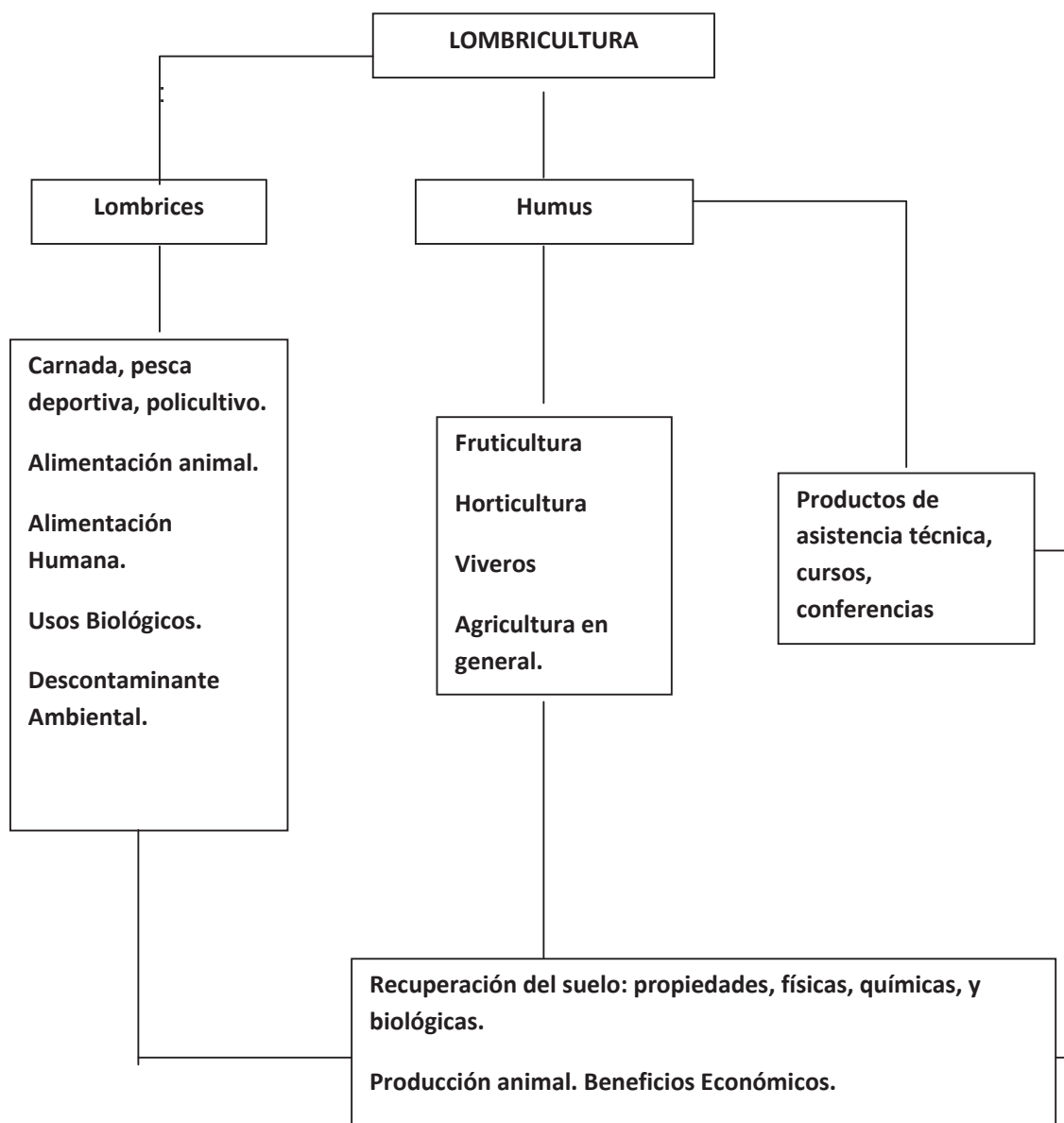
Endógenas: Son las mas conocidas viven dentro del suelo y cavan galerías horizontales, comen y defecan tierra.

Anécicas: Viven dentro del suelo cavan galerías verticales, y durante la noche suben a la superficie del suelo para alimentarse de materia orgánica.

1.2.1 USOS DE LAS LOMBRICES

Los gusanos de tierra son aceptados universalmente como la mayor representación de los animales de tierra, son usados para el estudio de la contaminación en la tierra (Viswanathan,1997).

En la naturaleza se ha encontrado la respuesta a muchos problemas de contaminación orgánica y es justamente allí donde nace la lombricultura como una respuesta simple, racional y económica a este problema. Hoy en día la lombricultura es una Biotecnología que utiliza a una especie doméstica de lombriz, como una herramienta de trabajo; recicla todo tipo de materia orgánica y obtiene como fruto de este trabajo el Humus, un fertilizante de primer orden que son las excretas de la lombriz (Arbona y Morales, 1999). En el siguiente cuadro se menciona la diversidad de usos que se les da a las lombrices.



En algunos lugares las lombrices de tierra son usadas en diversos malestares físicos, dependiendo de la región de la población que recurre a ellas.

Tabla 1. Algunos usos de la lombriz de tierra, con algunas de sus preparaciones, obtenidas a través de un conocimiento empírico, algunas comprobadas en el laboratorio (Marilou y Realm 2007).

Usos	Método de preparación
Reducir el dolor debido a: • problemas de estómago • dolores de mano de obra • dolor de muelas • reumatismo • artritis Ayuda para acelerar la contracción del útero y hacer más fácil el parto Para curar inflamaciones en cualquier parte del cuerpo Evitar que se repita el sarampión Cura para la fiebre Adelgazamiento de la sangre	Alrededor del 8 al 10 de lombrices de tierra fueron cuidadosamente lavados y escurrido, y luego se calienta en una olla hasta el marrón oscuro o casi quemado. El "cocido" lombrices de tierra fueron pulverizados o utilizando un mortero y, a continuación, se ponen en alrededor de un (1) litro de agua recién hervida y se mezcla a fondo. La mezcla se deja enfriar y resolver. El líquido se decanta en un vaso y dado a la paciente para beber. El líquido también se aplica tópicamente sobre la zona afectada. Similar método de preparación y aplicación como se ha descrito anteriormente. El líquido puede utilizarse como una bebida. El líquido preparado como se ha descrito anteriormente se utilizó como una bebida. O un emplasto preparado a partir de extracto de lombriz y se mezcla con algunas hierbas. Líquido de lombriz mezcla de agua se utilizó como una bebida. Un emplasto preparado a partir de lombriz mezclado con extracto de algunas hierbas y local se frota o se aplica en la frente del paciente Extracto de un puré de lombriz se mezcla con el agua, hervidas durante unos 10 minutos, y luego enfriado. El líquido servido como una bebida tónica que deben tomarse con regularidad.

--	--

1.3. BIOLOGIA, FISILOGIA Y ANATOMIA.

La morfología de las lombrices pese a su simplicidad, es compleja y guarda estrecha relación con su estructura, ya se adaptada a la vida terrestre o acuática

Las lombrices de tierra se agrupan junto con otros organismos en un conjunto denominado fila anélida; en este además se encuentran los gusanos marinos conocidos como poliquetos y las sanguijuelas. Todos estos tienen en común varias características que se describen a continuación:

VERMIFORMES

Son invertebrados vermiformes, o sea que el cuerpo tiene forma de gusano, alargado, cilíndrico, mas o menos aplanado, dorso-centralmente.

El cuerpo del animal se haya dividido a lo largo del eje antero-posterior en una serie sucesiva de segmentos denominados metámeros o somites. Ello se refleja interna y externamente. De ahí el nombre fila, que proviene del latin *anellus* , anillo pequeño, y del griego *eidos*, aspecto, y que significa por tanto de aspecto anillado.

CELOMA

Es la cavidad que se dispone entre el tubo digestivo y la pared del cuerpo, revestida totalmente de mesodermo desempeña un papel primordial en el desarrollo progresivo de la complejidad de estructuras y su presencia facilito grandes cambios morfológicos y fisiológicos en los animales.

SISTEMA CIRCULATORIO CERRADO

La sangre fluye por un sistema de vasos, a diferencia del sistema lagunar o abierto de otros invertebrados.

SISTEMA EXCRETOR METANEFRIDIAL.

Es el sistema que predomina en el filo. Generalmente vierten los productos de desecho del metabolismo en un segmento posterior en donde se filtra el líquido celómico.

Las especies terrestres de anélidos como la lombriz de tierra se encuentran prácticamente en todos los suelos del mundo, excepto en la antártida, los desiertos y suelos salinos, fuertemente ácidos o pobres en agua. Se presentan principalmente en ambientes húmedos y ricos de materia orgánica.

La anatomía externa de las lombrices de tierra es muy homogénea, presentan el cuerpo dividido en:

- Prostomio
- Metastomio
- Pígidio

El prostomio es el primer lóbulo del cuerpo y el Pígidio, el último, donde abre el ano. Algunos autores no consideran que estos lóbulos sean verdaderos segmentos. El metastomio lo constituye el resto del cuerpo formado por una serie de metámeros.

La boca abre centralmente entre el prostomio y el primer segmento denominado peristomio.

Otras estructuras de interés para el presente trabajo:

Setas. Son proyecciones quitinosas a manera de pelos muy pequeños, pueden estar distribuidos de la siguiente forma:

Distribución lumbricina. Cuatro por segmento.

Distribución periquetina: Numerosas formando un anillo en el ecuador del segmento.

Clitelio. Zona glandular a manera de cinturón que abraza un número considerable de segmentos. Aparece únicamente cuando el animal es sexualmente maduro, o sea, cuando es adulto y se encuentra apto para reproducirse. Interviene fundamentalmente en:

- Favorecer el acoplamiento de los animales durante la copula.
- Producir albúmina para la alimentación de los embriones.
- Producir el capullo que contendrá los embriones.

Poros dorsales. Presentes en algunos grupos, son pequeños poros localizados en los sacos intersegmentarios en la línea medio dorsal. Se relacionan con la lubricación del cuerpo por el fluido celómico para mantenerlo húmedo.

Poros nefridiales. Generalmente hay un par por segmento y pueden ser laterales o ventrolaterales en uno varios segmentos preclitales. Se relacionan con el almacenamiento de esperma.

Marcas genitales. Pueden ser papilas tumescencias etc.; que aparecen generalmente durante la madurez sexual. Los tubérculos pubertarios son característicos y aparecen como bandas tumescentes en cada borde ventrolateral del clitelio.

Coloración. Las especies pigmentadas son rojas verdes o azules y viven en la superficie del suelo. Las especies despigmentadas viven dentro del suelo y adoptan la coloración del contenido del tracto digestivo y circulatorio del cuerpo; son por lo general especies grisáceas, blanquecinas o rosáceas.

La especie *Eisenia Foetida* usada en este trabajo, es de color rojo, por lo que también es llamada roja californiana.

ESTRUCTURA INTERNA.

Sistema tegumentario y muscular. La pared del cuerpo esta constituida de la siguiente forma:

- Cutícula.
- Epidermis.
- Tejido conectivo.

Tejido muscular. Circular externo y longitudinal interno.

Peritoneo. La cutícula es fina y flexible de naturaleza quitinosa, reviste y protege externamente al cuerpo

Epidermis .La epidermis esta constituida por una capa simple de células, o sea, un epitelio cilíndrico cuyo espesor varía según la región del cuerpo, que son las encargadas de secretar la cutícula. También en la epidermis se secretan numerosas glándulas unicelulares encargadas de secretar el mucus, que es expulsado hacia el exterior a través de canalículos de la cutícula y que facilitan la respiración o el desplazamiento de las lombrices en el suelo. También existen células sensoriales como tensoreceptores y fotorreceptores.

La contracción de las capas musculares presiona el fluido celómico y determina el movimiento del animal, así, cuando los músculos circulares se contraen disminuye el ancho del animal y cuando las longitudinales se distienden, el líquido celómico fluye longitudinalmente y el animal se estira.

Cuando las fibras longitudinales son las que se contraen las circulares se distienden y el animal se acorta y se hace mas ancho.

Cuando existe el pigmento este se encuentra en la capa de células musculares circulares. Todos los órganos internos están envueltos por el peritoneo que es una membrana de células que también reviste internamente la pared del cuerpo. Como las lombrices carecen de esqueleto, la forma del cuerpo se mantiene gracias a la elasticidad de la pared del cuerpo y la presión del líquido celómico, lo que constituye el llamado esqueleto hidrostático (Rodríguez y Vázquez et. al. 1998).

1.3.1 CARACTERÍSTICAS PARTICULARES DE LA ESPECIE EISENIA FOETIDA

La lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) es la lombriz mas conocida y empleada en mas del 80% de los criaderos del mundo. Se le conoce como lombriz roja californiana porque durante la década de 1950 en el estado de California (EE.UU.) se descubrieron sus propiedades para el ecosistema y se instalaron los primeros criaderos.

