



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

“Pruebas de identidad, composición, toxicológicas y farmacológicas de utilidad para establecer el control de calidad, la eficacia e inocuidad de la planta medicinal *Arracacia toluensis* (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Watson) Mathias & Constance (*Umbelliferae*)”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Vocal:	Dr. Robert Arthur Bye Boettler
Secretario:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Primer suplente:	Dra. María Yolanda Ríos Gómez
Segundo suplente:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

En el laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

QFB Mario Alberto Figueroa Saldívar
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutor

M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz
Asesor técnico

AGRADECIMIENTOS

- El presente proyecto de investigación se realizó gracias al apoyo económico de los proyectos CONACyT (sector salud C01-018) y DGAPA (PAPIIT IN-212005), ambos a cargo de la Dra. Rachel Mata.
- Al CONACyT, por el apoyo otorgado a través de mi beca de Maestría.
- A los miembros del jurado asignado para la revisión de este proyecto de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.
- Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.
- Al Dr. Andrés Navarrete y al M. en C. Jesús Arrieta, por su valiosa asesoría durante la realización de los ensayos de eficacia.
- A la Dra. Myriam Arriaga, por su apoyo durante la evaluación de las muestras en los ensayos de mutagenicidad.
- Al Q. F. B. Alejandro Camacho, por proporcionar las cepas bacterianas utilizadas en los ensayos microbiológicos.
- Al personal técnico de la USAI, Facultad de Química, UNAM: a la Q. F. B. Marisela Gutiérrez y a la M. en C. Rosa Isela del Villar, por el registro de los espectros en el infrarrojo y RMN, respectivamente. De manera especial, quiero agradecer a la Q. Georgina Duarte Lisci, por su valioso apoyo durante la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición del aceite esencial.
- A la M. en C. Isabel Rivero, por su valioso apoyo técnico durante la realización de este trabajo de investigación.
- Finalmente, deseo expresar mi agradecimiento a mi asesora, la Dra. Rachel Mata Essayag, gracias de corazón por sus enseñanzas, su confianza y su paciencia. No tengo palabras que me permitan expresar toda mi gratitud hacia un ser humano excepcional. Gracias

DEDICATORIAS

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE	iv
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE GRÁFICAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. ANTECEDENTES	1
1.1 Aspectos botánicos, etnobotánicos y químicos del género <i>Arracacia</i>	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	7
III. PARTE EXPERIMENTAL	11
3.1 Ensayos de inocuidad	11
3.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda	11
3.1.2 Evaluación de la actividad mutagénica	11
3.1.2.1 Preparación del homogenado de la fracción S9	11
3.1.2.2 Preparación de las placas de agar	12
3.1.2.3 Preparación de los tubos de inóculo	13
3.1.2.4 Bioensayo de mutagenicidad	13
3.2 Ensayos de eficacia	14
3.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	14
3.2.2 Evaluación del potencial antiespasmódico del extracto y aceite esencial de <i>A. toluensis</i> sobre la inhibición de la contracción espontánea e inducida en íleon aislado de cobayo	16
3.2.2.1 Aislamiento del íleon	16
3.2.2.2 Montaje de la preparación y sistema de registro	16
3.2.2.3 Evaluación del efecto antiespasmódico	17
3.3 Estudio fitoquímico de <i>A. toluensis</i>	18
3.3.1 Material vegetal	18
3.3.2 Procedimientos generales	18
3.3.2.1 Análisis cromatográficos	18
3.3.2.2 Caracterización de los productos naturales	19
3.3.2.3 Preparación del aceite esencial de <i>A. toluensis</i>	20
3.3.2.4 Preparación del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i>	21
3.3.3 Fraccionamiento preliminar	21
3.3.4 Aislamiento, purificación e identificación de la isoimperatorina (1), el ostol (2) y la suberosina (3) a partir de la fracción primaria F ₁	21
3.3.5 Aislamiento de la isoimperatorina (1), el 8-metoxipsoraleno (4), la herniarina (5) y la escoparona (6) a partir de la fracción primaria F ₂	22
3.3.6 Aislamiento y purificación de la umbeliferona (7) y la dihidrooxipeucedanina (8) a partir de la fracción primaria F ₄	22
3.3.7 Aislamiento y purificación del 5-MOP (9), la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10) y la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11) a partir de la fracción primaria F ₅	23

	Pág.
3.4 Ensayos de identidad y composición	23
3.4.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos del extracto y aceite esencial de <i>A. toluensis</i>	23
3.4.2 Análisis por CG-EM del aceite esencial de <i>A. toluensis</i>	24
3.4.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación de la isoimperatorina (1), el ostol (2), el 8-MOP (4) y el 5-MOP (9) por CLAE a partir del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i>	24
3.4.4 Validación del método analítico	24
3.5 Ensayos adicionales	26
3.5.1 Efecto de los productos naturales sobre la enzima PDE1 dependiente de Calmodulina (CaM)	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Ensayos de inocuidad	28
4.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i>	28
4.1.2 Evaluación del potencial mutagénico del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i>	29
4.2 Ensayos de eficacia	33
4.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	34
4.2.2 Evaluación del potencial antiespasmódico del extracto y aceite esencial de <i>A. toluensis</i> sobre la inhibición de la contracción espontánea e inducida en íleon aislado de cobayo	35
4.3 Investigación fitoquímica de la especie <i>Arracacia toluensis</i> (H. B. K.) Hemsley var. <i>multifida</i> (S. Wats.) Mathias & Constance (<i>Umbelliferae</i>)	42
4.3.1 Elucidación estructural de las cumarinas aisladas de <i>A. toluensis</i>	44
4.3.1.1 Elucidación estructural de la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10) y la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)	45
4.3.1.2 Elucidación estructural de la furanocumarina 5-MOP (9)	47
4.3.2 Composición del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de <i>A. toluensis</i>	49
4.4 Criterios de calidad	51
4.4.1 Ensayos de identidad y composición	51
4.4.1.1 Ensayos de composición	53
4.4.2 Validación del método	54
4.4.2.1 Selectividad	54
4.4.2.2 Linealidad y exactitud	56
4.4.2.3 Precisión	59
4.5 Resultados adicionales	60
4.5.1 Efecto de los productos naturales sobre la enzima PDE1 dependiente de calmodulina (CaM)	60
V. CONCLUSIONES	67
VI. PERSPECTIVAS	69
VII. BIBLIOGRAFÍA	70
APÉNDICE I	78
APÉNDICE II	80

LISTA DE CUADROS

CUADRO		Pág.
1	Actividad antimicobacteriana de los productos naturales aislados a partir de la especie <i>A. toluensis</i>	5
2	Características de las cepas de <i>S. typhimurium</i> utilizadas en el ensayo de mutagenicidad	12
3	Concentraciones críticas inhibitorias (CCI) de los antibióticos empleados como controles positivos	15
4	Fraccionamiento preliminar por CCA del extracto total de <i>A. toluensis</i>	21
5	Evaluación de la toxicidad aguda de la especie <i>Arracacia toluensis</i>	29
6	Concentraciones críticas inhibitorias (CCI) del extracto y aceite esencial de <i>A. toluensis</i>	35
7	Concentraciones inhibitorias medias (CI ₅₀) y efecto máximo (E _{máx}) a la concentración de 10 ³ µg/mL obtenidos para el extracto orgánico, aceite esencial y papaverina sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	36
8	Concentraciones inhibitorias medias (CI ₅₀) y efecto máximo (E _{máx}) obtenidos para el extracto orgánico, aceite esencial y papaverina sobre las contracciones inducidas por los diferentes espasmógenos	40
9	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹ H de las cumarinas escoparona (6), 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10) y 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)	46
10	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹³ C de las cumarinas escoparona (6), 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10) y 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)	46
11	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹ H de las cumarinas 5-MOP (9) y 8-MOP (4)	48
12	Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹³ C de las cumarinas 5-MOP (9) y 8-MOP (4)	48
13	Compuestos identificados en el aceite esencial de <i>A. toluensis</i> por cromatografía de gases	50
14	Compuestos identificados en los extractos orgánicos de <i>A. toluensis</i> (lote 1 y 2) por CLAE	53
15	Análisis de varianza de las curvas de calibración de las cumarinas 1, 2, 4 y 9	56
16	Recobro de las muestras estándar durante la determinación de la linealidad y exactitud del método analítico	58
17	Valores de precisión del sistema	60
18	Cuantificación de las cumarinas 1, 2, 4 y 9 por CLAE en los extractos orgánicos (lote 1 y 2) de <i>A. toluensis</i>	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1	Características morfológicas del género <i>Arracacia</i>	2
2	<i>Arracacia toluensis</i> (H. B. K.) Hemsl. var. <i>multifida</i>	3
3	Metabolitos aislados a partir del género <i>Arracacia</i>	4
4	Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Arracacia toluensis</i> var. <i>multifida</i>	6
5	Ensayo antimicrobiano de difusión en agar	15
6	Sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado	17
7	Equipo para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación directa	20
8	Registro representativo del efecto de la a) papaverina, b) aceite esencial y c) extracto orgánico sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	36
9	Registro típico representativo del efecto del a) blanco, b) extracto orgánico y c) aceite esencial sobre las contracciones inducidas por los espasmógenos de prueba sobre el íleon aislado de cobayo	37
10	Transducción de señales en el músculo liso visceral	39
11	Cromatograma de la fracción primaria F₁	43
12	Cromatograma de la fracción secundaria F_{2-III}	43
13	Cromatograma de la fracción primaria F_{5-II}	44
14	Espectro NOESY de la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)	47
15	Vista parcial del espectro NOESY del 5-MOP (9)	49
16	Cromatograma del aceite esencial de <i>A. toluensis</i> obtenido por cromatografía de gases	51
17	Cromatograma de los extractos orgánicos de <i>A. toluensis</i> (lote 1 y 2) obtenido por CLAE	52
18	Espectros UV obtenidos a partir del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i>	54
19	Espectros UV del extracto orgánico enriquecido de <i>A. toluensis</i>	55
20	Mecanismo de relajación del músculo liso visceral	62
21	Relajación NANC del músculo liso visceral	64
22	Hidrólisis enzimática del AMPc	65

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICAS		Pág.
1	Variación del peso corporal de los ratones durante la Fase I	30
2	Variación del peso corporal de los ratones durante la Fase II	30
3	Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i> por el método de incorporación directa con y sin la fracción S9 (TA 100)	32
4	Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i> por el método de incorporación directa con y sin fracción S9 (TA 102)	32
5	Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de <i>A. toluensis</i> por el método de incorporación directa con y sin fracción S9 (TA 98)	33
6	Curvas de concentración-respuesta que muestran el efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de la papaverina, aceite esencial y extracto orgánico sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo	38
7	Curvas concentración-respuesta que muestran el efecto relajante del extracto orgánico, aceite esencial y papaverina sobre las contracciones inducidas por los espasmógenos a) acetilcolina (1×10^{-4} M), b) histamina (1×10^{-3} M), c) serotonina (1×10^{-4} M) y d) BaCl ₂ (1×10^{-2} M)	41
8	Curva de linealidad y exactitud por recobro	58
9	Efecto de los compuestos 2 y 7 sobre la actividad enzimática del complejo CaM-PDE1	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
AcOEt	Acetato de etilo
AMPc	3',5'-Monofosfato de adenosina cíclico
b	Ordenada al origen
BaCl ₂	Cloruro de bario
Ca ²⁺	Calcio catión
cm	Centímetro
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CaM	Calmodulina
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CCI	Concentración crítica inhibitoria
° C	Grado Celsius
DG	Diacilglicerol
DL ₅₀	Dosis letal media
δ _H	Desplazamiento químico de hidrógeno
δ _C	Desplazamiento químico de carbono-13
d	Doblete
eV	ElectronVolts
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
E _{máx}	Efecto máximo
EEM	Error estándar de la media
Fe ²⁺	Fierro catión
g	Gramo
GMPc	3',5'-Monofosfato de guanosina cíclico
GCs	Guanilato ciclasa soluble
His	Histidina
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de inositol
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramo
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
λ _{máx}	Longitud de onda máxima
MeOH	Metanol
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MLC	Miosina de cadena ligera
Mg ²⁺	Magnesio catión
MHz	Mega Hertz
m	Metro
mg	Microgramo

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

<i>m</i>	Pendiente de la recta
M	Molaridad
mm	Milimetro
min	Minuto
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μm	Micra
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NO	Óxido nítrico
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
OCH ₃	Metoxilo
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PDE1	Fosfodiesterasa dependiente de calmodulina
PDP	Fosfatidil-4,5-difosfato
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN 2D	Espectroscopia bidimensional por efecto nuclear Overhauser
NOESY	(¹ H- ¹ H)
<i>r</i>	Coefficiente de correlación lineal
<i>R</i> ²	Coefficiente de determinación
<i>t</i> _R	Tiempo de retención
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Como parte de un proyecto multidisciplinario, enfocado a la integración de monografías tipo OMS que permitan la regulación de los recursos herbolarios en México, el presente trabajo de investigación describe el estudio químico y farmacológico de la especie medicinal *Arracacia toluensis* (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Watson) Mathias & Constance (*Umbelliferae*), planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana como agente carminativo, estimulante digestivo y para tratar la blenorragia.

El estudio químico del extracto orgánico obtenido a partir de las partes aéreas, permitió el aislamiento de once metabolitos secundarios pertenecientes a la categoría de las cumarinas. Las estructuras moleculares de estos compuestos corresponden a la isoimperatorina (**1**), el ostol (**2**), la suberosina (**3**), el 8-MOP (**4**), la herniarina (**5**), la escoparona (**6**), la umbeliferona (**7**), la dihidrooxipeucedanina (**8**), el 5-MOP (**9**), la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**) y la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**). En todos los casos, las estructuras se establecieron con base en evidencias de tipo espectroscópico y espectrométrico.

Por otra parte, el análisis del aceite esencial de la planta, obtenido por hidrodestilación, mediante la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, permitió establecer que la composición está dada por los compuestos suberosina (**3**), ostol (**2**), 8-MOP (**4**), 5-MOP (**9**), alcohol bencílico (**12**), terpinen-4-ol (**13**) y α -cadineno (**14**), principalmente. Los componentes **2** y **3** fueron los más abundantes.

La evaluación toxicológica de la especie, conducente a establecer su inocuidad, se realizó mediante la evaluación de la toxicidad aguda utilizando el método de Lorke y la determinación del potencial mutagénico siguiendo la metodología descrita por Ames. Posteriormente, las pruebas de eficacia realizadas permitieron determinar el potencial antiespasmódico y antibacteriano, tanto del extracto íntegro como del aceite esencial. El estudio sobre el mecanismo de acción de las cumarinas **2** y **7** permitió establecer que el complejo CaM-PDE1 puede constituir un blanco de acción de la relajación de la musculatura lisa provocada por estas cumarinas.

Finalmente, se desarrollaron los métodos para cuantificar e identificar los principios activos mayoritarios, responsables en gran medida, de las propiedades farmacológicas de la especie vegetal.

ABSTRACT

As a part of our ongoing research on Mexican medicinal plants, the aim of the present investigation is to generate the scientific information concerning safety, efficacy, and quality control of the species *Arracacia toluensis* (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Watson) Mathias & Constance (*Umbelliferae*). The aerial parts of this plant are used in Mexican traditional medicine as carminative agent and for the treatment of gastrointestinal disorders, among others.

Fractionation of an organic extract of the species led to the isolation of eleven known coumarins characterized as isoimperatorin (**1**), osthol (**2**), suberosin (**3**), 8-MOP (**4**), herniarin (**5**), scoparone (**6**), umbelliferone (**7**), dihydrooxipeucedanin (**8**), 5-MOP (**9**), 7-methoxy-6-hydroxy coumarin (**10**) and 6-methoxy-7-hydroxy coumarin (**11**). The compounds were identified by spectral means. CG-EM analysis of the essential oil prepared by hydrodistillation indicated that the oil was composed mainly by suberosin (**3**), osthol (**2**), 8-MOP (**4**), 5-MOP (**9**), benzylic alcohol (**12**), terpinen-4-ol (**13**) y α -cadinene (**14**). The results of the chemical study allowed the establishment of identity and composition tests by means of HPLC analyses.

Next, the extract and the essential oil were preliminary evaluated in order to determine their safety and efficacy. The toxicity studies of the extract were realized by the Lorke and Ames tests. To determine the efficacy its possible spasmolytic and antimicrobial effects were assessed. The results obtained revealed that the extract and the essential oil showed a concentration dependent inhibition of the induced or spontaneous contractions of the guinea-pig ileum.

The action of the coumarins **2** and **7** on bovine brain calmodulin was evaluated. The results obtained showed that these coumarins inhibited the ability of calmodulin to activate the CaM sensitive PDE1. Therefore, this protein might participate in the relaxatory effect provoked by **2** y **7**.

The results obtained in this investigation will be used to integrate a pharmacopeia monograph following OMS protocols.

I. ANTECEDENTES

1.1 ASPECTOS BOTÁNICOS, ETNOBOTÁNICOS Y QUÍMICOS DEL GÉNERO *ARRACACIA*

La familia *Umbelliferae*, constituida por más de 3.000 especies y aproximadamente 300 géneros, se encuentra distribuida de manera cosmopólita, principalmente en zonas templadas (Constance, 1971; Menglan *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista químico, las umbelíferas son ricas en metabolitos secundarios, principalmente de las categorías de las cumarinas, poliacetilenos, flavonoides, fenilpropanoides y monoterpenoides; los últimos dos grupos de constituyentes son particularmente abundantes en las esencias de estas plantas (Estevez-Braun y González, 2002; Menglan *et al.*, 2005; Wannissorn *et al.*, 2005).

La familia tiene una gran importancia económica al constituir la fuente de una gran variedad de vegetales de alto valor nutritivo (apio, hinojo, zanahoria), condimentos de amplio uso en la culinaria global (comino, cilantro, eneldo, perejil, etc.) y plantas ornamentales (*Eryngium giganteum*, *Ferula* spp., *Heracleum* spp., etc.). Asimismo, muchas especies son altamente apreciadas en la medicina tradicional por sus propiedades curativas, principalmente para el tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversa etiología, infecciones de la piel ocasionadas por bacterias y hongos, enfermedades respiratorias y padecimientos cardiovasculares (Yiu-Cheong *et al.*, 2003; Hisamoto *et al.*, 2004; Sarker y Nahar, 2004). Entre los géneros más valorados en la medicina vernácula se encuentran *Ligusticum*, *Apium*, *Angelica*, *Arracacia* y *Peucedanum*, entre otros (Menglan *et al.*, 2005; Sarker y Nahar, 2004).

El género *Arracacia* comprende alrededor de 38 especies que se distribuyen desde México hasta Sur América incluyendo los países Bolivarianos (Bolivia, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia). Las especies pertenecientes a este género generalmente son bienales o perennes. Sus tallos son angostos, erectos y se desarrollan de una raíz o un tubérculo. Las hojas son alternas, pecioladas y trenado-pinnadas, provistas de una vaina ensanchada que abraza al tallo (**Figura 1a**). Las inflorescencias presentan una umbela característica. Las flores son uniformes, con el cáliz muy reducido y una corola con cinco pétalos de punta encorvada hacia adentro. El fruto presenta varias clases de espinas, ganchos, pelos o tubérculos (**Figura 1b**; Webb, 1981; Constance y Affolter, 1995; Knudsen *et al.*, 2001; Menglan *et al.*, 2005).