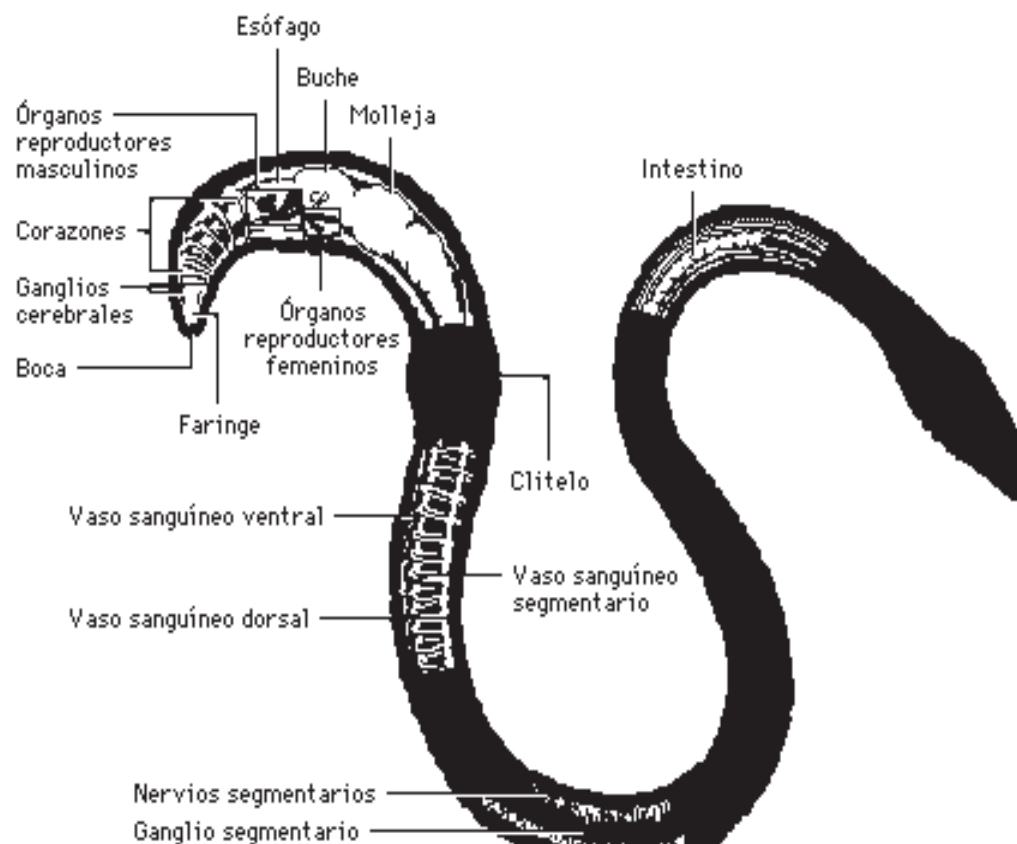


Figura 1. Estructura externa e interna de la lombriz.

Clasificación Zoológica

Origen: Eurasia

Reino: Animal

Subreino: Metazoo

Tipo: Anélido o gusano segmentado

Clase: Oligoqueto

Orden: Opisthopro

Familia: Lombricidae

Género: *Eisenia*

Especie: *E. foetida*

Posee el cuerpo alargado segmentado y con simetría bilateral. Existe una porción mas gruesa en el tercio anterior de 5 mm de longitud llamada "Clitellum" cuya función esta relacionada con la reproducción.

Al nacer las lombrices son blancas transcurridos 5 o 6 días se vuelven rosadas y a los 120 días ya se parecen a las adultas de color rojizo y en condiciones de aparearse

CARACTERÍSTICAS INTERNAS

Cutícula es una lámina de color marrón, brillante, quitinosa, fina y transparente

Epidermis: Situada debajo de la cutícula es un epitelio simple constituida por células glandulares, que producen una secreción mucosa. Es la responsable de la formación de la cutícula y del mantenimiento de la humedad y flexibilidad de la misma.

Capas musculares. Posee una capa longitudinal interna y una longitudinal externa.

Peritoneo: es la capa mas interna y limita exteriormente con el celoma de la lombriz

Celoma: es una cavidad que contiene el líquido celómico, y se extiende a lo largo del animal: es lo que constituye el esqueleto hidrostático.

Aparato circulatorio: Formado por vasos sanguíneos: La lombriz tiene dos vasos sanguíneos uno dorsal y otro ventral. Posee también otros vasos y capilares que llevan la sangre a todo el cuerpo. La sangre circula por un sistema circulatorio cerrado constituido por 5 pares de corazones.

Aparato respiratorio: Es primitivo. El intercambio de oxígeno se lleva a cabo a través de la pared del cuerpo. (Barbado 2004 et. Al.)

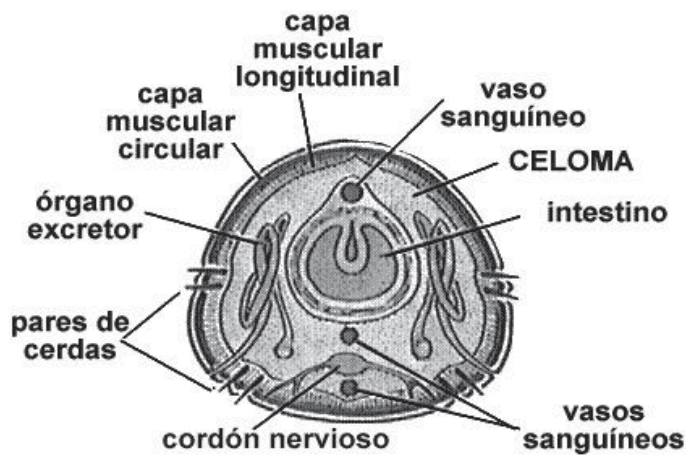


Figura 2. Corte transversal del cuerpo de la lombriz con sus estructuras internas.

HÁBITAT Y ALIMENTACIÓN.

Habita en los primeros 50 cm. del suelo, por lo tanto es muy susceptible a cambios climáticos.

Es fotofóbica. Los rayos ultravioletas pueden perjudicarla gravemente, además la excesiva humedad, la acidez del medio y la incorrecta alimentación.

Cuando la lombriz cava túneles en el suelo blando y húmedo, succiona o chupa la tierra con la faringe invaginada o bulbo musculoso. Digiere de ella las partículas animales o vegetales en descomposición y vuelve a la superficie a expulsar la tierra por el ano. A diferencia de la lombriz de tierra que se escapa con facilidad de las instalaciones de cría, la lombriz roja californiana permanece en su alojamiento siempre que no le falte comida o que las condiciones de su medio se tornen desfavorables.

Es muy prolifera: madura sexualmente entre el segundo y tercer mes de vida, su longevidad esta próxima a los dieciséis años.

Se alimenta con mucha voracidad. Consume todo tipo de desechos orgánicos.

Permanece totalmente inmune en el suelo en el que se encuentre, aunque esté contaminado.

Se pueden obtener algunos productos con fines biológicos a partir del fluido celómico. (Barbado et. al. 2004)

Las lombrices de tierra *Eisenia foetida* secretan un fluido en respuesta a estímulos eléctricos, químicos y biológicos. Por un proceso biofísico este fluido es convertido en moco, el cual le sirve a la lombriz como una barrera de protección contra parásitos y bacterias, e impide el paso de sustancias tóxicas presentes en el suelo. En un trabajo previamente publicado se encontró que el fluido es almacenado en el celoma y presenta el fenómeno de fluorescencia (Rodríguez et al, 2008).

1.4 CONDICIONES PARA SU CULTIVO.

Humedad

La humedad debe ser entre el 70 y 80 % para facilitar la ingestión de alimento y el desplazamiento a través del material. Se determina que la humedad del medio es óptima cuando al apretar un puñado de material húmedo no caen gotas. Una humedad del 85 % es perjudicial ya que compacta las camas o lechos, disminuyen la aireación y el material pierde su valor nutricional. La lombriz puede vivir con mucha humedad pero disminuye su actividad. En cambio si falta humedad puede dar lugar a su muerte porque la lombriz ingiere el alimento succionándolo. El riego puede ser, de manera manual o por aspersión, cuidando los aspectos de humedad antes mencionados., Evitar encharcamientos es recomendado para evitar la reproducción anaeróbica

Aireación

La aireación es fundamental para la correcta reparación y el desarrollo de las lombrices. Si no es la adecuada el consumo de alimento se reduce, además de disminuir el apareamiento y la reproducción debido a la comparación (Barbado et. al. 2004.).

Temperatura y pH

El rango óptimo de temperatura es entre los 12 y 25 °C. Si la temperatura es más alta como se presenta durante el verano debe recurrirse a riegos mas frecuentes, mantener las camas libres de malas hierbas y tratar de evitar que las lombrices no migren tratando de buscar ambientes más frescos. El pH mide la propiedad alcalina o acida del sustrato comida de la lombriz acepta un pH 7 (5 a 8.4). Fuera de esta escala la lombriz entra en una etapa de latencia. Si el pH es menor al valor optimo (Acido) puede desarrollar una plaga llamada “planaria”.

1.5. LA LOMBRIZ DE TIERRA EN LA ZOOTHERAPIA.

La historia de la zooterapia a base de lombrices de tierra se remonta a 4000 años antes de Cristo, en la medicina China (Zhang et. al. 1992) donde se encontró la información farmacológica relacionada con el uso de las Lombrices, de acuerdo a la medicina China tradicional, las lombrices tienen efectos antipirético, antiespasmódicas, diuréticos, antihipertensivos, antiasmáticos, detoxificante y espermatocidas. Las lombrices en la medicina China son prescritas, para cerca de 80 enfermedades como el asma, la hipertensión, las paperas, la ulcera, epilepsia y el cáncer. Etc. (Ishi y Hisashi 1992).

Aunque el uso mas conocido de las lombrices en occidente es la producción de abono orgánico, no se debe de pasar por alto que es una fabrica de biotransformación de materia orgánica (Bundy et. al. 2002 Nogales et. al. 2005) a partir de la cual se pueden obtener materiales con aplicaciones, en la medicina, los alimentos y la cosmetología (Kangmin 2004).

En China y otras partes de Asia, las lombrices son usadas por sus propiedades medicinales. Desde el punto de vista Holístico, la lombriz de tierra esta relacionada con los meridianos de la vejiga, el hígado y el pulmón, tiene propiedades saladas y se usa para el frío. Por lo que drena calor del hígado, limpia el calor del pulmón, y puede también limpiar el calor de los canales bilaterales. Típicamente, la lombriz se usa con otras hierbas para tratar una amplia gama de condiciones que van desde los espasmos y convulsiones a, a la liberación de l dolor, el tratamiento de la fiebre, algunos tipos de asma y bronquitis y ciertos tipos de artritis (Moss 2004).

El procesamiento de la lombriz para fines medicinales no esta bien definido, ya que no existe un control de calidad tanto en la producción como en la cosecha. Para su producción no se aconseja el uso de estiércol, sin embargo, se usa y aun más se llegan a preparar para usos medicinales. En cuanto a su preparación algunas veces son capturadas, muertas y entonces desvisceradas, las viseras y componentes orgánicos son lavados y retirados,. El gusano es entonces secado y usado para medicina. En este proceso se pueden perder algunos componentes activos que se encuentran en los fluidos de la lombriz y entonces los efectos no son reproducibles. La preparación de las lombrices para su administración se hace en forma de polvo encapsulado (Ishi y Hasashi 1992; Li et. al. 2002) o bien asociado a polvos preparados de plantas medicinales. Este tipo de preparaciones pueden ser encontradas en algunos mercados asiáticos y principalmente en tiendas naturistas: En cuanto a las dosis administradas ni hay estudios caracterizados y se usan dosis de 4.5 a 12 gramos por día como una decocción, de 10 a 2 gramos cuando son lombrices frescas, y de 1 a 2 gramos en forma de polvos por la vía oral (Ishi y Hasashi 1992; Kangmin 2004).

Debido a que son de sabor fuerte estas pueden ser de sabor salado y sabor a pescado, por lo que pueden causar nauseas y vomito en individuos sensibles. Este efecto se presenta cuando son administrados en forma de polvo o son tomados con jugos cítricos y otras hierbas, algunos pacientes pueden experimentar reacciones alérgicas. Por lo que no deberán ser tomadas por mujeres embarazadas o lactantes.

1.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LOMBRIZ DE TIERRA.

La lombriz de tierra al ser un biotransformador posee la capacidad de adquirir de su propia dieta los elementos presentes en el sustrato del cual se alimenta e incluso incorporarlos a sus estructuras biológicas. La composición física y química de elementos presentes en la lombriz de tierra, se mencionan tomando en cuenta la materia seca (MS), cenizas (Cz), fibra cruda (FC) y nitrógeno (N), Ácidos grasos, junto con la proteína más estudiada proveniente del fluido celómico. Así mismo se hace énfasis en el valor de la fracción nitrogenada, macro y micro elementos.

Cabe señalar que el valor cuantitativo de elementos presentes puede variar entre especímenes, debido a la dieta a la que son sometidos, gracias a su característica de biotransformador mencionada anteriormente. La fluctuación puede variar entre tipos de dieta y análisis realizados. (García, Macías y col. 1997).

Tabla 2. Muestra la composición química de la pared celular de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*. (García, Macías y col. 1997)

MS= Materia seca

N= Nitrógeno

Cz= Cenizas

EE=Extracto Etéreo

FC= Fibra Cruda

FND= Fibra neutra detergente

FDI= Fibra dietética insoluble

EB= Energía Bruta

INDICE	
S	%
MS	20.44
N x 6.25	62.13
Cz	10.94
EE	8.63
FC	2.02
FND	2.70
FDI	9.19
EB	
(kJ/g MS)	21.19

Tabla 3. Contenido de aminoácidos de la especie (García, Macias y col. 1997).

Aminoácidos	g/100g proteína
Alanina	4.36
Arginina	4.83
Acido aspártico	8.34
Cistina	1.51
Acido glutámico	11.01
Glicina	4.42
Histidina	2.87
Isoleucina	3.67
Leucina	6.02
Lisina	5.21
Metionina	1.47
Fenilalanina	1.26
Serina	3.52
Treonina	3.66
Tirosina	0.56
Valina	4.48

Tabla 4. Contenido de macroelementos. (García, Macias y col. 1997)

Macroelemento	%
Fósforo	1.1
Potasio	1.1
Magnesio	0.1
Calcio	1.6
Sodio	0.5

Tabla 5. Ácidos grasos del extracto crudo de lombriz de tierra. (Marilou y Realm 2007)

Ácidos Grasos			
		g/100g aceite	g/100g crudo
Saturados			
12:0	Laurico	16.6	0.23
14:0	Mirístico	4.38	0.06
16:0	Palmítico	2.21	0.03
18:0	Esteárico	2.92	0.04
20:0	Araquídico	2.52	0.04
22:0	Behénico	1.22	0.02
Monoinsaturado			
18:1 w-9	Oleico	0.82	0.01
Poliinsaturado			
18:2 w-6	Linoleico	1.99	0.03
Total		32.66	0.46

Los ácidos grasos mencionados anteriormente, tienen especial interés, ya que presentan actividad antimicrobiana, antiviral, son precursores en el organismo de mediadores de la inflamación como las prostaglandinas (linoleico), reducción de ataques al corazón y arteriosclerosis e incluso como insecticidas, por lo que la lombriz de tierra resulta una fuente representativa de este tipo de ácidos (Marilou y Realm 2007).

Vielba, Usuvillaga y Medina (2003), realizaron un análisis de la harina, un subproducto de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, en donde se encontró una diversidad de ácidos, mencionados en la siguiente tabla.

Tabla 6. Ácidos grasos de harina de lombriz (HL) obtenidos por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS). (Vielba, Usubigalla y Medina 2003)

Harina de lombriz (g/100g)		
Acido Graso	HL	HSE
Saturados		
Udecílico	NC	NC
Laurico	$1,58 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,05$
Tridecílico	$0,37 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$
Mirístico	$0,55 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,02$
Pentadecílico	NC	NC
Palmítico	$0,72 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,03$
Margárico	$0,45 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$
Esteárico	$1,44 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,04$
Total de saturados	5,11	5,11
Monoinsaturado		
Undecenoico	NC	NC
Palmitoleico	NC	NC
Oleico	$0,98 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,03$
Elaídico *	$0,84 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,04$
Gadoleico	$0,94 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,04$
Total de monosaturados	2,8	3,14
Polinsaturados		
Linoleico ¹	$0,93 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,03$
Eicosatrienoico	NC	NC
Araquidónico ¹	NC	NC
Total de polinsaturados	0,93	0,92

NC: no cuantificados

Es evidente que en la dieta, un subproducto de la lombriz como es la harina, proporciona una fuente rica de lípidos que al ser incorporados al organismo tienen una influencia en la prevención o tratamiento de enfermedades.

El fluido celómico contenido en el celoma del animal, posee 45-kDa de la proteína denominada Factor Celómico Citolítico, el cual ha sido materia de diversos estudios, ya que también es hemolítica y por lo tanto antibacteriana (Beschinn, Bilej y col. 1998). Los principales materiales antibacterianos en el

líquido celómico de la lombriz son antígeno-proteínas de unión, aglutininas, proteínas aglutinantes y la lisozima (Wang, Zun, Zheng 2006.).

1.7 CARACTERIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS DE LA LOMBRIZ DE TIERRA.

Estudios de la caracterización de moléculas con actividad biológica presentes en la lombriz de tierra, han sido enfocados a la actividad estimuladora de extractos de la lombriz de tierra sobre el bulbo olfativo de las víboras (Liu et. al. 1997; Rodríguez 2005), y a la presencia de proteínas con actividad biológica presentes en el fluido celómico de la lombriz de tierra, de las cuales se han descrito al menos unas cuarenta proteínas, algunas de las cuales ejercen efectos biológicos importantes como son: actividades citolíticas, proteolíticas, hemolíticas, hemoaglutinantes, antitumorales, mitogénicas y bacteriostáticas. Sin embargo, estas proteínas no son responsables de los efectos farmacológicos encontrados en algunos estudios realizados en humanos y animales como son: los efectos hipotensores, antiasmáticos, antipiréticos y sus propiedades antidiabéticas y antilipidémicas.

Estudios farmacológicos y de caracterización de moléculas de bajo peso molecular son escasos entre los trabajos mas recientes, se tiene un trabajo de Li y col. (1997) donde exploraron las actividades farmacológicas hipotensivas, antiasmáticas, antipiréticas, y diuréticas del extracto acuoso de *Pheretima* y encontraron efectos significativos. En otro estudio hecho por estos mismos autores usaron una solución de *Lumbricus* heridas (Li. et. al. 2000). Tres estudios se han reportado para plantear los estándares de calidad de preparados medicinales hechos a base de lombrices (Wang et. al. 1998; Yang et. al. 2000; Fang 2002). Solamente en un estudio se ha aislado y caracterizado químicamente un compuesto sin actividad farmacológica, conocida como la luciferina, presente en las lombrices de tierra y responsable de la bioluminiscencia observada en dichos organismos (Ohtsuka et. al. 1976).

El efecto hipotensivo de un polvo preparado de lombriz de tierra fue patentado por Ishi y Hasashi 1992. Ellos reportaron que el efecto hipotensivo

del polvo de lombrices realizado en ratas hipertensas espontáneas y en 4 personas con hipertensión. La explicación a los efectos antihipertensivos, dicen que se deben a sustancias que hay en el polvo de lombriz. El efecto hipotensivo pudiera deberse por un efecto directo al corazón o bien un efecto sobre la musculatura lisa vascular. Sin embargo no se han hecho estudios dirigidos a dilucidar dicho efecto.

1.8. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

FUNDAMENTOS

Para la determinación de perfil de actividad biológica de algún compuesto obtenido por un espécimen vegetal o animal, se realizan pruebas orientadas a detectar posibles actividades que están fundamentadas en el conocimiento empírico descrito en diversas culturas, o en antecedentes de la bibliografía científica. Este es el punto de partida para formular la hipótesis, objetivos, así como los parámetros a medir, y los límites de estudio.

Es necesario identificar los medios y materiales de los que se dispone para realizar un diseño experimental acorde a la hipótesis y los objetivos planteados, buscando una culminación favorable de la investigación.

MATERIALES Y METODOS

Dependiendo de la naturaleza y las propiedades de la planta o parte animal en estudio, se plantea la metodología que será la que rijan la efectividad del mismo y se eligen los materiales y reactivos necesarios para llevarla a cabo de tal forma que tenga un beneficio en calidad costos y tiempo.

Los puntos importantes a tomar en cuenta para la descripción y desarrollo de la metodología son:

PREPARACION DEL EXTRACTO.

Para la correcta preparación del extracto, es necesario reconocer la naturaleza del compuesto que se busca o su posible comportamiento químico, es decir, la naturaleza del solvente, o mezcla de solventes, necesaria para

arrastrar los compuestos de interés. De esta manera se podrá usar la solución obtenida o en su defecto buscar una evaporación favorable del solvente, la cual tenga como resultado el residuo que será sometido a experimentación. Para la evaporación se deben tener precauciones por si existen compuestos termolábiles o si se descomponen al contacto con otros solventes usados para este fin. Si nos se conoce se realizan pruebas con solventes polares y se va aumentando dicha polaridad dependiendo de los resultados obtenidos. La extracción se puede realizar por diversos métodos, como son, la precolación, maceración, infusión, siendo estas las más representativas, teniendo como fin común la disminución de partícula y la correcta extracción. También es necesario calcular el rendimiento de la especie en estudio, para cuantificar la cantidad a utilizar y así tener una muestra representativa.. Por lo general para este efecto se realizan pruebas piloto con muestras relativamente pequeñas de muestra

El tiempo de retención del solvente y la compactación del material son de gran importancia ya que este puede tener más contacto con la superficie del material y por lo tanto una mejor solubilidad de los compuestos buscados.

EVALUACION DEL EXTRACTO EN TEJIDO ANIMAL

Se selecciona un modelo animal con estado fisiológico adecuado. De forma completamente análoga es esencial escoger un “adecuado sistema viviente intacto”, no solamente para descubrir la actividad farmacológica del extracto si no las posibles reacciones secundarias. (Levine 1982) .El órgano u órganos necesarios para la experimentación deben tener las características necesaria para expresar una modificación en su metabolismo, registrado en el acervo empírico o bibliográfico, de forma que se pueda cuantificar y analizar.

Los controles se destinan para descartar efectos ocasionados por vehículos o solventes usados, además que es fundamental para evaluar el comportamiento de los tejidos en estado basal e identificar correctamente el efecto. Así mismo se pueden utilizar como un comparativo del efecto observado usando fármacos de acción conocida denominados también como sustancia patrón,

El número de animales de prueba tiene un especial interés en la evaluación farmacológica, ya que determina la significancia estadística. Por lo tanto es necesario realizar un cálculo de número de sujetos (n) con una prueba piloto en donde se identifique el comportamiento de los datos obtenidos con un número de sujetos necesarios para determinar o no una significancia estadística.

Aspectos Éticos

En todas aquellas circunstancias en las que definitivamente se considere indispensable la prueba in vivo, y en las que no existan alternativas al uso del animal del laboratorio, la investigación debe regirse por la conducta en la que prime el principio de minimizar cualquier dolor o angustia que sea forzoso infringir en el animal. Se considera que los modelos experimentales, contemplados en cualquier estudio sean necesarios para dilucidar cualquier efecto buscado.

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO.

El fraccionamiento del extracto se lleva a cabo de acuerdo a la naturaleza observada en él, y al igual que en la extracción se busca usar solventes de baja polaridad hasta solventes de polaridad alta, realizando mezclas con proporciones diferentes y se elige la mezcla de polaridad ideal en la que se observó mayor cantidad de compuestos separados a través de una cromatografía en capa fina usada como estudio piloto.

Al tener identificada la fase móvil necesaria se realiza una separación en columna de los compuestos de los que está formado el extracto, con la finalidad de tenerlos en diferentes proporciones y de esta manera proceder a la evaporación inducida que tenga como resultado el compuesto relativamente puro.

2. JUSTIFICACION

El estudio de actividades farmacológicas provenientes de animales es un campo emergente y necesario para explicar los efectos encontrados de medicamentos preparados a partir de animales. Ya que los datos empíricos que se poseen en la medicina tradicional pueden ser un parte aguas para el estudio de sus posibles aplicaciones en el tratamiento de múltiples enfermedades para la sociedad es necesario que sean tomados en cuenta, pues resulta importante que a pesar del transcurso de los años, distintas poblaciones las conserven dentro de su reservorio empírico como una búsqueda de mantener la salud. Para el caso de los subproductos de la lombriz de tierra no hay estudios que complementen las actividades farmacológicas descritas en la literatura. Estudios preliminares en nuestro laboratorio como son: respuestas olfatorias en roedores y aves, nos hicieron pensar que en el fluido celómico se encuentran compuestos no proteicos, los cuales no han sido caracterizados. Por lo tanto, en el presente proyecto planteamos la necesidad de caracterizar las moléculas presentes en los extractos del fluido celómico de la lombriz de tierra y evaluar la posible actividad farmacológica.

3. HIPOTESIS

La lombriz de tierra es un organismo que puede producir y secretar compuestos a través del fluido celómico con actividades farmacológicas importantes sobre el músculo liso vascular, aumentando la capacidad de respuesta contráctil a los neurotransmisores naturales. Dichos compuestos no tienen naturaleza proteica.

4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

- 1) Separación e identificación espectroscópica de los pigmentos fluorescentes secretados por la lombriz de tierra Eisenia foetida.
- 2) Evaluación de la actividad farmacológica del extracto semipurificado sobre la contracción del músculo liso vascular.
- 3) Caracterización química del componente de la fracción del fluido celómico, con actividad farmacológica.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Población.

La población objeto de este estudio fueron lombrices de tierra Eisenia foetida y Ratas Wistar-Kioto de ocho semanas. Como el estudio fue exploratorio, las muestras de lombrices se hicieron al azar a partir de los cuatro cajones de reproducción. Para los estudios de contracción de vasos se uso una muestra de 10 ratas, sobre las cuales se probó en condiciones con endotelio y sin endotelio, el efecto del extracto.

5.2 Animales.

Lombrices de tierra Eisenia Foetida. Nuestro laboratorio tiene un cultivo de lombrices mantenidas bajo condiciones adecuadas de humedad 80% y temperatura 25°C, libres de interferencias debidas al alimento, ya que no se cultivan con estiércol, bajo una dieta a base de desechos orgánicos, especialmente cáscara de plátano, lo que nos ha permitido conocer el ciclo de vida de estos organismos, por lo tanto, se dispuso de animales nacidos y crecidos dentro del laboratorio. Para este trabajo se utilizaron lombrices maduras con clitelo y con pesos de 300 mg en promedio.

Ratas Wistar-Kioto macho fueron mantenidas en el bioterio bajo condiciones adecuadas de alimento y agua ad libitum, a las ocho semanas serán pesadas y llevadas al laboratorio.

5.3 Obtención del fluido celómico de lombrices de tierra.

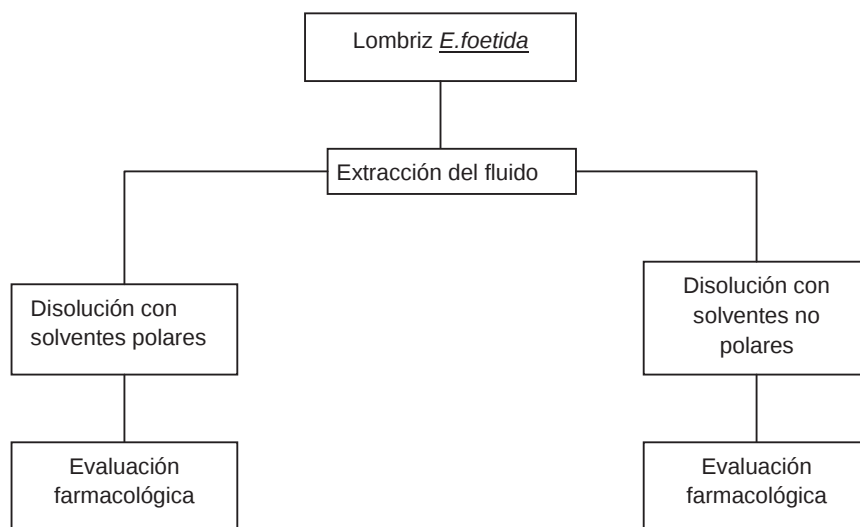
10 lombrices de tierra fueron retiradas del medio de crecimiento y lavadas con agua desionizada libre de pirógenos. Una vez lavadas y secas se colocaron en cajas de Petri con papel absorbente húmedo durante 24 horas para permitir el vaciamiento del tubo digestivo.

Secreción del fluido celómico. Las lombrices (3 unidades) se estimularon con pulsos de corriente eléctrica (8 volts, duración 7 ms por 2 segundos) dentro de un tubo de ensayo del No. 45048 perfectamente limpio y seco. El fluido celómico fue separado con la ayuda de un gancho elaborado a partir de un agitador de vidrio, dejando en el tubo toda la secreción obtenida, retirando al animal integro y colocándolo dentro de una caja de petri con papel absorbente húmedo protegido de la luz.