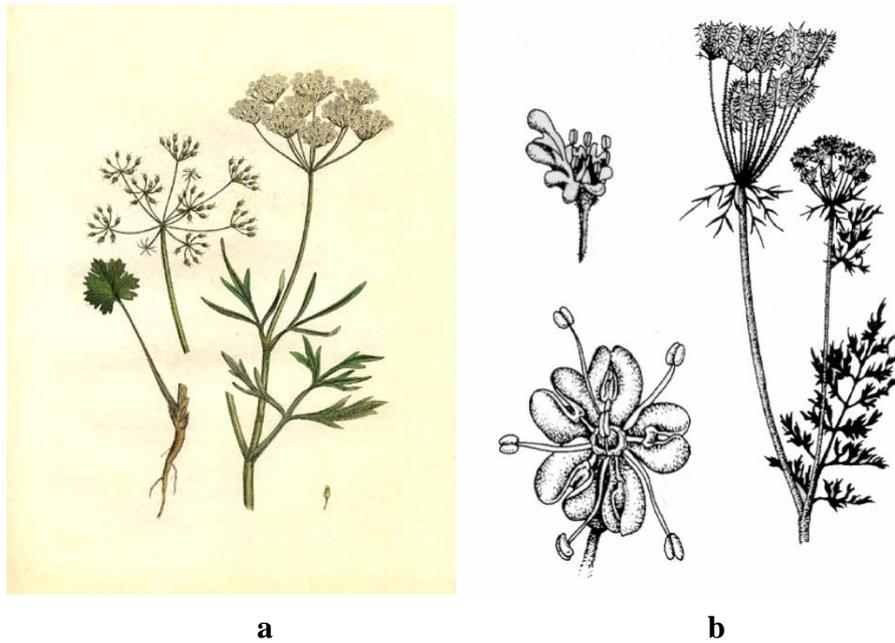


Figura 1. Características morfológicas generales del género *Arracacia*. **(a)** *Arracacia toluensis*, **(b)** Inflorescencias y flores de *A. toluensis* (Ejemplar de herbario, Instituto de Biología, UNAM).

Arracacia toluensis (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Wats.) Mathias & Constance [sinónimos: *Arracacia dugesii* Coult. & Rose (Coulter y Rose, 1900), *Arracacia multifida*, y *Velaea toluensis* (Martínez, 1989)], conocida por su nombre Náhuatl como “acocotli” y popularmente con los nombres de “cominos rústicos”, “hierba del oso” y “neldo” (**Figura 2**), ha sido usada, al igual que *Arracacia atropurpurea* (Lehm.) Benth. & Hook y *Prionosciadium mexicanum* (Vatke) S. Watson, como agente carminativo y estimulante digestivo (Martínez, 1989; Sociedad Farmacéutica de México, 1904; Bye, 2005, Constante, 1971), para tratar la blenorragia y para aliviar el dolor que proviene de causa fría (Argueta, 1994).

Esta hierba perenne es endémica de México y se desarrolla de manera natural en altitudes de entre 2250 y 2950 metros sobre el nivel del mar. Se encuentra localizada principalmente en las montañas de la Sierra Madre, aunque también la podemos encontrar desde Durango hasta Hidalgo y Oaxaca.

De acuerdo a la revisión bibliográfica efectuada en el curso de la presente investigación, sólo las especies *Arracacia vaginata* y *A. nelsonii* han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico. Los metabolitos aislados en estos estudios (**Figura 3**) incluyen: piranocumarinas (Delgado y Garduño, 1987), monoterpenoides y

fenilpropanoides (Calderon y Ríos, 1975). Dentro de las piranocumarinas obtenidas de la especie *A. nelsonii* destacan, por sus propiedades biológicas, las kelactonas (-)-isosamidina y (+)-suksdorfina, que poseen actividades antiretrovirales e inhibitorias de la agregación plaquetaria (Huang *et al.*, 1994; Thastrup *et al.*, 1985).



Figura 2. *Arracacia toluensis* (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Watson) Mathias & Constance (*Umbelliferae*).

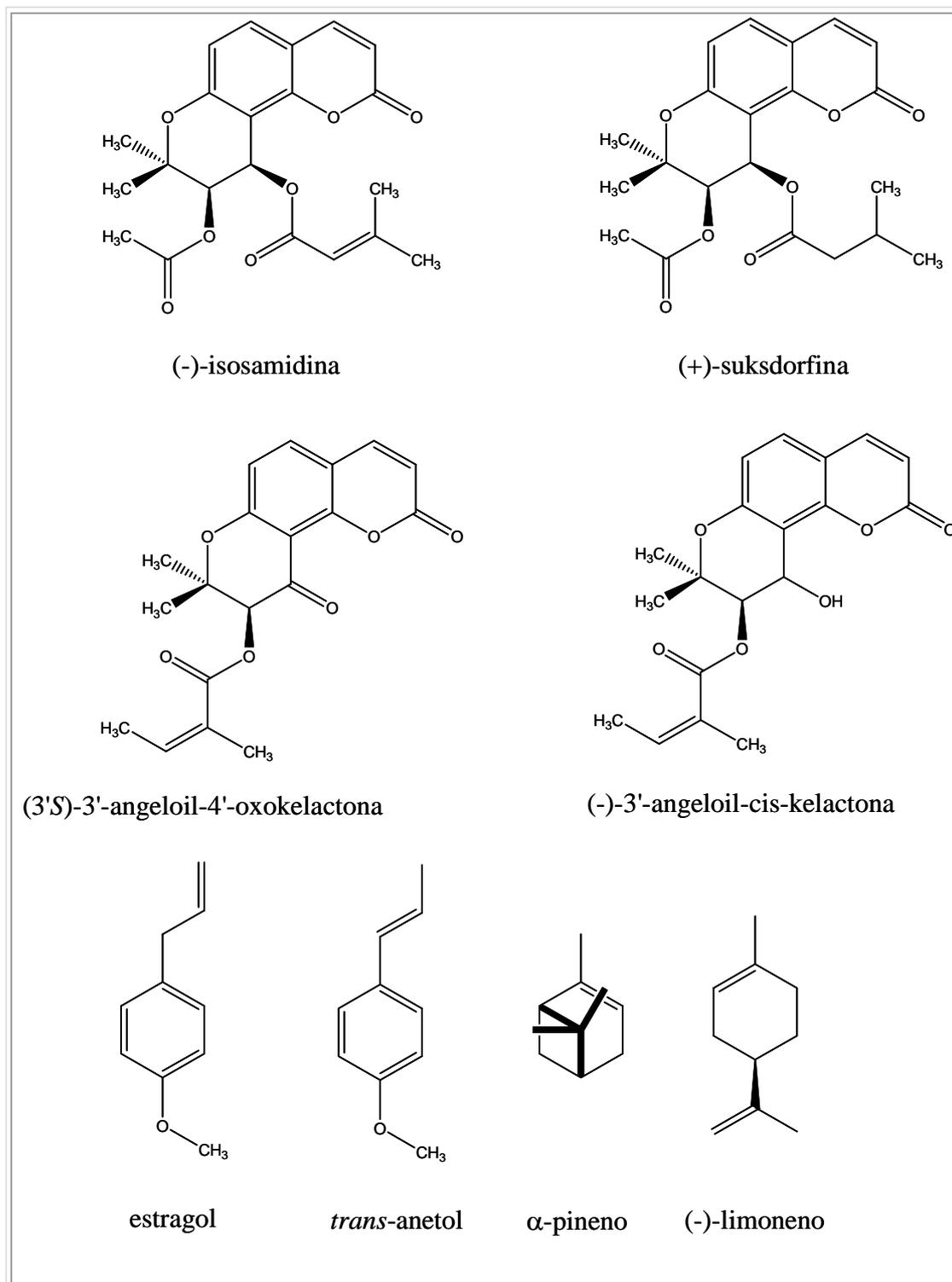


Figura 3. Metabolitos aislados a partir del género *Arracacia*.

Posteriormente, en el estudio que precede al presente trabajo, Figueroa (2004) se describió el aislamiento y caracterización de las cumarinas isoimperatorina (1), ostol (2), suberosina (3), 8-metoxipsoraleno (8-MOP; 4), herniarina (5), escoparona (6),

umbeliferona (7) y dihidrooxipeucedanina (8; **Figura 4**), a partir de un extracto antimicrobacteriano de la especie *Arracacia toluensis* (100 % de inhibición sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇ RV). La investigación se realizó en el marco de un proyecto de carácter internacional conducente a la obtención de principios activos de plantas de zonas áridas. Este proyecto (“Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America”) estaba patrocinado por varias agencias gubernamentales de los Estados Unidos de América y finalizó en Julio del año 2003. Las cumarinas **1-3** fueron los principios activos responsables de la actividad antimicrobacteriana del extracto íntegro de la planta contra *M. tuberculosis*. Los compuestos se evaluaron mediante un ensayo de tipo fluorimétrico, específicamente, el Microplate Alamar Blue Assay (MABA). La actividad comprobada se muestra en el **Cuadro 1** y, como se puede apreciar, los compuestos fueron menos potentes que el control positivo (rifampina), por lo tanto, es factible que el efecto antimicrobacteriano del extracto se deba a una acción sinérgica de las cumarinas o que el efecto de las cumarinas esté favorecido por la presencia de otros constituyentes presentes en el extracto.

Cuadro 1. Actividad antimicrobacteriana de los productos naturales aislados a partir de la especie *A. toluensis*.