5.4 Fraccionamiento del fluido celómico.

El fluido celómico obtenido fue sometido a disolución en solventes polares, (agua, etanol absoluto, acetona, n-butanol) y solventes no polares (hexano, cloroformo, diclorometano), usando cada uno por separado para cada fluido producto de 3 lombrices. De esta manera, buscamos que los compuestos solubles en cada uno de los solventes, fueran separados de la fracción no soluble del fluido celómico, o que formaran una sola fracción soluble del mismo, dependiendo de la naturaleza química de cada solvente. Debido a que el fluido celómico esta compuesto de células y liquido celómico junto con algunas proteínas, cada tubo de ensayo se centrifugó a 3000 rpm por 20 min., buscando la precipitación de los compuestos con mayor peso molecular, y la formación de una fase orgánica y una inorgánica, en el caso de los solventes no polares, la cual fue separada en tubos distintos, rotulando su origen y la naturaleza de la solución obtenida. Después de tener cada tubo con

cada fracción específica, se taparon y almacenaron a 4 °C hasta el momento de su uso en la evaluación farmacológica como se muestra en el siguiente diagrama:



5.5 Separación de moléculas del fluido celómico por Técnicas cromatográficas.

5.5.1 Cromatografía en placa de silica gel TLC.

Ya que comprobamos que el extracto acuoso recuperado de hexano era el que presentaba el efecto procedimos a buscar una separación de los componentes químicos. Se obtuvo 0.2 ml de la fracción no soluble del fluido celómico (fase acuosa) recuperada de hexano, con el procedimiento descrito en el apartado 5.3 y 5.4; la cual se montó en una placa clásica de silica gel (TLC) de 20 x 20 cm, valorando su amplio uso en casi todos los tipos de separación y su fácil manipulación (Manual TLC), usando un tubo capilar para la aplicación, guiándonos en una sola línea marcada con lápiz y secando el agua por cada pasada sobre la misma, junto con controles de naftaleno y riboflavina 0.1ml de cada uno en la misma placa. Después de tener la muestra completamente esparcida y seca, se puso la placa en una cámara con una fase móvil compuesta por Hexano-Etanol-Etilacetato buscando diferentes proporciones para aumentar la polaridad del eluyente, hasta una proporción

4:2:4 respectivamente hasta que el frente de solvente recorrió la distancia deseada (aproximadamente 1.5 hrs).

Al final de este tiempo, se midió el trayecto del solvente y de las manchas autofluorescentes encontradas con la ayuda de una lámpara de luz UV. Se marcaron con lápiz y calcularon los valores de RF. Las manchas se recuperaron en 6 ml de acetona. Las manchas encontradas fueron sujetas a prueba en tejido biológico para comprobar su efecto contráctil en anillos de aorta como se describe en la sección (Evaluación de la actividad Farmacológica).

5.5.2 cromatografía preparativa

Una vez, que pudimos separar algunos compuestos por cromatografía en capa fina, se decidió, tratar de limpiar y concentrar los compuestos utilizando una placa preparativa de silica de 20 x 20 cm y 0.2mm de espesor con indicador fluorescente. Aplicamos 1.5 ml de extracto recuperado de hexano con la ayuda de un capilar, secando por cada pasada; ya que la placa es gruesa y absorbe agua secamos con la corriente de aire de un ventilador. Una vez seca, se colocó en una cámara con una fase móvil de Hexano-Etanol-Etilacetato en una proporción 4:2:4 respectivamente, hasta la elusión deseada. Después se puso al flujo de aire hasta que seco, para volver a ponerla en la cámara; repitiendo este procedimiento seis veces, con el fin de lograr una mejor separación de las manchas.

5.5.3 Técnica de separación y purificación de algunos compuestos del fluido celómico (Columna)

Alternativamente, se eligió la técnica de cromatografía en columna para separar la presencia de compuestos presentes en el fluido celómico. La técnica se montó con una columna de vidrio con 200 ml de capacidad a la cual se le pusieron 70 g de sílica gel 70-230 Mesh. 60A. humedecida con hexano; posteriormente se colocaron 2.5 ml de extracto acuoso después de hexano, observando una capa superior homogénea correspondiente a esta. Se

empezó a correr la cromatografía usando 60 ml de hexano como eluyente, recogiendo el mismo en viales de 10 ml. Se Continuo buscando un cambio de polaridad con etilacetato con proporciones de 60 ml, que fueron desde 9:1 hasta 0:10 respectivamente. Al terminar usamos mas solventes aumentando la polaridad con: Etilacetato, Etanol- Etilacetato 5:5, etanol, éter, diclorometano y metanol. Como control, usamos placas clásicas de sílica gel (TLC) de 2.5 x 6 cm corridas en la fase móvil Hexano-Etanol-Etilacetato 4:2:4, observando las manchas autofluorescentes con la ayuda de una lámpara de luz UV.

Identificamos el vial que tenia la muestra buscada, se corrió en una placa control junto con el crudo (EADH), para comprobar que era la mancha con el RF buscado, y se dejo evaporar el vial que lo contenía en una campana de flujo laminar.

5.6 Identificación de los compuestos presentes en el fluido celómico.

En muestras del fraccionamiento del fluido celómico: etanol, hexano, metanol y diclorometano, fueron sometidas cromatografía de gases acoplada a masas, ya que se sospecho de la presencia de compuestos volátiles, debido a que algunos de los extractos desprendieron olores agradables al olfato. Para realizar esta actividad, los extractos se sometieron a la variante de microextracción en fase sólida. En dicha técnica, fibras adsorbentes fueron colocadas a las tapas de viales de extracción (5 ml). Después de (tiempo) las fibras fueron retiradas y colocadas directamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies. Equipado con una columna HP5 o FFAP (30x0.25x0.25), con el gas acarreador Helio a un flujo 1 ml/min y un programa de temperatura de 40 °C inicial por 5 min, con incrementos de 3 °C/min hasta llegar a 180 °C. La temperatura del detector fue 250 °C, con un tiempo de corrida de 57 min. Los componentes separados fueron identificados por comparación con datos de la Librería.

5.7 Estudios de RMN.

De la cromatografía en columna, se logro aislar y cristalizar una molécula, a la cual se le hicieron algunas pruebas de identificación, como fue solubilidad, punto de fusión, Análisis de resonancia magnética nuclear, y cromatografía de gases-masas. Para resonancia la muestra se disolvió en (DMSO -d₆) y la muestra se corrió en un equipo de resonancia (modelo características, una frecuencia de 400 Mhz.), mientras que para gases, se hizo otra separación por columna y los cristales fueron recuperados con diclorometano, disueltos en (poner solvente) y sometidos a cromatografía de gases y masas para tener un complemento significativo de la RMN.

5.8 La evaluación de la actividad farmacológica

La evaluación de la actividad farmacológica del extracto crudo y semipurificado, se llevo a cabo en dos modelos de contracción de músculo liso: a) anillos de aorta con endotelio y b) anillos de tráquea.

Ratas de ocho semanas fueron pesadas y pasadas a una cámara de CO₂ para su muerte por asfixia. Las aortas torácicas junto con la tráquea fueron retiradas a través de una incisión abdominal y limpiadas quitándoles la mayor cantidad de material adherente y tejido graso, en seguida los tejidos se colocaron en una caja de petri con solución Krebs de la siguiente composición: 11.1 mM de NaCl , 4.7 mM de KCl, 2.5 mM de CaCl₂, 1.2 mM de KH₂PO₄, 1.2 mM de MgSO₄ , 24.9 mM de NaHCO₃ y 10 mM de glucosa. Las aortas fueron cortadas transversalmente en anillos de 3 a 4 mm de longitud. Se colocaron un par de anillos para registrar tensión en tráquea, y dos pares de anillos más para el registro de tensión en aorta. Los anillos de tráquea y aorta fueron montados en una cámara de órgano aislado, mantenidos a 37 °C con un burbujeo constante de gas carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂).

Cada anillo de arteria y aorta se sujetó por un extremo a la base de la cámara con el gancho de nicromo y por el otro lado un transductor de tensión

isométrica (FT03 Transductor de fuerza Grass; astro-med, Inc. West Wawick, RI USA) el cual estaba conectado a un sistema de adquisición de datos para medir la tensión deseada (MP100 Biopac Inc. Santa Bárbara CA, EUA).

Después de colocar los anillos en la cámara de órgano aislado, se les dio una tensión inicial de 2 g mantenida por 30 min para la adaptación del tejido a las condiciones planteadas.

Los anillos de aorta y tráquea fueron contraídos con soluciones crecientes de fenilefrina y carbacol (1×10^{-8} M – 1×10^{-5} M) para arteria y tráquea respectivamente, obteniendo curvas dosis respuestas acumulativas que fueron usadas como controles. Ya construidas las curvas deseadas se lavaron los tejidos con solución Krebs, desensibilizando el estímulo de los agonistas usados, hasta que los anillos registraban la tensión inicial de 2 g.

Cada uno de los extractos crudos y semipurificados de la lombriz de tierra *Eisenia Foetida* (20 μ l – 40 μ l) se evaluaron en ambos tipos de anillo después de la obtención de las curvas control. Probándose de manera inicial luego de una contracción inducida por una concentración media (1×10^{-6}) buscando un efecto relajante, posterior a esto se lavaron los tejidos hasta la tensión inicial, y se evaluaron los extractos en estado basal, buscando un efecto contráctil. Al terminar los estímulos aplicados, se lavo el tejido y se construyó nuevamente la curva dosis respuesta inicial o en su defecto se aplicó la concentración media antes mencionada, analizando y anotando fluctuaciones observadas.

5.8.1 Prueba en tejido de las manchas obtenidas por cromatografía

Al tener cada uno de los componentes separados e identificados por cromatografía preparativa, se montó la cámara de órgano aislado con anillos de aorta y tráquea, usando el procedimiento indicado en el apartado 5.5, con la variante; que en lugar de evaluar los extractos crudos y “semipurificados”, se evaluaron cada una de las manchas obtenidas por cromatografía preparativa disueltas en agua y DMSO en proporción 8:2, con la finalidad de identificar cual

de los compuestos separados era el responsable de la actividad farmacológica observada.

5.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio de los porcentajes de contracción $\pm$ la desviación estándar. Las diferencias estadísticas entre los datos de potenciación, antes y después del procedimiento, fueron determinadas con la prueba *t* de Student. La significancia se estableció en $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de los extractos crudos y semipurificados del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, en anillos de aorta.

Se realizaron curvas dosis respuesta de músculo liso de anillos de aorta con endotelio en respuesta a la fenilefrina, en las cuales se observó una respuesta dependiente a la concentración. Al tener cada uno de los extractos en los diferentes solventes (agua, etanol absoluto, acetona, n-butanol, hexano, cloroformo, diclorometano) junto con las fases acuosas recuperadas de los no polares, se realizó una evaluación de la actividad biológica en los modelos de órgano aislado, descartando el efecto del solvente, utilizando un anillo control para este caso. El extracto crudo del fluido celómico, tuvo un efecto constrictor sobre los anillos de aorta. Después de ensayar los extractos con diferentes solventes, la fracción acuosa obtenida después de recuperación con hexano presento un efecto significativo sobre la preparación de anillo de aorta (figura 3). Luego de varios experimentos, al reproducir la curva dosis-respuesta control, y después de adicionar el extracto acuoso recuperado de hexano (figura 4), se observó que el mismo, presentó una actividad potenciadora de la fenilefrina en el tejido vascular de la aorta, modulando la respuesta en un aumento de hasta 1 g de tensión y manteniendo la contracción del agonista hasta por 40 min después de su meseta (figura 5). En las arterias estudiadas es evidente la participación del extracto acuoso recuperado de hexano, para la potenciación del agonista fenilefrina, antes y después del estímulo. Todo lo anterior resulta una evidencia significativa en el efecto farmacológico del extracto para la modulación del tono vascular del tejido en estudio.

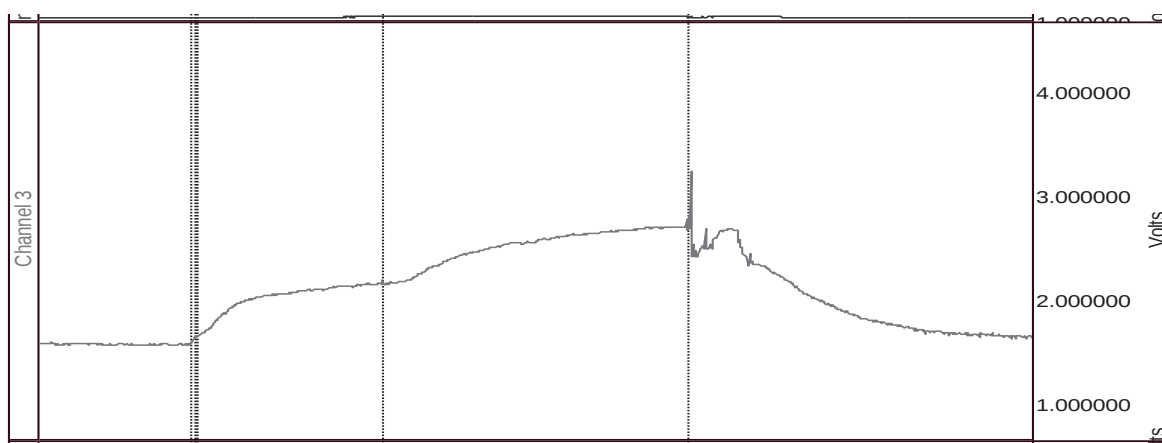


Figura 3 Trazo representativo, el cual muestra el efecto del extracto en un anillo de aorta en estado basal.

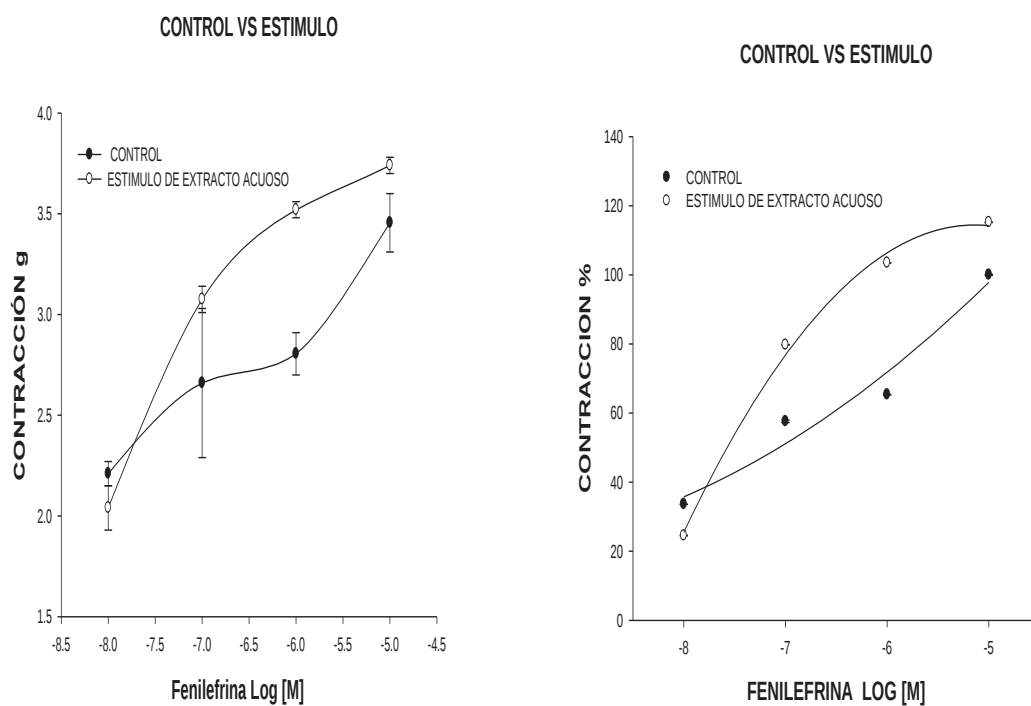


Figura 4. Curvas dosis -respuesta acumulativa a fenilefrina en aortas con endotelio, antes y después de un estímulo de 20 µl con extracto acuoso recuperado de hexano. Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

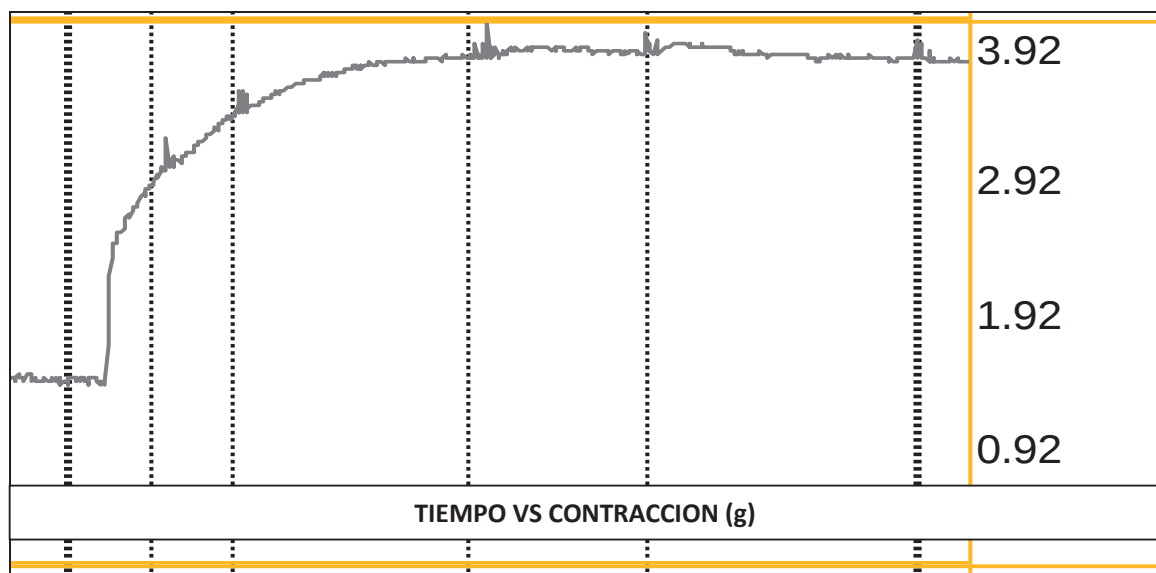


Figura 5. Trazo representativo que muestra la contracción del anillo de aorta mantenida por el agonista después de un estímulo con el extracto acuoso.

En la figura 6 se observa la potenciación estadísticamente significativa $p < (0,05)$, que ocasiona el extracto, al agonista α -adrenérgico con un aumento de contracción ≈ 1 g, en base a la respuesta control. Es evidente que el extracto favorece la actividad de la fenilefrina potenciando su efecto actuando en conjunto con él (3ra. barra) o después de la desensibilización del tejido a esta interacción, solo con el estímulo del agonista sobre los anillos (Última barra).

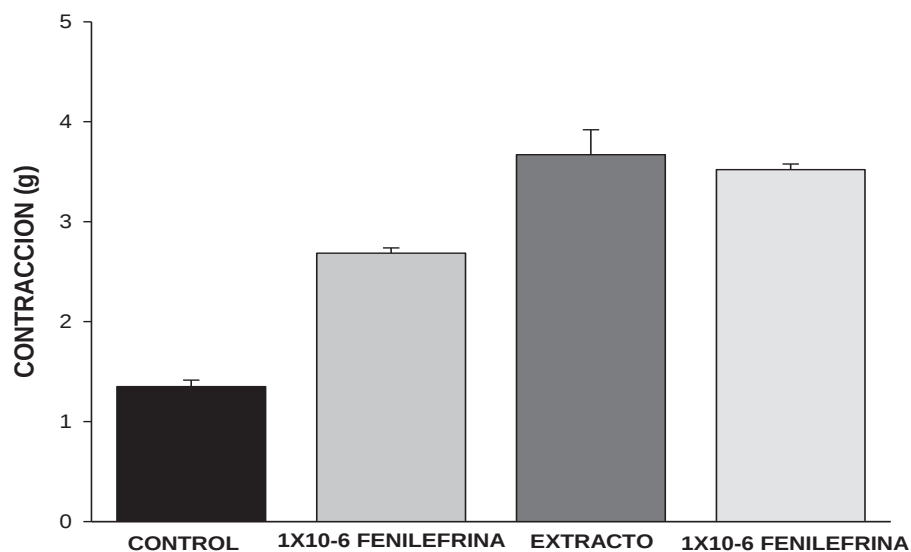
EFEECTO DEL EXTRACTO

Figura 6. La tensión basal en anillos de aorta (control), después de una concentración media de fenilefrina antes del estímulo del extracto (segunda barra), y la respuesta junto con el extracto (tercera barra), y la última barra de la derecha muestra esta misma concentración después del lavado del estímulo. Cada barra representa el promedio $\pm$ error estándar de 5 experimentos.

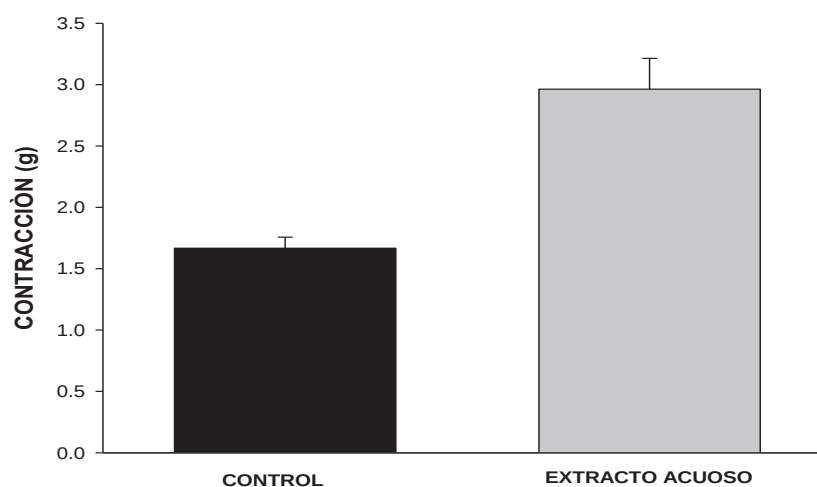
EFEECTO DEL EXTRACTO EN ESTADO BASAL

Figura 7. Fuerza de contracción de anillos de aorta por el efecto del extracto acuoso recuperado de hexano desde su estado basal sin estímulo de agonista. Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 experimentos.

En la figura 7, se ilustra el efecto del extracto acuoso recuperado de hexano. La primera barra es la tensión basal. La segunda barra es un estímulo del extracto, dicho extracto provocó una contracción percé de ≈ 1.3 g en el tejido vascular de la aorta. Ya que no existe un estímulo exógeno anterior a este es claro que el extracto puede llevar a cabo una contracción significativa en los anillos de aorta con endotelio. Este fenómeno no sucede con el fluido celómico, existiendo una ausencia de respuesta.

6.2 Evaluación de los extractos crudos y semipurificados del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, en anillos de traquea.

El extracto crudo no tuvo efecto inicial sobre los anillos de traquea, sin embargo, cuando los anillos de traquea son estimulados con carbacol, después de adicionar el extracto acuoso, se observó una potenciación del efecto del carbacol (Figura 8). De la misma forma que en los anillos de aorta, los datos obtenidos por la acción del extracto, implican un aumento en la potencia del fármaco. Resulta evidente, que el efecto es mayor en los anillos de tráquea, cuando el extracto se aplica con el agonista muscarínico; modulando la constricción de los anillos a concentraciones mayores de carbacol (que van desde 5.47×10^{-6} M en adelante, siendo mas evidente y estadísticamente significativa $p < (0,05)$ a partir 5.47×10^{-5} M), en comparación con las primeras concentraciones aplicadas, donde no se observó un aumento en la potencia.

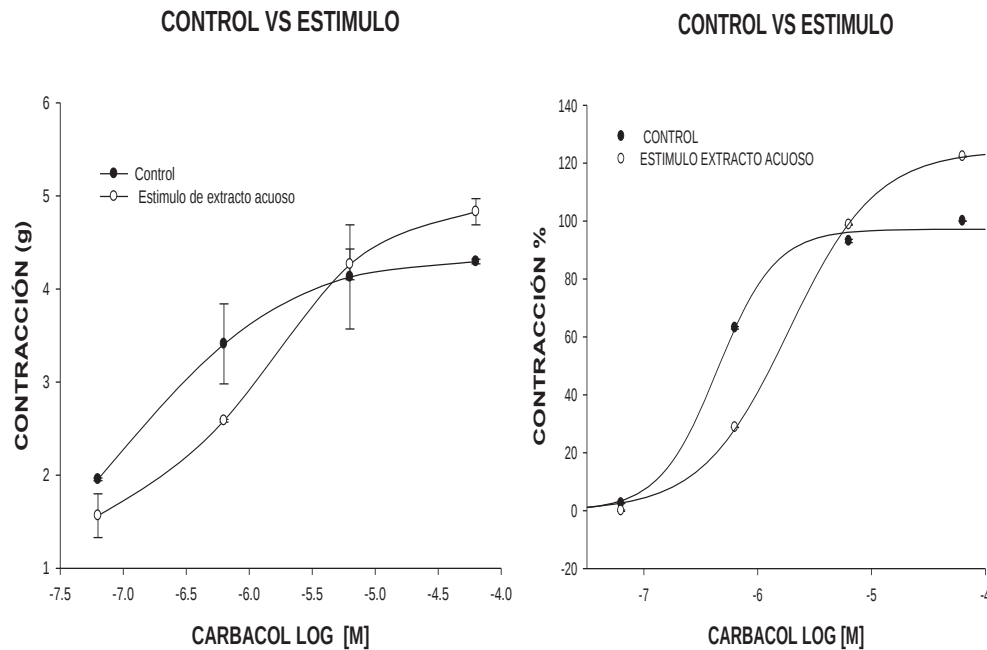


Figura 8. Curvas dosis -respuesta acumulativas a carbacol, en anillos tráqueas con endotelio, antes y después de un estímulo de 20 μ l con extracto acuoso recuperado de hexano. Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

En la figura siguiente se observa el efecto contráctil del agonista muscarínico (Carbacol) sobre anillos de tráquea con endotelio, considerando su actividad en estado basal, usada como control. Luego se ve la contracción inducida por una concentración media del fármaco; antes y después del estímulo (D.E.) exógeno con extracto acuoso recuperado de hexano. A través de los cuales es evidente que existe una potenciación del efecto agonista del carbacol, cuando se aplica el extracto a los anillos, fluctuando los valores con un valor ≈ 0.6 g entre uno y otro. Con respecto a la potencia observada en los anillos de aorta (figura 4), se deduce que en tráquea el extracto tiene un efecto potenciador del agonista mas evidente a concentraciones altas, lo contrario a los anillos de aorta, que resulta claro desde concentraciones pequeñas.

EFEECTO DEL EXTRACTO

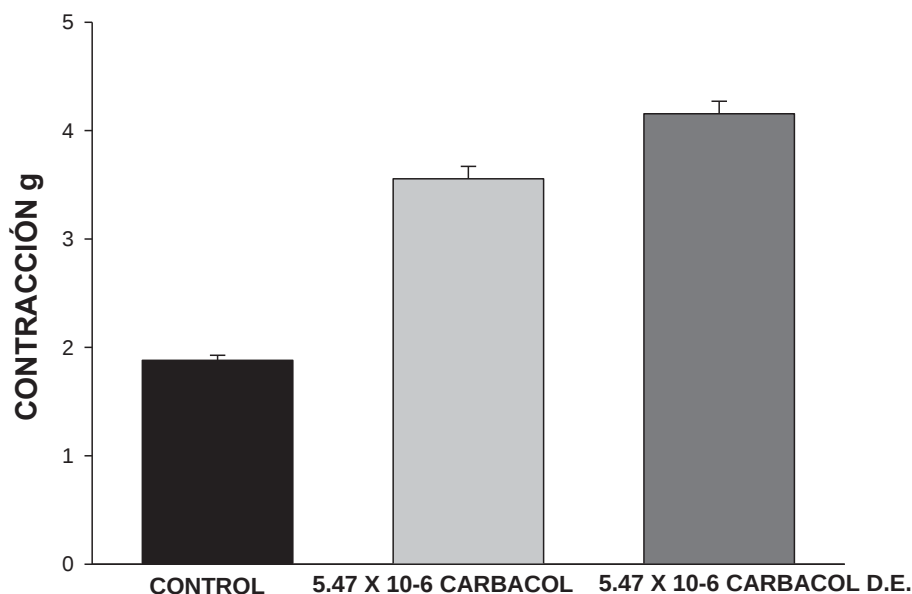


Figura 9. Fuerza contráctil inducida por una contracción media de carbaccol, antes y después de un estímulo de extracto acuoso recuperado de hexano. Cada barra representa el promedio $\pm$ el error estándar de 4 experimentos.