Compuesto	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/mL)
isoimperatorina (1)	64
ostol (2)	32
suberosina (3)	16
rifampina ^a	0.1

^a Control positivo

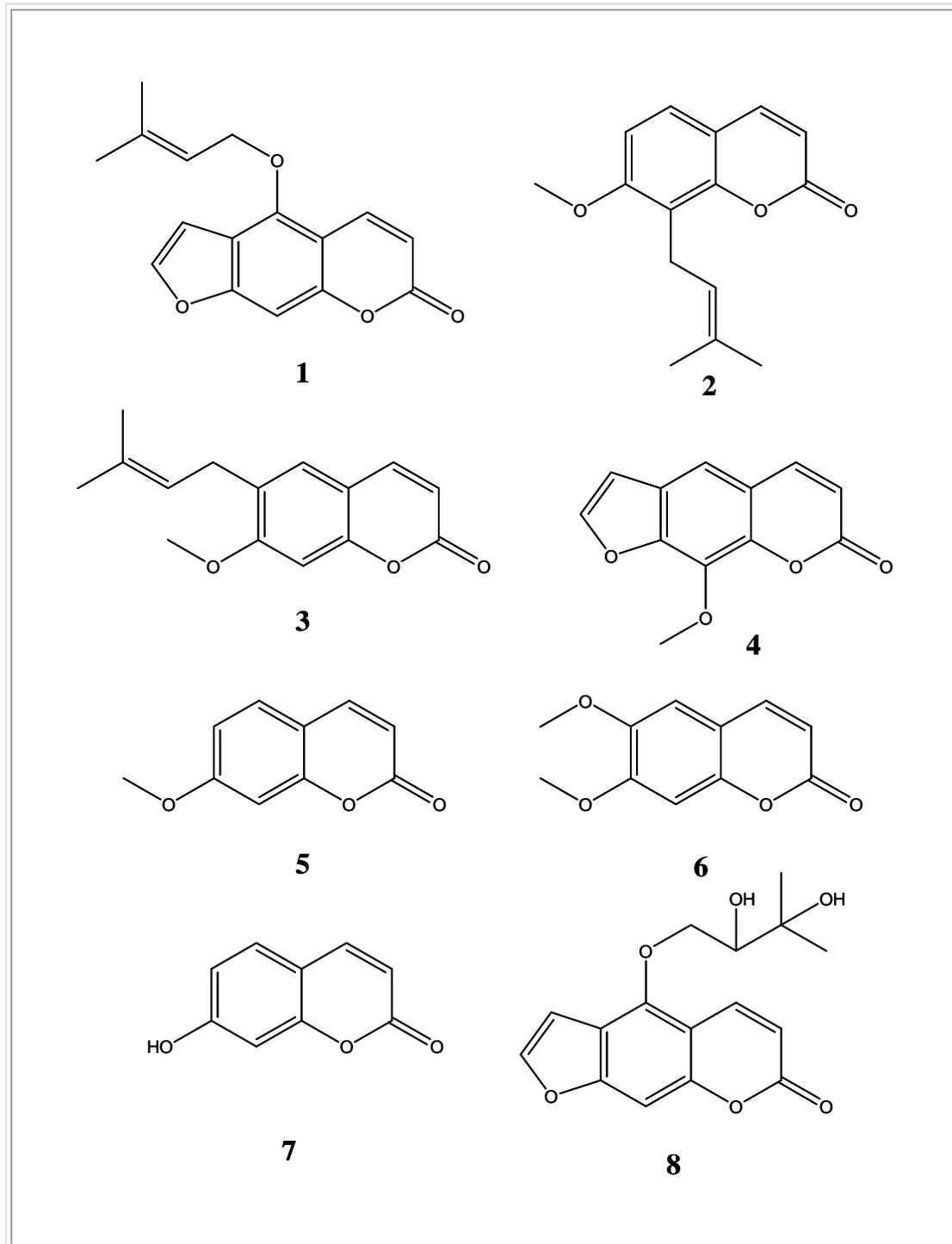


Figura 4. Metabolitos secundarios aislados de la especie *A. tolucensis*.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Un estudio reciente, acerca del estado del conocimiento de las plantas medicinales utilizadas en el mundo, reveló que se cuenta con datos etnomédicos de aproximadamente 14.317 especies, incluidas en 3.703 géneros y 272 familias. Las especies analizadas representan el 5.2 % del total de plantas identificadas en el mundo y, muchas de ellas, se han utilizado tradicionalmente en numerosas culturas desde épocas inmemoriales (Cordell y Quinn-Beattie, 2005; Cordell y Colvard, 2005). Es más, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), las especies analizadas son utilizadas por el 80 % de la población mundial, principalmente la de los países en vías de desarrollo para el tratamiento primario, a veces único, de las enfermedades más comunes que afectan a nuestra urbe (Houghton, 2001; WHO, 2001; Facheux *et al.*, 2003).

A pesar de que los medicamentos herbolarios han jugado un papel muy importante en el cuidado de la salud alrededor del mundo y, en particular en los países en vías de desarrollo, sólo una cantidad relativamente pequeña de éstos han sido estudiados con la finalidad de incorporarlos a los sistemas oficiales de salud pública (Farnsworth *et al.*, 1985; Cordell y Quinn-Beattie, 2005; Cordell y Colvard, 2005). Por ello, en 1978, la OMS en la reunión de Alma-Ata, recomendó a los países miembros que los medicamentos tradicionales de mayor uso fueran incorporados en sus sistemas oficiales de salud pública (WHO, 1978). Como consecuencia de esta reunión, en 1991, la OMS elaboró un documento con una serie de normas y procedimientos para la determinación de la eficacia, inocuidad y control de calidad (pureza, identidad y composición) de plantas medicinales. En 1998 se publicó una nueva versión más completa de este documento bajo el nombre de “Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials”. Ambos documentos se realizaron con la finalidad de facilitar el trabajo de las autoridades sanitarias de regulación de medicamentos en los países miembros, así como de las industrias involucradas en el desarrollo, evaluación y registro de los denominados medicamentos herbolarios (WHO, 1998).

Posteriormente, en 1999, la OMS publicó un documento técnico con 28 monografías de plantas medicinales selectas utilizadas en todo el mundo. Estas primeras monografías de plantas medicinales, elaboradas por un grupo numeroso de científicos, incluyen los aspectos relacionados con el control de calidad de la droga cruda (pruebas de identidad, pureza y composición), descripción de los usos tradicionales,

investigación farmacológica y clínica, posología, contraindicaciones y reacciones adversas potenciales. En el año 2001, se publicó un segundo volumen con 30 monografías adicionales bajo el mismo formato. Este conjunto de trabajos han representado un modelo ideal para la elaboración de monografías similares a nivel mundial (WHO, 1999, 2001).

Ante la gran demanda de plantas medicinales a nivel global y la necesidad de establecer normas adecuadas para garantizar su calidad, seguridad y eficacia, muchos países europeos, asiáticos y los Estados Unidos de América, están invirtiendo una gran cantidad de recursos económicos para la investigación integral de las plantas de mayor uso terapéutico, incluyendo aspectos clínicos, toxicológicos, químicos, botánicos y farmacológicos (Cordell y Colvard, 2005). De tal forma que asociaciones como la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP) en los Estados Unidos y la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP) en Europa, han comenzado a elaborar sus propias monografías bajo el formato de la OMS. Estas monografías han sido de utilidad para la regulación de los productos herbolarios en muchos países del mundo, disminuyendo así, los problemas tan comunes de adulteración y/o sustitución (con otras plantas o fármacos), contaminación (por microorganismos, plaguicidas, metales tóxicos, otras especies, etc.) y variación en la composición de las plantas medicinales destinadas al comercio local o global (Artiges, 1991; Bonati, 1991; Bauer 1999).

La investigación requerida para elaborar una monografía tipo OMS es multidisciplinaria y consta de varias fases: la primera etapa consiste en el estudio de los aspectos etnobotánicos y antropológicos. La segunda requiere de la caracterización química, estudios de control de calidad y estandarización de la droga, así como, la identificación del o los principios activos. Finalmente, la tercera etapa implica los estudios toxicológicos, farmacológicos y clínicos, conducentes a determinar la seguridad y eficacia de las plantas (ESCOP, 1996, 1997, 1999).

En nuestro país, el uso de las plantas medicinales se remonta a épocas ancestrales y, al igual que en otras regiones del mundo, el consumo de plantas medicinales en el México actual se ha incrementado notablemente en todos los sectores sociales, aún en los más privilegiados, otrora usuarios de los medicamentos de patente. El Instituto Nacional Indigenista (INI) estima que existen más de 3.500 especies con propiedades medicinales utilizadas por una gran parte de la población para tratar numerosos padecimientos (Lozoya, 1993; Bye y Linares, 1983).

El uso indiscriminado de plantas medicinales durante la década de los noventas y lo que va del siglo XXI, ha conllevado a un comercio, a veces ilegal, y explotación exagerados de estos recursos. La falta de regulación de los productos herbolarios ha ocasionado una sobre explotación de las materias primas, al punto tal que muchas especies vegetales se encuentran en peligro de extinción (Hersch, 1996). En consecuencia urgen políticas para la conservación y desarrollo sostenible de plantas medicinales. Asimismo, la carencia de un reglamento apropiado para el registro y control de calidad de las plantas medicinales, ha conllevado a una práctica, cada vez más frecuente, de adulteración y sustitución de materias primas, poniendo en riesgo la salud ya mermada del consumidor.

En este panorama, en 1998, se publicó el primer Reglamento de Insumos para la Salud en donde se indican las condiciones para el registro, autorización y venta que deben de cumplir los remedios herbolarios (DOF, 1998). Posteriormente, en 1999, se anexó al reglamento la lista de plantas prohibidas para la elaboración de tisanas, infusiones y aceites vegetales comestibles (DOF, 1999). Con todos estos avances en la legislación mexicana, en el año 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), como una necesidad de referentes para estos productos y como una respuesta a la propuesta de la OMS (FHEUM, 2001).