En la figura 10 observamos la respuesta de la mancha separada de la cromatografía preparativa (0.8 mg) con un RF de 0.31, después de 3 minutos de su aplicación, en un anillo de aorta con endotelio, el cual muestra el efecto ocasionado por el extracto acuoso recuperado de hexano. La contracción inducida por este estímulo fue de ≈ 0.5 g, observándose una ritmicidad en la constricción de los vasos. Esta respuesta puede ser un indicador de que el efecto del extracto en aortas está mediado por la interacción con otras moléculas presentes en él.

La respuesta de la mancha se hizo en 2 experimentos distintos, y con 2 muestras recuperadas en placas diferentes, validándose la respuesta a la muestra probada.

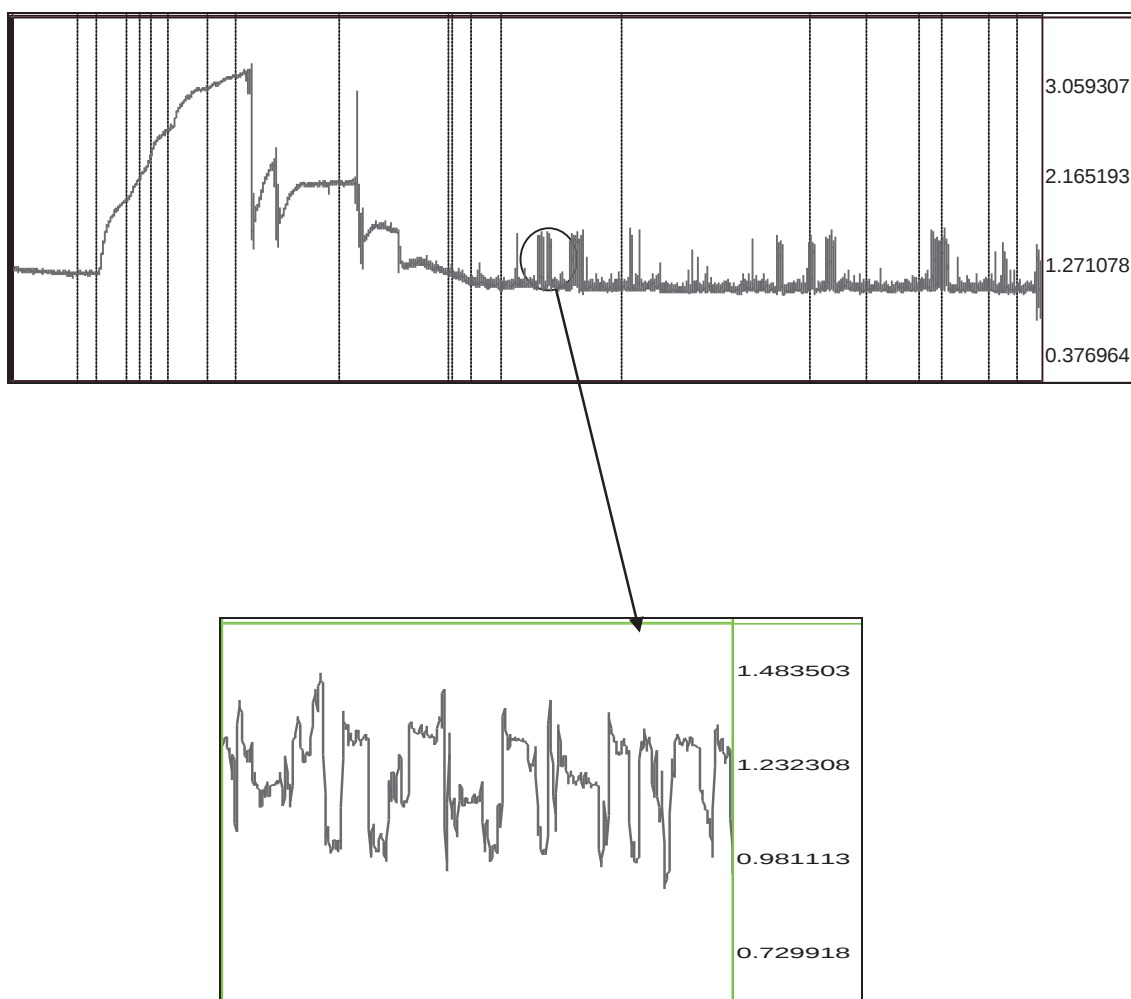


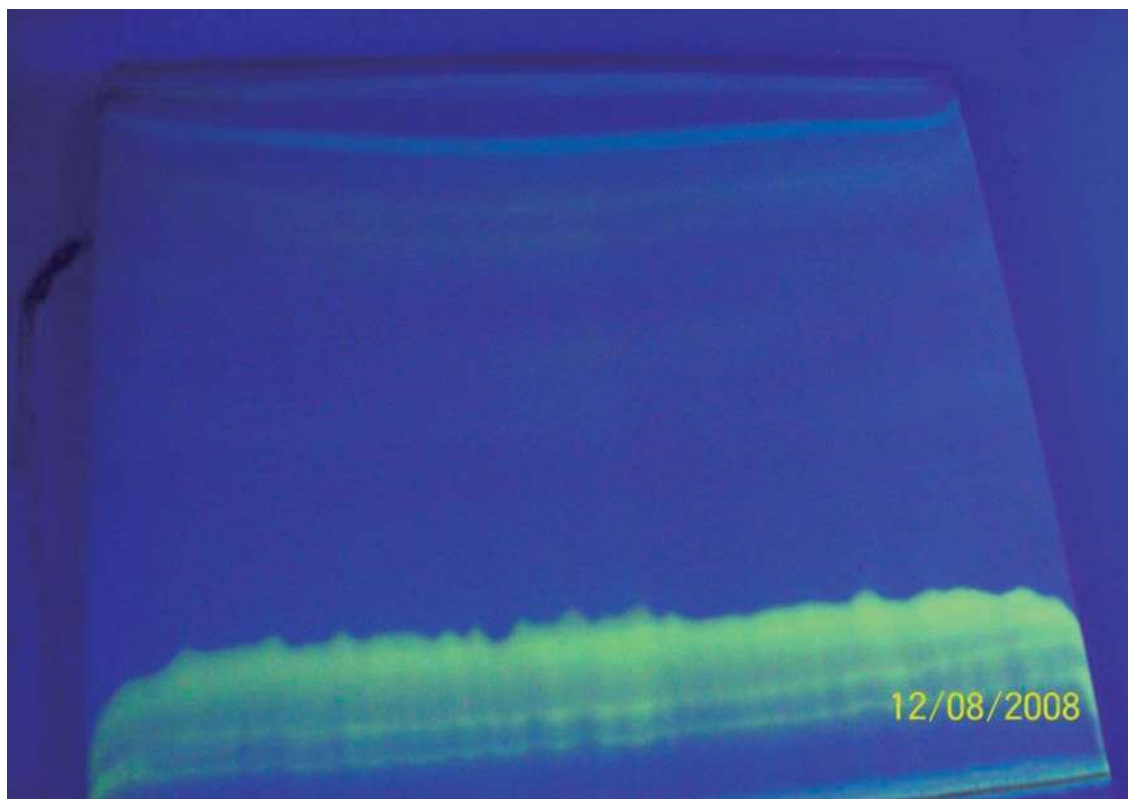
Figura 10. Gráfico tomado del análisis de datos realizado por el software durante el experimento, el cual muestra el efecto de la mancha extraída de la cromatografía preparativa en un anillo de aorta en estado basal (arriba) y una ampliación de la contracción observada (Abajo).

6.3 Análisis cromatográfico

En la placa de TLC se buscaron proporciones de Hexano- etanol-etilacetato que fueron desde 6:2:2 , 5:1:4 , 5:0:5, 4:1:5 y 4:2:4 que fue la mejor fase móvil usada para este tipo de muestra. Resultaron visibles 4 manchas después de que el frente de solvente recorrió la distancia deseada.

En la placa preparativa fue más eficaz usar la misma proporción de solventes para la eluyente. Luego de las 6 corridas se observaron y separaron y recuperaron en acetona 7 manchas con los siguientes datos del factor de retención (RF) .

Figura 11. Placa cromatográfica del extracto acuoso recuperado de hexano. Se observan las manchas en separación (4ta. Corrida)



Manchas de placa cromatográfica	Factor de retención (RF)
1	0.95
2	0.86
3	0.71
4	0.42
5	0.31
6	0.21
7	0.14

Tabla 7. La tabla muestra las manchas de cromatografía obtenidas en la placa preparativa, las cuales fueron recuperadas para la evaluación farmacológica. Se muestran en orden de descenso de polaridad.

6.4.1 Resultados obtenidos de la técnica de separación y purificación de algunos compuestos del fluido celómico (Columna).



En cromatografía en columna fue inadecuado el uso de esta fase móvil y ninguna mezcla fue adecuada para arrastrar el compuesto buscado ($R_F = 0.31$). El metanol fue el solvente con mejores resultados, ya que posee una alta polaridad en comparación con los demás solventes usados, con la desventaja de su difícil eliminación y/o evaporación.

Figura 12. La fotografía muestra algunos de los compuestos separados por columna, contenidos en varios viales para su posterior recuperación a través de la evaporación del solvente.



Para tener una reproducibilidad del método en la obtención de más muestras, se procedió a usar el orden de los solventes descrito en el apartado 5.5.3. De esta manera, aseguramos que cada fase usada arrastro los compuestos no deseados y que el compuesto “purificado” sería obtenido de la misma forma a partir del extracto acuoso recuperado de hexano.

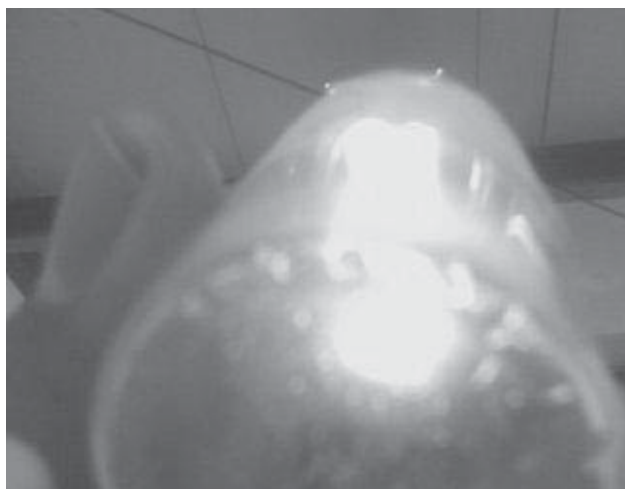
Figura 13. Fotografía que muestra la mancha con el compuesto buscado (autofluorescente) en solución de metanol.



La eliminación de agua con NaSO_4 no resultó un método confiable, ya que parte del compuesto buscado era retenido por este, probablemente por ir en solución.

Después de una separación de extracto con actividad farmacológica de ≈ 100 lombrices se obtuvieron 15 mg del compuesto “puro” con actividad farmacológica en forma de cristales. De esta manera se procedió a llevarlos a Cromatografía de gases y RMN, para su total caracterización.

Figura 14. Cristales obtenidos, observados en el fondo y orilla del vial.



6.4 Cromatografía de gases

SPME DE EXTRACTOS DE LOMBRIZ CON SOLVENTES GRADO HPLC				
COLUMNA: HP5 (RETIENE COMPUESTOS MEDIANAMENTE POLARES Y NO POLARES)				
Compuesto	Tr (min)		ÁREAS BAJO LA CURVA	
		M1-ETANOL	M2-HEXANO	M3-METANOL
Toluene	3.86		13241966	
Butanoic acid ethyl ester	4.89	588206		
Ethylbenzene	7.33			285693
o-Xylene	7.70		126480	1408237
p-Xylene	8.83			744959
2-Heptanone	9.08		240317	
Benzene 1,3,5 trimethyl	14.09		1039518	283464
Hexanoic acid	14.43		729494	
Hexanoic acid, ethyl ester	14.77	299801		
Benzene 1,2,4 trimethyl	15.56		224809	
1-Hexanol-2-ethyl	16.38			357401
Benzyl alcohol	16.47		3957995	
Cyclohexanecarboxylic acid,methyl ester	17.79			474471
Benzene 2-ethyl,1,4-dimethyl	18.50		404574	
Benzene 1-ethyl,3,5-dimethyl	18.58		694861	
Benzene 2-ethyl,1,3-dimethyl	18.90		1785002	
Undecane	19.86		401216	3131810
Benzene, 1-methyl -3-(1-methylethyl)-	19.94		1104486	

Phenylethylalcohol	20.54		8099727	2133619
Benzene,1,2,3,5-tetramethyl-	20.64		5939237	
Cyclohexanecarboxylic acid,ethyl ester	21.48	447260		
1H-Indene,2,3-dihydro,5-methyl	21.53		977548	
Methyl nicotinate	21.83	2948702		46135066
Benzene, (2-methyl-1-propenyl)	22.05		1571574	
Benzene,1,2,3,4-tetramethyl-	22.20		1919272	
Benzoic acid ethyl ester	23.35	1766353		
Naphthalene	23.64		4841400	
Benzeneacetic acid, methyl ester	23.77	1512462		3035435
Benzene pentamethyl	24.53		1064760	
Dodecane	24.82			523115
3-Pyridinecarboxylic acid, ethyl ester	25.51	67758650		
Thiazole, 5-methyl	26.92			1003632
Benzeneacetic acid, ethyl ester	26.96	13542006		
Benzenepropanoic acid, methyl ester	28.35			533913
2-Undecanone	29.24			363639
Tridecane	29.46			367067

2-Dodecanol	29.59		1273300	971809
Decanoic acid, methyl ester	30.63			242857
Benzenepropanoic acid, ethyl ester	31.62	2685572	55960661	
Butanoic acid butyl ester	32.69		89430493	
Tetradecane	33.83			566960
Undecanoic acid, methyl ester	34.92			1879153
2H-1-Benzopyran-2-one	35.29		11311856	477688
Undecanoic acid, 10-methyl, methyl ester	37.52			10762053
Cyclopropanenonanoic acid, methyl ester	37.97			4089865
2,6-Difluorobenzoic acid,2-bromo-4-	38.07			17898398

fluorophenyl ester				
Cyclopropanenonanoic acid, ethyl ester	38.42			1724770
Phenol 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	38.50		780563	
Dodecanoic acid, methyl ester	38.99	28642652		48135543
.beta.naphthoylhydrazine	39.84	19698705		
Dodecanoic acid, ethyl ester	40.31	25261948		
Tridecanoic acid, methyl ester	41.44	59075381		23758394
Tetradecanoic acid, 9-methyl, methyl ester	41.72			7981122
Tridecanoic acid, ethyl ester	42.84			1323333
Tetradecanoic acid, ethyl ester	44.07	23915515		
Pentadecanoic acid, ethyl ester	44.35	29499223		
2-Pentadecanol	45.70			640051
Morpholine,4-octadecyl	46.44	140602106		
1-Hexadecanamine,N,N-dimethyl	48.10	76165474		
9-Hexadecenoic acid	50.12	77051453		
Hexadecanoic acid	51.39	175313177		

Tabla 8. La tabla muestra los datos obtenidos tras el análisis por cromatografía de gases, donde se muestra la cantidad de compuestos encontrados y la densidad de los mismos en el fluido celómico. La columna que se usó es HP5.