Sin embargo, y a pesar de que dicha Farmacopea fue realizada por un conjunto de expertos, las monografías de especies autóctonas resultaron muy limitadas en cantidad, contenido y calidad, ya que desafortunadamente no se cuenta con la información suficiente para integrarlas correctamente y las autoridades sanitarias no cuentan con la infraestructura física y humana requeridas para desarrollar la investigación que permita la integración de estos documentos. Por lo tanto, las autoridades dependen de las universidades y otros centros de investigación del país para realizar este trabajo (Frenk *et al.*, 2005).

Considerando entonces la necesidad en México de integrar las monografías que permitan la regulación de sus recursos herbolarios, recientemente, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó a la Facultad de Química-Instituto de Biología un proyecto Sectorial (C01-018) con la finalidad de realizar la investigación científica necesaria para integrar las monografías tipo OMS de especies medicinales selectas.

Con base en lo antes expuesto, el objetivo general del presente trabajo de investigación es realizar el estudio químico y farmacológico de la especie *Arracacia toluensis* var. *multifida* con la finalidad de establecer algunos parámetros de eficacia, inocuidad y calidad de la droga cruda. Esta información permitirá generar la información científica necesaria para la elaboración de su monografía tipo OMS.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar el potencial mutagénico y la toxicidad aguda mediante la prueba de Ames y el método de Lorke, respectivamente, con la finalidad de establecer, de manera inicial, la inocuidad de la especie.
- Evaluar el potencial farmacológico del extracto orgánico y aceite esencial de *A. toluensis*, mediante la evaluación de su efecto sobre las contracciones espontáneas e inducidas en íleon aislado de cobayo y la evaluación de su potencial antibacteriano frente a una batería de microorganismos, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la eficacia de la planta.
- Establecer los principios activos de la especie.
- Establecer los compuestos marcadores y perfiles cromatográficos, tanto del aceite esencial como de los extractos íntegros de *A. toluensis*, con la finalidad de establecer las pruebas de identidad de la especie.
- Desarrollar un método analítico que permita cuantificar los principios activos de la especie.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 ENSAYOS DE INOCUIDAD

3.1.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA

La evaluación de la inocuidad del extracto orgánico obtenido a partir de *A. toluensis* se determinó de acuerdo al procedimiento establecido por Lorke (1983). El ensayo correspondiente se realizó empleando ratones macho cepa ICR (20-25 g) mantenidos en un bioterio con 18 horas de ayuno. La toxicidad aguda del extracto se determinó en dos fases: en la primera se emplearon dosis únicas de 10, 100 y 1000 mg/Kg de peso, mientras que en la segunda se emplearon dosis únicas de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg de peso. Cada dosis se evaluó por triplicado y la vía de administración empleada fue la oral. Como control se utilizó un grupo de ratones administrado con solución salina isotónica por la misma vía. En las dos fases, los animales se observaron durante 14 días. Al término del ensayo, todos los animales sobrevivientes se sacrificaron por dislocación cervical, con la finalidad de realizar una disección en el abdomen del animal que permitiese aislar los órganos vitales (hígado, riñón, corazón, estómago) y así registrar posibles alteraciones. Los animales que fallecieron en el transcurso del experimento también fueron sometidos al mismo análisis *post-mortem*. La DL_{50} (dosis que produce la mortalidad del 50 % de los animales evaluados) se determinó mediante la metodología descrita por Lorke (1983).

3.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MUTAGÉNICA

La mutagenicidad del extracto se determinó de acuerdo al diseño experimental previamente establecido por Ames (Ames *et al.*, 1975; Maron y Ames, 1983) sobre las cepas TA 98, TA 100 y TA 102 de *Salmonella typhimurium*. En el **Cuadro 2** se indican las características más importantes de las cepas estudiadas.

3.1.2.1 PREPARACIÓN DEL HOMOGENADO DE LA FRACCIÓN S9

La evaluación de la activación metabólica de *S. typhimurium* se realizó en presencia de la fracción S9, a través del conteo de las colonias revertantes de histidina

(His). La preparación de ésta fracción se realizó de la siguiente manera: a cinco ratas macho cepa Wistar (200 g) se les administró, vía intraperitoneal, una dosis única de 500 mg/Kg de peso del carcinógeno Aroclor 1254. Al cabo del quinto día de la administración, previo ayuno, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Acto seguido, se realizó una disección en el abdomen para remover el hígado. Estos se colocaron en una solución estéril de KCl 0.15 M y se sometieron a lavados sucesivos. Posteriormente, se transfirieron a un homogenizador con 150 mL de una solución de KCl 0.15 M. La mezcla se agitó suavemente. El homogenado se centrifugó a 8700 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se congeló a -80 °C en alícuotas de 1 mL. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo al método de Lowry y colaboradores (Lowry *et al.*, 1951).

Cuadro 2. Características de las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el ensayo de mutagenicidad.

<i>S. typhimurium</i>			
	TA 98	TA 100	TA 102
Revertantes de histidina/placa	30-50	120-200	240-320
Condiciones de incubación	aerobio, 37 °C	aerobio, 37 °C	aerobio, 37 °C
Mutágeno s/S9	ácido picrolónico	N-etilen-N-nitrosoguanidina	mitomicina C
Mutágeno c/S9	2-aminoantraceno	ciclofosfamida	mitomicina C 2-aminoantraceno
Mutación en el operón de histidina	his D3052	his G46	his G428 (pAQ1)

3.1.2.2 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE AGAR

Las placas de agar se prepararon colocando 25 mL del medio Vogel-Bonner (**Apéndice I**) en cada caja de Petri.

3.1.2.3 PREPARACIÓN DE LOS TUBOS DE INÓCULO

Los tubos de inóculo se prepararon con un medio de agar suave compuesto por: agar 0.6 %, NaCl 0.6 %, L-histidina 0.5 mM y D-biotina 0.5 mM. El medio resultante se esterilizó en autoclave a 121 °C y 21 lb/cm², durante 15 minutos. Por último, 2 mL del medio se vertieron en tubos de ensayo de 13 × 100 mm estériles.

3.1.2.4 BIOENSAYO DE MUTAGENICIDAD

a) Preparación del inóculo: a partir de un cultivo de reserva, la bacteria *S. typhimurium* se sembró en caldo Oxoid® y el cultivo se mantuvo en agitación a 37 °C, durante 16 horas.

b) Preparación de la fracción S9: el bioensayo de mutagenicidad se realizó empleando una fracción S9 al 4 %. A 1 mL del homogenado se adicionó 1 mL de buffer de cloruros, 23 mL de buffer de fosfatos, 60 mg de glucosa-6-fosfato y 26 mg de β-NADP (**Apéndice I**). La solución resultante se esterilizó por filtración utilizando membranas Acrodisc® de 0.45 μm.

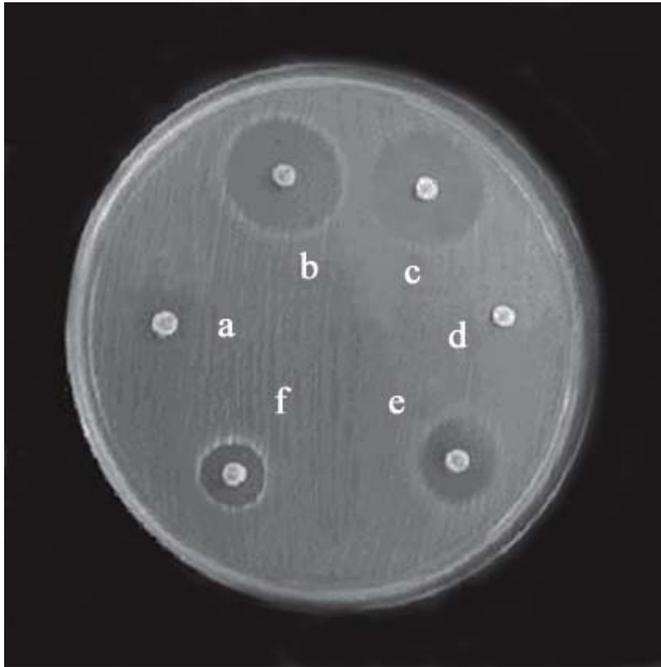
c) Evaluación y preparación de las muestras: la evaluación del potencial mutagénico se efectuó de acuerdo a la metodología que se describe a continuación: 100 μL del inóculo de *S. typhimurium*, 20 μL de la muestra de prueba a las concentraciones finales de 1000, 500 y 250 μg por caja y 500 μL de agua y/o fracción S9 se adicionaron a cada tubo de agar suave a 45 °C. La suspensión se homogenizó y se vertió sobre la superficie de las placas de agar Vogel-Bonner. Una vez preparadas las cajas, se preincubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las cajas se invirtieron e incubaron por 48 horas a 37 °C. El número de colonias revertantes de histidina se determinó mediante el conteo de las colonias sobre la superficie de agar, utilizando un contador de colonias modelo Fisher. Como control positivo se utilizaron 10 μL de los mutágenos indicados en el **Cuadro 2**. También se realizaron controles de medio y disolvente (DMSO) empleado para solubilizar las muestras.

3.2 ENSAYOS DE EFICACIA

3.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La actividad antimicrobiana del extracto y del aceite esencial se determinó empleando el bioensayo de difusión en agar (Mitscher *et al.*, 1972, 1987; NCCLS, 1997, 2003; Alderman y Smith, 2001) contra bacterias Gram positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)] y Gram negativas [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Salmonella typhi* (ATCC 9992)]. Todos los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Como medio de cultivo se utilizó agar Müeller-Hinton. Este agar se rehidrató de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial y se esterilizó en una autoclave a 121 °C y 15 lb/cm², durante 20 min.