Se identificaron 63 compuestos, dentro de los cuales destacan 7 compuestos que se encuentran en mayor cantidad, con respecto a los demás, como son; ácido hexadecanoico (Palmitico), 4-octadecil, morfolina; ácido tridecanoico, metil ester; ácido benzoico, etil ester; Etil nicotinato, todos observados en el extracto alcohólico; Acido propanoico metil ester; Acido butanoico, etil ester, observados en el extracto hexánico, Metil nicotinato; acido tridecanoico, metil ester, observados en el extracto metanólico.

Lo anterior indica que la abundancia de ácidos grasos es importante, ya que se encuentran en su estado normal, como el acido palmítico, esencial en muchos de los procesos metabólicos y del cual se pueden derivar muchos otros ácidos, encontrado en mayor cantidad en este análisis, o en su forma esterificada,

muchos de ellos volátiles como el caso del etil y metil nicotinato, ácido benzoico etil éster, todos con un anillo aromático en su estructura.

SPME DE EXTRACTOS DE LOMBRIZ CON SOLVENTES GRADO HPLC					
COLUMNA: FFAP (RETIENE COMPUESTOS POLARES Y MEDIANAMENTE POLARES)					
Compuesto	Tr (min)		ÁREAS BAJO LA CURVA		
		M1-ETANOL	M2-HEXANO	M3-METANOL	M4-CH ₂ Cl ₂
Decane,4-methyl	4.67			51189	
Decane,2-methyl	4.73			1199616	
Decane,3-methyl	4.96			1157912	
Undecane	6.09			23770642	
Ethylbenzene	7.17		150053	946316	
<i>m</i> -Xylene	7.49		196307	1522855	
<i>o</i> -Xylene	7.75		528791	4132079	
3-Penten-2-ol	9.31				3651
<i>p</i> -Xylene	9.54			3208378	
2-Heptanone	9.65		1423890		
Dodecane	10.44			2290695	
Benzene, chloro	10.90	324704			
Benzene,1 ethyl-2-methyl	11.22		253815	286452	
Benzene,1 ethyl-4-methyl	11.35		429871	572935	
Benzene,1,3,5-trimethyl	12.18		211819	376488	
Benzene,1 ethyl-3-methyl	12.96			601976	
Benzene,1,2,3-trimethyl	13.83	175513	470008	1400719	
Benzene, 1-methyl-2-propyl	14.87		370201	214530	
Benzene-1-methyl-4-propyl	14.96		212616		

Tridecane	14.99			588486	
Benzene-1,4-diethyl	15.15		235267		
Benzene 1-ethyl,3,5-dimethyl	15.85		441402		
Benzene,1,2,4-trimethyl	16.28		629505		
Benzene 2-ethyl,1,4-dimethyl	17.10		619430		
Benzene 2-ethyl,1,3-dimethyl	17.36		787170		
Benzene, 1-methyl -3-(1-methylethyl)-	17.72		2669170	318280	
Benzene,1-methyl-4-(1-methylpropyl)-	19.14		367885		
Tetradecane	19.43	231926		478927	
Benzene,1,2,4,5-tetramethyl-	20.18		1595632		
Benzene,1,2,3,5-tetramethyl-	20.62		4396481	132827	
Benzene,1,4,dichloro	21.11	400572		186654	
Benzene,(1,1-dimethylpropyl)-	21.18		221588		
Acetic acid	22.07	548274		433960	38638
1H-Indene,2,3-dihydro,5-methyl	22.14		1327418		
Benzene,1,2,3,4-tetramethyl-	22.82		1321452		
1H-Indene,2,3-dihydro,4-methyl	23.20		936863		
Benzene pentamethyl	23.29		309305		
Benzene, (2-methyl-1-butenyl)	23.49		225721		
Pentadecane	23.67	304894			
l-Tyrophanamide	23.79			1069809	
Dimethyl sulfoxide	26.84		185640		2028133
2-Acetyl-5-methyl-furan	28.37		147192		
Benzoic acid methyl ester	28.49			349747	
Acetophenone	29.55	240676	201686		
Benzoic acid ethyl ester	30.17	754430			
Undecanoic acid methyl ester	31.54			370524	
2-undecanol	32.49		178995	674992	
Naphthalene	32.64		3923069	334419	

Undecanoic acid methyl ester	33.09	578962			
Undecanoic acid, 10 methyl-methyl ester	33.57			1989295	
Benzeneacetic acid, methyl ester	33.82	435455		2638202	
Methyl nicotinate	34.27	4189025		35383898	
Benzeneacetic acid, ethyl ester	34.75	6200715			
Dodecanoic acid methyl ester	35.07	3435253	163040		
.alpha.D-glucopyranosiduronic acid, methyl 2-O-methyl, methyl ester	35.17		179061		
Undecanoic acid ethyl ester	35.30	1974521		12131337	
3-Pyridinecarboxylic acid, ethyl ester	35.66	87156649	1184109		
Dodecanoic acid ethyl ester	36.76	15105354	1454730		
Tridecanoic acid, methyl ester	37.23			1411552	
Butanoic acid, butyl ester	37.54		14343005		
2-Fluorobenzoic acid, undecyl ester	37.61			324645	
Propanoic acid,2,methyl-,2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	37.81		10039790		
Benzyl alcohol	38.04		12050421		
Benzenepropanoic acid, ethyl ester	38.10	545126			
Eicosanoic acid, ethyl ester	38.62	1500039	222313		
Dimethyl sulfone	39.03		782552		1199727
Phenylethylalcohol	39.15		5596101	985457	483261
Pyrazole,1-methyl-4-nitro	41.73			1008723	
Phenol	42.45		145258		
Benzene,2,4 difluoro-1-isocyanato	43.72	10017009			
2,6-Difluorobenzoic acid-2-bromo-4-fluorophenyl ester	43.83			9648981	
2-hexadecanol	46.12			141706	
Phenol 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	51.96		164384		
2H-1-Benzopyran-2-one	55.87		1253326		

Tabla 9. La tabla muestra los datos obtenidos tras el análisis por cromatografía de gases, donde se muestra la cantidad de compuestos encontrados y la densidad de los mismos en el fluido celómico. La columna que se uso es es FFAP.

Se identificaron 60 compuestos, en los que destacan; el metil nicotinato, ácido undecanoico etilester; Benzeno,2,4 difluoro-1-isocianato, en extracto metanolico; etil nicotinato, ácido dodecanoico etil ester, en extraxto etanólico y ácido butanoico butil ester, en extracto hexánico.

La tabla 8 y 9 muestran la cantidad de compuestos contenidos en diversos extractos que fueron usados para encontrar su actividad farmacológica. La cual nos permite dilucidar la cantidad de compuestos presentes junto con su densidad, es decir, la cantidad presente de cada uno. De esta manera pudimos dilucidar un poco que compuestos podíamos ir descartando, de acuerdo a la naturaleza del extracto en que aparecen, y también para darnos una orientación del compuesto buscado. Ya sea por su aparición en una diversa cantidad e extractos o por la naturaleza química que poseen.

De lo anterior se deduce que la identificación de compuestos presenta en su mayoría ácidos grasos esterificados, en su mayoría con estructuras aromáticas. También se encontraron ácidos grasos en su forma libre y que son usados por la lombriz como protección contra insectos. (Marilou y Realm 2007).

6.5 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

Est. Acuoso Crema Fofide
 Exp. Lita Maria
 01-X-88

Pulse Sequence: zgpg
 Solvent: DMSO
 Ambient Temperature
 Frequency: 400MH ¹H-CPY236

Relax. delay: 1.000 sec
 Pulse: 90.0 degrees
 Acq. time: 3.400 sec
 Width: 5328.0 Hz
 256 repetitions
 OBSERVED: H1, 400.1551181 MHz
 Data Processing
 Line: including 0.0 Hz
 16 400 MHz
 Total time: 1 hr, 24 min, 53 sec

File name:

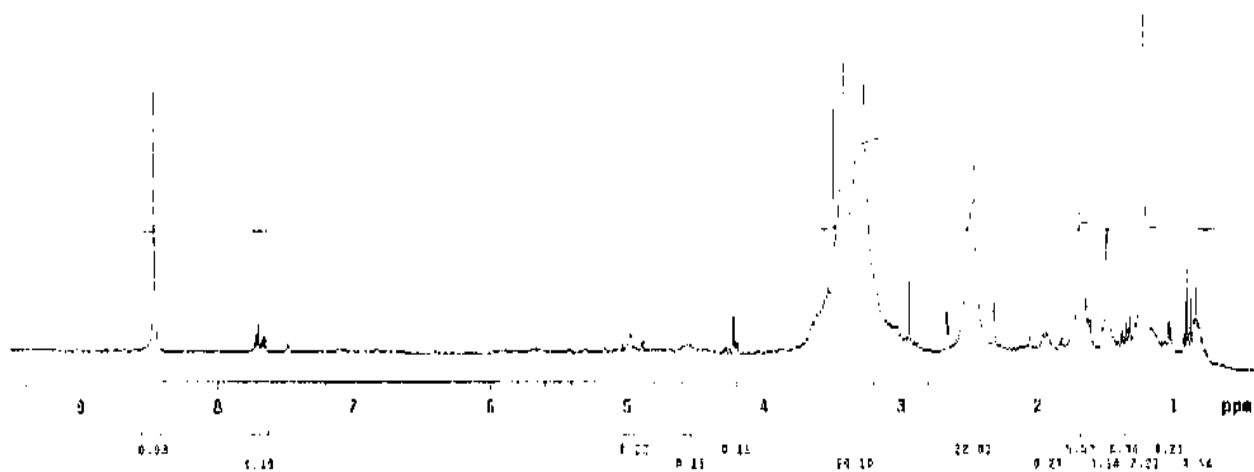


Figura 15. En la figura se observa los picos del H⁺ obtenidos a través de la resonancia de los cristales separados y “purificados” del compuesto con actividad farmacológica.

Cada pico representa el área correspondiente a los H⁺ de algunos grupos funcionales.

En la figura se encontraron después de varias pruebas para el mejoramiento de la técnica y la calidad de los resultados, los picos de la molécula buscada, los cuales se compararon con la base de datos de Sigma-Aldrich, con el fin de buscar una o alguna molécula análoga, en el cual se observa que los picos representativos del compuesto se encuentran principalmente en la región, entre 7 y 9 (campo bajo). Los picos de la región 4.2 y 3.5 pertenecen al Etil acetato y como es un solvente usado se descartó por este motivo, el pico más alto de la región entre 3 y 4 pertenece al agua y algunos de los picos de la región entre 1 y 2 pertenecen a otros solventes usados. Por lo que los picos representativos se encuentran en las regiones; 8.5, 7.7, (campo bajo) 3.5, 2.5, y 1.5 (campo alto) Estos picos se buscaron para encontrar una molécula análoga o la relación con alguna, sin encontrarla registrada en la base de datos de sigma. Lo que si se dilucidó es que es una molécula que no posee muchos protones, por lo que puede tener una estructura cíclica, ya que el área bajo la integral de los picos señalados, no correspondería a más protones.

La RMN de C¹³ no presentó resultados (ausencia de picos) por lo tanto se omitió en este apartado

A los cristales obtenidos se les practicó la prueba de punto de fusión, para usarla como un argumento complementario de la RMN, sin resultados positivos debido a que no funde a 300°C (límite máximo del fusiómetro).

7. DISCUSION DE RESULTADOS

En este estudio demostramos por primera vez, el efecto farmacológico del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, a través de la obtención de la fase acuosa del extracto hexánico. Se comprobó que el efecto es constrictor en anillos aórticos de rata con endotelio en estado basal, con una contracción promedio de 1.3 g per se y cuando eran contraídos con soluciones crecientes de fenilefrina, lo cual nos sirvió para dilucidar el efecto potenciador del agonista α -adrenérgico, observando un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la contracción. En contraposición con los datos científicos que mencionan un efecto vasodilatador (Ishi y Hasashi 1992) probablemente porque que este se realizó con harina de lombriz de otra especie y no con fluido celómico, ni algo específico o caracterizado del animal. El efecto constrictor de la fenilefrina en conjunto con el extracto, se mantuvo por más de 30 minutos. Por otro lado, en anillos de traquea con endotelio no se observó contracción en estado basal, pero si se dilucidó el efecto contráctil cuando se aplicaba en conjunto con el carbacol, donde este agonista muscarínico presentaba una potenciación estadísticamente significativa ($p > 0,05$) solo a dosis altas (1×10^{-5} M).