Los ensayos correspondientes se efectuaron en las placas de agar Müeller-Hinton, previamente preparadas añadiendo 10 mL de agar, inoculado con 20 µL del microorganismo de prueba, ajustado al estándar turbidimétrico de McFarland al 0.5% (1×10^8 células/mL) en cada caja de Petri. Una vez solidificado el agar en las placas, se colocaron seis discos de papel filtro (6 mm de diámetro/disco) en forma equidistante en cada placa (**Figura 5**). Dos discos contenían 5 µL del antibiótico adecuado a una concentración mayor a la concentración crítica inhibitoria (CCI) determinada previamente (**Cuadro 3; Apéndice II**); dos contenían 5 µL de DMSO (control negativo); y los dos últimos 100, 250, 500, 750 ó 1000 µg de la muestra a evaluar. Las cajas se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron por 24 horas a 37 °C. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Para disolver las muestras se utilizó DMSO.



a y d: discos impregnados con el control de disolvente

b y c: discos impregnados con el antibiótico de referencia

e y f: discos impregnados con la muestra de prueba

Figura 5. Ensayo antimicrobiano de difusión en agar.

Cuadro 3. Concentraciones críticas inhibitorias (CCI) de los antibióticos empleados como controles positivos.

Microorganismo de prueba	Control (+)	CCI (µg/disco)	Concentración utilizada en el ensayo (µg/disco)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Amikacina	0.11	0.15
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	Vancomicina	0.07	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Gentamicina	0.18	0.20
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	Gentamicina	0.04	0.05
<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 9992)	Ciprofloxacina	0.01	0.015

3.2.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIESPASMÓDICO DEL EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL DE *A. tolucensis* SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA E INDUCIDA EN ÍLEON AISLADO DE COBAYO

3.2.2.1 AISLAMIENTO DEL ÍLEON

Para la obtención del tejido se utilizaron cobayos macho (200-250 g), en ayuno de 24 horas con libre acceso de agua. Los animales se sacrificaron utilizando una cámara saturada de éter etílico. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen que permitió el aislamiento del íleon (10-12 cm). El íleon aislado se limpió con solución salina (0.9 %) y se cortó en segmentos de 1 a 1.5 cm. Los segmentos se colocaron en una solución Tyrode, preparada con la siguiente composición (mM): NaCl 149.2, KCl 2.7, MgCl₂ · 6H₂O 2.1, CaCl₂ 3.6, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 11.9 y glucosa 5.0. La solución se preparó con agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (95:5) a 37 °C.

3.2.2.2 MONTAJE DE LA PREPARACIÓN Y SISTEMA DE REGISTRO

Para determinar el efecto sobre la contracción espontánea e inducida del extracto orgánico y aceite esencial, se empleó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado (**Figura 6**). Para ello, los segmentos de íleon se colocaron en una cámara de incubación con 10 mL de solución Tyrode burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de O₂/CO₂ (95:5) a una temperatura de 37 °C que se mantuvo mediante un baño recirculador. En estas condiciones, el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y, del otro, a un transductor de fuerza Grass FT 03E conectado a un polígrafo MP100 Manager Biopac System. Los datos se obtuvieron mediante el software *Acqknowledge*[®] versión 3.7.3.

El tejido se sometió a una tensión inicial de 1 g y se estimuló con 100 µL de carbacol (1x10⁻⁴ M), en tres ocasiones y en intervalos de 30 min. Posterior a cada estímulo, el tejido se lavó tres veces con solución Tyrode con intervalos de 10 min entre cada lavado para permitir su recuperación.

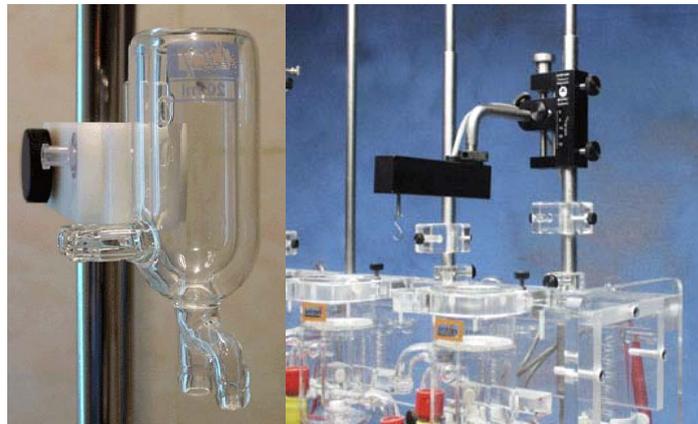
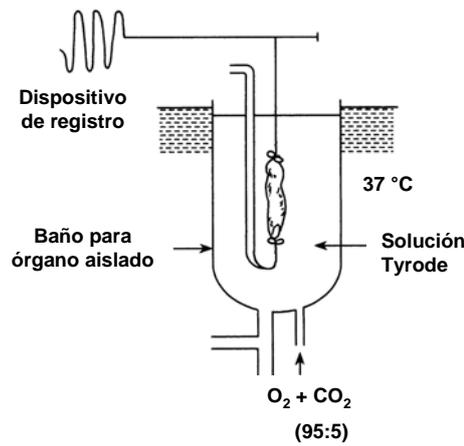


Figura 6. Sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado.

3.2.2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIESPASMÓDICO

Para evaluar el efecto antiespasmódico del extracto orgánico y del aceite esencial de *A. toluensis*, en primer lugar, se adicionó a la preparación 100 μ L de la concentración de un espasmógeno [acetilcolina (1×10^{-4} M), histamina (1×10^{-3} M), serotonina (1×10^{-4} M) y $BaCl_2$ (1×10^{-2} M)], en experimentos independientes, registrándose la actividad durante un período de tres minutos. La actividad registrada se consideró como el 100 % de respuesta. Al cabo de los tres minutos, los tejidos se lavaron con la solución Tyrode, en tres ocasiones y con intervalos de 10 min entre cada lavado, para permitir su recuperación. Posteriormente, se adicionó a la preparación 100 μ L de la muestra a evaluar a las concentraciones finales de 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 μ g/mL y el tejido se incubó durante 10 min. La respuesta obtenida posterior a cada adición de la muestra a evaluar corresponde al efecto generado por la misma sobre las

contracciones espontáneas del íleon. Después de la incubación, se adicionaron nuevamente 100 µL del mismo espasmógeno agregado inicialmente y la respuesta se registró durante tres minutos. Como control positivo se utilizó papaverina, conocido agente antiespasmódico de origen natural. Para disolver las muestras se utilizó agua destilada y trazas de tween 80.

El cálculo de la CI_{50} (concentración inhibitoria necesaria para disminuir la respuesta farmacológica en un 50 %) para antagonizar una respuesta fija del espasmógeno de prueba y/o las contracciones espontáneas del tejido se realizó a partir de las curvas concentración-respuesta (SigmaPlot versión 9.0) mediante un análisis de regresión no lineal (modelo de efecto máximo o Ecuación de Hill). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía en el software SigmaStat versión 3.10, considerando diferencias significativas para una $p < 0.05$.

3.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *A. toluensis*

3.3.1 MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas de la especie *Arracacia toluensis* (H. B. K.) var. *multifida*, utilizadas en el presente estudio, fueron recolectadas en el Sur del Valle de México, Distrito Federal, el 27 de septiembre de 1999 (lote 1) y el 18 de enero del 2004 (lote 2). La identificación y clasificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). Las muestras de herbario (voucher: Bye y Morales 27040, lote 1; Bye 33821, lote 2) fueron depositadas en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

3.3.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES

3.3.2.1 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

La Cromatografía en Columna Abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 nm, malla de 70-230 µm ASTM).

Los análisis Cromatográficos Cualitativos en Capa Fina (CCF) y de tipo preparativo (CCFP) se realizaron sobre placas de aluminio y/o vidrio de 0.25 mm de

grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla de 3.5-7.0 μm ASTM) de diferentes dimensiones, de acuerdo a las técnicas convencionales y empleando diversos sistemas de elución (Ettre y Kalasz, 2001). Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C durante 1 minuto.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EUA) equipado con un detector de UV Dual 2487. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Millennium 2000 (Waters). Los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

La Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo marca JEOL modelo JMS-AXSOCCHA. La columna utilizada fue del tipo 5% fenil-metil silicón HP, con una longitud de 30 m y 0.32 mm de diámetro. Se empleó helio como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna se programó de 150 a 300 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura del eyector y detector se ajustó a 275 °C. El voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV. Las masas se registraron en un rango de 33 a 800 uma.

3.3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir.

Los espectros en el infrarrojo (IR) se midieron en un espectrofotómetro modelo 599-B de rejilla Perkin Elmer, utilizando las técnicas de pastilla de KBr o película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN¹H) y de Carbono 13 (RMN¹³C) se registraron en un aparato Varian VXR-300S a 300 (¹H)/75 (¹³C) MHz o Varian Unity Inova a 400 (¹H)/100 (¹³C) MHz, empleando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm.

Los Espectros de Masas se generaron por la técnica de Impacto Electrónico (EMIE) por introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 700 unidades de masa-carga (*m/z*) por segundo, en un espectrómetro de masas HP 5890 (serie II).

El registro de los espectros se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

3.3.2.3 PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *A. toluensis*

La preparación del aceite esencial a partir de 1.0 Kg del material vegetal seco y molido de la especie *A. toluensis* se realizó mediante un proceso de hidrodestilación de acuerdo a las especificaciones de la FHEUM (2001) y la OMS (WHO, 1998; **Figura 7**). Posteriormente, la esencia fue extraída del hidrodestilado mediante una partición con CH_2Cl_2 (3 x 500 mL). Al cabo de este proceso, el disolvente se eliminó por una destilación al vacío para generar 4 g de un aceite amarillo.



Figura 7. Equipo para la obtención de aceites esenciales por hidrodestilación directa.

3.3.2.4 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *A. toluensis*

El material vegetal seco y molido de las partes aéreas de *A. toluensis* (2.0 Kg) se extrajo mediante un proceso de maceración, utilizando una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) a temperatura ambiente. El extracto orgánico resultante se filtró y concentró a presión reducida.