La contracción llevada a cabo en las aortas en estado basal puede ser debida a la presencia de receptores específicos, para el compuesto responsable de la actividad farmacológica, que solo se encuentran en la aorta, ya que en la traquea no se presenta efecto; por lo que se deduce la ausencia de receptores específicos en este tejido. Esto se sustenta basándose en que el mecanismo de contracción en la traquea se lleva acabo a través de receptores muscarínicos, b-adrenérgicos o derivados del endotelio (Hashiba y col 1999).

La participación del endotelio en la contracción (solo en la aorta) o potenciación observada con carbacol y fenilefrina, puede ser porque endotelio produce un número de sustancias vasoconstrictoras que regulan el tono vasomotor (Vane y cols., 1990), como la endotelina que es sintetizada y liberada por este, en respuesta a una serie de estímulos mecánicos y neurohumorales, lo que produce importantes efectos en la estructura y función del músculo liso subyacente (Galley y Webster, 2004).

Ya que la actividad contráctil del músculo liso vascular está determinada finalmente por la concentración intracelular de Ca^{2+} y por la sensibilidad de los elementos contráctiles al Ca^{2+} . Ante estímulos específicos, la concentración intracelular de Ca^{2+} se ve incrementada, y éste se une con la proteína calmodulina para formar un complejo molecular que activa la miosina quinasa de cadena liviana, desencadenando la contracción (Karaki y col, 1997). Por lo tanto es posible que el extracto, tenga su efecto potenciador en la fenilefrina, al incrementar y mantener la entrada de iones calcio en las células musculares, a través de la unión en el receptor, diferente al sitio de acción que modifique la conformación y mejore el efecto, o de lo contrario, por medio de un sinergismo, en donde lo que se observa, es la suma de ambas respuestas por separado.

Probablemente se ve potenciado y mantenido el efecto de la fenilefrina, debido a que el extracto puede estar actuando de una manera indirecta con su receptor. Por que al unirse al receptor, la fenilefrina, en su primera fase de contracción, produce un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , esto evidencia un cambio en el potencial transmembrana que induce la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, permitiendo la entrada masiva de Ca^{2+} extracelular, lo que produce una segunda fase de contracción, mantenida en el tiempo, contracción que se sostiene mientras está presente el estímulo Farmacológico (Karaki y cols, 1997), `por lo tanto el extracto puede favorecer esta apertura mantenida del canal Ca^{2+} uniéndose en el receptor; o en su defecto la contracción mantenida puede ser la evidencia de un sinergismo entre ambas.

Existe la posibilidad de que el efecto de potenciación ocasionado por el extracto sobre el carbacol, sea debido a que es necesario altas

concentraciones del mismo; ya que existe una alta cantidad de receptores en traquea, de 50 a 80% (Fryer, Jacoby 1998). Por lo tanto el extracto puede estar unido a la parte no activa del receptor y cuando el agonista se une a una mayor cantidad de estos receptores, el efecto se puede ver aumentado por la presencia de ambos.

Como la lombriz de tierra se puede considerar un biotransformador, por el hecho de que es un indicador de contaminación del suelo, también puede modificar la actividad biológica en él (Schofield 2008). De esta manera la dieta a la que fue sometida puede ser uno de los factores para la obtención en el fluido celómico de una mayor cantidad del compuesto con la actividad farmacológica.

En cuanto a la caracterización química fuimos los primeros en obtener un compuesto cristalizado del fluido celómico con actividad farmacológica comprobada, en proceso de identificación. Esta caracterización nos llevó a practicar una nueva metodología de separación, a través del uso de varios solventes en un orden progresivo de aumento de polaridad.

Los miligramos del compuesto cristalizado pueden ser el parte aguas para la cuantificación del efecto constrictor en aortas y en traqueas.

Suponemos que el uso del hexano para la obtención del extracto con la actividad farmacológica nos permitió separar a los compuestos de baja y mediana polaridad, junto con la mayor cantidad de ácidos grasos libres. Por lo tanto, el resultado de la fase acuosa después de hexano, fue el obtener al compuesto buscado de una forma “libre”, ya que en conjunto con todo el fluido celómico, pudiera estar formando una interacción “fuerte” con otros componentes que ocultara el efecto farmacológico encontrado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cromatografía de gases y RMN, existe la posibilidad de que el compuesto buscado, tenga una naturaleza ácida, por la abundancia de ácidos grasos en los solventes polares, ya que la fase estudiada es acuosa, por lo tanto polar. Con una estructura cíclica, por la ausencia de protones y por la región de absorción presentada; que se

encuentre presente en forma de su sal, por el alto punto de fusión presentado, descartando la posibilidad de que tenga naturaleza proteica.

8. CONCLUSIONES

Se comprobó el efecto farmacológico del extracto acuoso recuperado de hexano, del fluido celómico, proveniente de la lombriz de tierra *E. foetida* en músculo liso, de anillos aórticos con endotelio, presentando también un efecto potenciador significativo sobre fenilefrina en este tejido y sobre carbacol en anillos de tráquea con endotelio.

Logramos la separación de los componentes del extracto con actividad farmacológica y se cristalizó el que presentaba la actividad contráctil, comprobando que no tiene naturaleza proteica, quedando la molécula en proceso de caracterización. Así mismo se caracterizaron más de 60 compuestos de tres extractos con naturaleza distinta, útiles, como parámetro para dilucidar el tipo de compuestos presentes en el fluido celómico, y el especial interés de algunos.

9. PERSPECTIVAS

Consideramos importante el estudio de los receptores y mecanismo de acción así como la total identificación del compuesto buscado; ya que de esta manera se podrían diseñar metodologías de experimentación que tengan como fin, la mejora de la cuantificación y control del efecto.

Ya que la lombriz de tierra posee una riqueza de sustancias como: ácidos grasos esenciales, esteres, se podría hacer énfasis en el estudio de la respuesta de otros organismos a los estímulos ocasionados por la lombriz o en su defecto el uso de la sustancia con actividad contráctil en otro tipo de tejidos u órganos.

Los compuestos fluorescentes del fluido celómico, pueden ser importantes si se logran unir a otras moléculas o parte de ellas, para su marcaje, como de neuronas o DNA.

Consideramos importante el aprovechamiento y la profundización de los recursos ofrecidos por esta especie, ya que es fácil de obtener, criar y representa un bajo costo, además favorece los recursos naturales.

10. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- **Alves** Rômulo RN*1 and **Ierecê** ML Rosa2, **2005**, Why study the use of animal products in traditional medicines?, Journal Ethnobiology and Ethnomedicine, 1:5 doi:10.1186/1746-4269
- 2.- **Alves** Rômulo RN *1 and Ierecê ML **Rosa2, 2005**, Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? Journal Ethnobiology and Ethnomedicine, 58:748-753
- 3- **Arrieta** M. **2004**. Un Salto Cuántico, De la Medicina Tradicional a la Moderna. Ed. Indigo pp. 28-29
- 4- **Barbado**, José Luís **2004**, Cría de Lombrices- 1a Edición, Editorial Albatros pp. 23-27
- 5-**Bisset**, **NG.**, **1991**. One man's poison another man's medicine?. J. Ethnopharm 32:71-81
- 6.-**Bundy**, JG., Lenz, EM., Weeks,JM., Jindon, JC., Nicholason, JK., **2002**. Metabolism of 4-fluoroaniline and 4- fluorobiphenil in the Earthworms *Eisenia venata* characterized by high- resolution NMR spectroscopy with directly coupled HPLC-NMR and HPLC-MS. Xenobiotica 32:470-490
- 7- **Beschin** Alain, Martin **Bilej** y col; **1998**, Pharmacology vol , Identification and Cloning of a Glucan- and Lipopolysaccharide-binding Protein from *Eisenia foetida* Earthworm Involved in the Activation of Prophenoloxidase Cascade
- 8-**Costa-Neto** E.M., **2005**. Animal-Based medicines: Biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. Anais da Academia Brasileira de Ciências 77:33-47
- 9- **Fang**, T., **Yang**, C., Su. W. **2002**. Study of TLC profile of phentermine aspergillum and phentermine injection. Zhong Yao Cai, 25:813-815
- 10.-**Fryer** Allison D. and **Jacoby** David B. **1998**. Muscarinic Receptors and Control of Airway Smooth Muscle. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine vol 158: 155- 159

11- **García** Mary Diana , M. **Macías**, y colaboradores, **1997**. Composición química de dos especies de lombrices de tierra (*eisenia foetida* y *Eudrilus eugeniae*) obtenidas a partir de residuales porcinos

Instituto de Investigaciones Porcinas, Punta Brava La Habana, Cuba

12- **Galley H.F, Webster N.R.**, 2004. Physiology of the endothelium. Br J Anaesth. 93(1):105-13.

13 -**Hashiba**, **1999** The Relaxant Effect of Propofol on Guinea Pig Tracheal Muscle Is Independent of Airway Epithelial Function and b-Adrenoceptor Activity. The International Anesthesia Research Society 0003-2999/99, pp 191-196

14- **Higa T.** **1996**. Introduction. J. Toxicology Toxin Reviews 15: 7

15-**Ishi** Yoichi, Mihara **Hisashi.** **1992.**, United States Patents No. 5123148. USPTO. USA

16- **Kangmin** L. **2004**. Bioproducts from eartworms .
http://www.cancerdesicions.com/080104_page.html Agosto

17- **Karaki, H., Sato K., Ozaki H.**,1997. Calcium Movements, distribution and functions in smooth muscle. Pharmacol Rev. 49(2):157-230

18.-**Lev** Efraim*, **2006**, , , Healing with animals in the Levant from the 10th to the 18th century . Journal Ethnobiology and Ethnomedicine.

19- **Li. D. Wang, P., Zeng Y.** **2000**. Study on Lumbricus in promoting ligation hemorrhodectomy postopetative wound healing. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie., He Zhi. 20:899-902

20.-**Li, L. Li., X. Gan M., Yu Z.** **1997**. Comparaison on pharmacological functions of pheterima . Zhong Yao Cai. 20: 361-363

21.- **Liu. W. Wang, D., Chen, P., And Halpern, M.** **1997**. Cloning and expression of gene ecoding a protein obtained from Eartworm secretion that is chemo attractant for gate snakes. The Journal Biol. Chem. 272:27378-27381.

22.- **Lopez** Marilou J. Ang ^[2] and **Realm** Alis^[3] **2007**, Paper presented at the International Symposium-Workshop on Vermi Technologies for Developing Countries (ISWVT) at Los Baños, Laguna, Philippines ; Indigenous Uses of the Native Earthworm and its Fatty Acid Profile

23.- **Manual** Thin Layer Chromatography and Pharmacopoeia (Ph EUR, BP, USP, DAB) Chrombook **2008/2009** www.chromatography.merck.de

- 24.- **Mohan** Madan Mahawar*1 and DP **Jaroli**2, **2008**, Traditional zootherapeutic studies in India. Journal Ethnobiology and Ethnomedicine, 4:17
- 25.- **Mohan** Madan Mahawar*1 and DP **Jaroli**2, **2007**, Traditional knowledge on zootherapeutic uses by the Saharia tribe of Rajasthan, India. Journal Ethnobiology and Ethnomedicine, **3**:25 doi:10.1186/1746-4269-3-25.
- 26.- **Moss** R. **2004**. Of Enzyme , worms and cancer. [Http://www.iobbnet.org/drupal/node/view/41804/11/2004](http://www.iobbnet.org/drupal/node/view/41804/11/2004)
- 27.- **Nogales** R., Cifuentes C., Benitez E. **2005**. Vermicomposting of winery wastes : a laboratory study. J. Environ. Sci. Health B. 40:659-673
- 28.- **Ohtsuka**, H., Rudie, NG., Wampler, JE . **1976**. Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm *Diplocardia longa* . Biocemistry 15:1001-1004
- 29.- **Rodríguez** Carlos A. Ma. Magdalena **Vázquez** G. (et. al.) **1998**, Departamento de recursos naturales de la habana Cuba, Lombrices de tierra con valor comercial. Biología y técnicas de cultivo pp 3-11.
- 30.- **Rodríguez** M. G. Chacón García L. Ramírez-Chávez E., Molina Torres J; **2008**, Caracterización química espectroscópica del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia Foetida*. Trabajo no. 79. 4ta reunión académica mexicana de Química Orgánica. Patzcuaro Michoacán.
- 31.-**Rodríguez**. M. G. **2005**. Rastreado las huellas de la lombriz: ¿' Porque las víboras sacan la lengua y saborean a las lombrices? Investigación y Ciencia de la UAA 13: 37-41
- 32.-**Levine** Ruth R..**1982**. Farmacología Acciones y Reacciones Medicamentosas. Ed. Salvat pp 31
- 33.- **Schofield** Kimberly , 2008,Program Specialist, Service. Pp 197-199 , IPM Texas AgriLife Extension
- 34.- **Tasiemski**, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautiere , P. E. Salzet, M. **2004** Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. The J. Biol. Chem. 279:30973-30982.
- 35.- **Viswanathan** R.. **1997**, Physiological Basis in the Assessment of Ecotoxicity of Pesticides to Soil Organism. Pergamon.Vol 35, Nos ½, pp. 323-334
- 36.- **Vielma** Rosa Alba Rondón 1, Alfredo **Usubillaga**, 2 y Ana Luisa **Medina** g.; **2003** Estudio preliminar de los niveles de ácidos grasos de la harina de lombriz (*Eisenia foetida*) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, Revista de la Facultad de Farmacia Vol. 45 (2),

- 37.- **Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M.**, 1990. Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med. 323: 27-36.
- 38.- **Wang**, G., Hu, D., Chen, J., Zou, Y., Chen p. **1998**. Analysis of chemical components from *Pheterima Zhon Yao Cai*. 21:133-135.
- 39.- **Wang C, Sun Z, Zheng D.** **2006**. Research advance in antibacterial immunity ecology of earthworm. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 17(3):525-9.
- 40.- **Yang**, D. Wang.F., Peng, J., Xiao, L., Su W. **2000**. Study on lipids and other volatile constituents in *Pheterima aspergillum* Zong Yao Cai 23:212-
- 41.-**Zhang**, FX., Guo, B., and Wang, HY. **1992**. The spermatocidal effects of eartworms extract and is effective constituents. Soil. Biol. Biuochem. 24:1247-1251