3.3.3 FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR

El extracto orgánico seco (160 g) obtenido en el inciso anterior se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante una CCA, utilizando como adsorbente 1.0 Kg de gel de sílice y como fase móvil hexano, hexano con cantidades crecientes de acetato de etilo y acetato de etilo-MeOH (1:1). Este proceso generó siete fracciones primarias (F₁-F₇). En el **Cuadro 4** se resume el proceso cromatográfico correspondiente al fraccionamiento preliminar del extracto total de *A. toluensis*.

Cuadro 4. Fraccionamiento preliminar por CCA del extracto total de *A. toluensis*.

FASE MÓVIL	PROPORCIÓN	ELUATOS	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hex-AcOEt	9 :1	1-27	1-26	F₁
	8:2	28-51	27-41	F₂
	7:3	52-79	42-47	F₃
	1:1	80-90	48-62	F₄
	3:7	91-101	63-88	F₅
AcOEt		102-108	89-103	F₆
AcOEt-MeOH	1:1	109	104-109	F₇

3.3.4 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (1), EL OSTOL (2) Y LA SUBEROSINA (3) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F₁

De la fracción primaria F₁ (**Cuadro 4**), cristalizaron de manera espontánea 500 mg de un sólido cristalino incoloro, con un punto de fusión de 104-106 °C, idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica de la isoimperatorina (1).

El análisis por CCF de la fracción primaria **F₁**, utilizando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (95:5), permitió evidenciar la presencia de dos componentes mayoritarios. Posteriormente, la resolución de esta fracción mediante la técnica de CLAE permitió la purificación del ostol (**2**; 100 mg) con un t_R de 12.61 min y la suberosina (**3**; 30 mg) con un t_R de 19.50 min. La identificación de ambos productos se realizó por comparación con muestras auténticas.

3.3.5 AISLAMIENTO DE LA ISOIMPERATORINA (1), EL 8-METOXIPSORALENO (4), LA HERNIARINA (5) Y LA ESCOPARONA (6) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F₂

Con la finalidad de aislar los compuestos presentes en la fracción primaria **F₂** (**Cuadro 4**) se realizó un análisis cromatográfico por CCA sobre gel de sílice (170 g) utilizando como fase móvil CH₂Cl₂ y mezclas de CH₂Cl₂-MeOH, incrementando gradualmente la polaridad. Esta metodología generó cinco fracciones secundarias, **F_{2-I}**-**F_{2-V}**. La resolución de la fracción secundaria **F_{2-II}** mediante CCFP, utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (9:1), permitió el aislamiento de 17 mg de un sólido blanco con punto de fusión de 143-145 °C identificado como la escoparona (**6**) por comparación con una muestra auténtica.

La separación de los constituyentes presentes en la fracción secundaria **F_{2-III}** se realizó mediante un análisis cromatográfico por CLAE. Este procedimiento permitió la purificación de tres productos mayoritarios (**1**, **4** y **5**) identificados como la isoimperatorina (**1**; 50 mg) con un t_R de 18.76 min, el 8-MOP (**4**; 70 mg) con un t_R de 20.48 min y la herniarina (**5**; 10 mg) con un t_R de 21.94 min, por comparación con muestras auténticas.

3.3.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA UMBELIFERONA (7) Y LA DIHIDROOXIPEUCEDANINA (8) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F₄

El análisis cromatográfico de la fracción primaria **F₄** (**Cuadro 4**) se realizó mediante una CCA sobre gel de sílice (300 g). El proceso de elución se llevó a cabo con un gradiente de polaridad a base de CH₂Cl₂-MeOH. Este proceso generó ocho fracciones secundarias **F_{4-I}**-**F_{4-VIII}**. La resolución de la fracción **F_{4-IV}**, mediante la

aplicación de sucesivas CCFP [sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (9:1)], permitió el aislamiento de 35 mg de la umbeliferona (**7**), como un sólido verdoso claro con un punto de fusión de 230-232 °C.

Posteriormente, el estudio de la fracción secundaria **F_{4.v}**, mediante una CCFP, utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-MeOH (95:5), permitió la purificación de 25 mg de la dihidrooxipeucedanina (**8**), como un sólido amarillo claro con punto de fusión de 134-135 °C.

3.3.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL 5-METOXIPSORALENO (5-MOP; 9), LA 7-METOXI-6-HIDROXI CUMARINA (10) Y LA 6-METOXI-7-HIDROXI CUMARINA (11) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA F₅

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F₅** (**Cuadro 4**), mediante una CCA [450 g de gel de sílice; fase móvil: hexano-CH₂Cl₂ (1:0) → (0:1) y CH₂Cl₂-MeOH (1:0) → (0:1)]. Este proceso condujo a la obtención de siete fracciones secundarias, **F_{5-I}**- **F_{5-VII}**. El análisis cromatográfico por CLAE de la fracción secundaria **F_{5-II}** permitió el aislamiento y la purificación de 12 mg de la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**; *t_R* 9.49 min) como un sólido cristalino blanco con punto de fusión de 230-232 °C.

Finalmente, la separación de los constituyentes individuales presentes en la fracción secundaria **F_{5-VII}**, mediante CCFP, utilizando como sistema de elución una mezcla binaria de CH₂Cl₂-MeOH (95:5), permitió el aislamiento del 5-MOP (**9**, 20 mg; punto de fusión 187-188 °C) y la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**, 25 mg; punto de fusión 178-180 °C).

3.4 ENSAYOS DE IDENTIDAD Y COMPOSICIÓN

3.4.1 ESTABLECIMIENTO DE LOS PERFILES CROMATOGRÁFICOS

El análisis cromatográfico cualitativo por CLAE del extracto total y aceite esencial de *A. toluensis* se realizó empleando una columna Nova-Pak® Silica (Waters, tamaño de partícula de 6 µm), de 3.9 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La elución se realizó empleando un sistema isocrático con una mezcla ternaria constituida

por hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (80:7:13). La velocidad de flujo fue de 0.6 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue 285 nm.

3.4.2 ANÁLISIS POR CG-EM DEL ACEITE ESENCIAL DE *A. toluensis*

El análisis de los constituyentes presentes en el aceite esencial obtenido a partir de *A. toluensis*, se realizó por CG-EM. La identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial se realizó mediante la técnica de coelución con muestras adquiridas comercialmente y por comparación de los espectros generados por los compuestos con aquellos de la biblioteca del equipo o de muestras auténticas. La cuantificación de los constituyentes se realizó mediante la medición de las áreas bajo la curva de cada pico.

3.4.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA ISOIMPERATORINA (1), EL OSTOL (2), EL 8-MOP (4) Y EL 5-MOP (9) POR CLAE

El desarrollo del método analítico por CLAE para la cuantificación de cuatro de los constituyentes mayoritarios presentes en el extracto orgánico de *A. toluensis*, se realizó con dos lotes de material vegetal. El método se desarrolló inicialmente con el objetivo de optimizar las condiciones instrumentales necesarias para lograr la máxima resolución y separación de los constituyentes presentes en el extracto. Estos análisis se realizaron utilizando una columna empacada con gel de sílice Nova-Pak® Silica marca Waters, con un tamaño de partícula de 6 µm. El diámetro interno es de 3.9 mm y la longitud de 300 mm. La concentración de la muestra utilizada en estos análisis fue de 0.25 mg en un volumen inyectado de 50 µL. La elución se realizó con una mezcla ternaria constituida por hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (80:7:13). La velocidad de flujo fue de 0.6 mL/min. La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue 285 nm.

3.4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación del método analítico se realizó con base en los criterios establecidos por las guías de la Société Française Sciences et Techniques

Pharmaceutiques (SFSTP; Hubert *et al.*, 1999) y las guías de Harmonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos (ICH Q2A, 1998; ICH Q2B, 1998).

Los parámetros de calidad evaluados del método analítico desarrollado previamente fueron los siguientes:

- a) Especificidad/Selectividad: para evaluar la especificidad/selectividad se registraron los espectros de absorción al visible (UV) de tres diferentes muestras, una correspondiente al blanco [CH_2Cl_2 100%], otra al extracto orgánico o matriz de trabajo y, la última, al extracto orgánico enriquecido con $5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de los estándares. La matriz de trabajo se preparó disolviendo 5 mg del extracto en 1 mL de CH_2Cl_2 .
- b) Linealidad y exactitud: para evaluar la linealidad del método y sistema se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Waters, acoplado a un detector UV Dual modelo 2487. La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración (concentración contra absorbancia) de acuerdo al siguiente procedimiento: 1 mg de estándar [isoimperatorina (**1**), ostol (**2**), 5-MOP (**9**) y 8-MOP (**4**)] se disuelven en 10 mL de CH_2Cl_2 (0.1 mg/mL). A partir de la solución anterior, se prepararon las disoluciones necesarias para que 1 mL de la misma contenga entre 0.00075 y 0.025 mg del estándar a cuantificar. El área de las señales (ABC) correspondientes a cada estándar utilizado, en cada réplica, se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b = 0$, $m \neq 0$, $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$ (USP XXIV). La evaluación de la exactitud del método se realizó utilizando el método analítico desarrollado en el inciso 3.4.3. Para ello, se realizó la adición de diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar (0.04-0.024 mg) en $50 \mu\text{L}$ de la matriz de trabajo. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se intrapolaron en las curvas de calibración desarrolladas para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ($b = 0$, $m \neq 0$, $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$) mediante un análisis de regresión lineal simple.

- c) Precisión: la precisión se evaluó midiendo la repetición (repetibilidad) y reproducibilidad del método analítico. La repetibilidad se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución estándar, la cual contenía 0.25 mg de la matriz de trabajo. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante la prueba estadística ANADEVa utilizando el estadístico de Fischer (**F**). Por otra parte, la reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describe en el párrafo anterior. El análisis se efectuó en dos diferentes días y por dos diferentes analistas.

3.5 ENSAYOS ADICIONALES

3.5.1 EFECTO DE LOS PRODUCTOS NATURALES SOBRE LA ENZIMA PDE1 DEPENDIENTE DE CALMODULINA (CaM)

La actividad sobre la PDE1 en presencia de CaM se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Sharma y colaboradores (Sharma y Wang, 1979; Sharma, 1997) y se describe a continuación:

- a) Preparación de la mezcla de reacción: una disolución que contiene 0.015 unidades de fosfodiesterasa de cerebro de bovino (PDE1, Sigma), 1 μ L de calmodulina (CaM, Sigma), 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* (Sigma) y 30 nM de la proteína albúmina sérica bovina (ASB, Boehringer Mannheim), en 1 mL de buffer TRIS-HCl constituido por TRIS-HCl 135 mM, acetato de magnesio 16.8 mM, imidazol 135 mM y CaCl_2 2.5 mM, a pH de 7, fue incubada durante 30 min a 30 °C.
- b) Realización del ensayo: en una placa de ELISA con 96 pozos (con una capacidad de 250 μ L por pozo) se adicionaron 10 μ L del compuesto a evaluar [disuelto en una mezcla binaria de acetonitrilo-agua (1:1)] a las concentraciones finales de 1, 2, 4, 7, 13, 20, 32, 50 y 60 nM. Posteriormente, se adicionaron 40 μ L de la mezcla de reacción y la placa se incubó durante 30 min a 30 °C. Al término de este período de incubación, a cada pozo se adicionaron 10 μ L de AMP cíclico 10.8 mM cada 10 segundos y la placa se incubó a temperatura

ambiente durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada pozo 190 μ L de una solución de verde de malaquita y molibdato de amonio, con la finalidad de estimar el contenido de fósforo inorgánico de manera colorimétrica. Como control positivo se utilizó a la clorpromazina un inhibidor específico de la CaM. Los valores de absorbancia obtenidos fueron intrapolados a una curva estándar de fosfato monobásico de potasio (Sigma), tomando las alícuotas necesarias para obtener once concentraciones diferentes en un intervalo de 0.1 a 3 nM. La absorbancia de las muestras se determinó a 655 nm utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD modelo 680.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base en el uso medicinal tradicional de varias especies del género *Arracacia* (Martínez, 1989; Bye, 2005), *Arracacia toluensis* var. *multifida* se seleccionó para la elaboración de una monografía tipo OMS, con la finalidad de promover a nivel oficial su uso racional.

Para integrar la monografía de una planta medicinal de acuerdo a los lineamientos de la OMS, es necesario realizar una investigación de carácter multidisciplinaria, orientada a determinar, en primera instancia, su eficacia e inocuidad y, posteriormente, sus parámetros de calidad. De tal forma que la primera parte de esta investigación se refiere a los estudios conducentes a determinar la inocuidad y eficacia de la droga cruda; y la segunda parte describe el estudio químico de las partes aéreas de la planta con la finalidad de establecer los principios activos y los criterios de calidad de la droga cruda, incluyendo los ensayos de identidad y composición, todo ello, siguiendo los lineamientos establecidos por la OMS y la FHEUM.

4.1 ENSAYOS DE INOCUIDAD

4.1.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *A. toluensis*

La evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de *A. toluensis* se realizó mediante la metodología descrita por Lorke (1983). Este ensayo tiene la ventaja de que requiere pocos animales de experimentación y los resultados se obtienen en un período de tiempo relativamente corto. De manera adicional, permite observar algunos síntomas de toxicidad en los animales de una manera sencilla.

El ensayo se realizó en dos fases: en la primera se administraron tres dosis del extracto (10, 100 y 1000 mg/Kg) y los animales se mantuvieron en observación durante 14 días. Como no se observó ningún deceso y en las necropsias no se apreciaron alteraciones morfológicas externas o de los órganos vitales, se repitió el estudio con un segundo grupo de animales, utilizando un intervalo de dosis mayor que las iniciales (1600,

2900 y 5000 mg/Kg). Al segundo día de esta segunda etapa fallecieron cuatro animales, uno a la dosis de 2900 mg/Kg y tres a la de 5000 mg/Kg (**Cuadro 5**). La necropsia de estos cuatro animales no mostró alteración de los órganos vitales ni daños visibles. El resto de los animales sobrevivieron los 14 días del experimento sin problema alguno y los estudios *post-mortem* no revelaron efecto tóxico alguno.

Cuadro 5. Evaluación de la toxicidad aguda de la especie *A. toluensis*.

Fase 1			Fase 2			DL ₅₀ (mg/Kg)
Dosis (mg/Kg)			Dosis (mg/Kg)			
10	100	1000	1600	2900	5000	2852
0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	3/3	

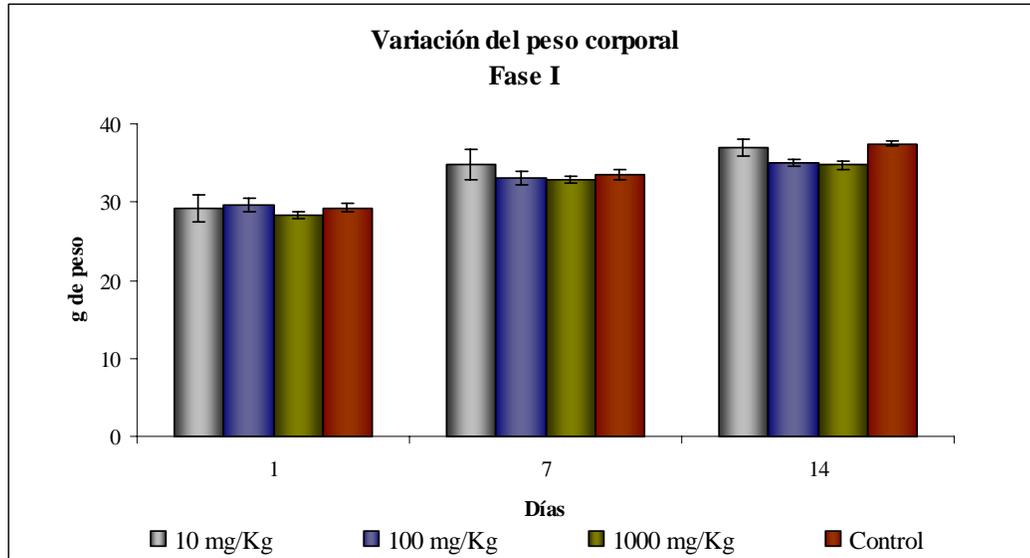
Durante las dos fases de la determinación se monitoreó el peso de los animales. Los resultados de este análisis revelaron que los animales tratados no experimentaron un aumento o disminución significativo de peso corporal con respecto al grupo control (**Gráficas 1 y 2**).

Al cabo de los experimentos, la DL₅₀ se determinó mediante el cálculo de la media geométrica de las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg, siguiendo el procedimiento descrito por Lorke (1983). El valor de DL₅₀ calculado fue de 2852 mg/Kg, por lo tanto, de acuerdo con los criterios de Lorke, este extracto se puede considerar poco tóxico.

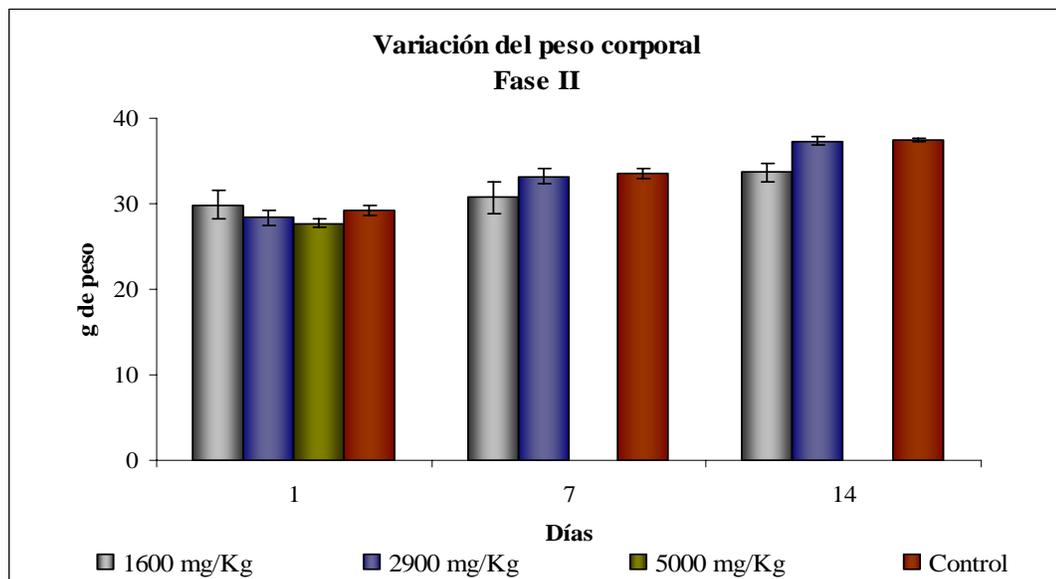
4.1.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MUTAGÉNICO DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *A. toluensis*

Para determinar el potencial mutagénico del extracto íntegro de la especie *A. toluensis* se utilizó la metodología clásica de Ames (Ames *et al.*, 1975; Maron y Ames, 1983). Esta prueba se fundamenta en la detección de productos capaces de provocar la reversión de la mutación en el operón de la histidina (His) de distintas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 102, TA 104, etc.), diseñadas especialmente a través de procedimientos genéticos altamente específicos. Estas cepas son auxótrofas al aminoácido histidina (His⁻) y por lo tanto, no pueden sintetizar dicho aminoácido. El crecimiento

normal, así como, la formación de colonias bacterianas, no se observará en ausencia de la His.



Gráfica 1. Variación del peso corporal de los ratones durante la Fase I.

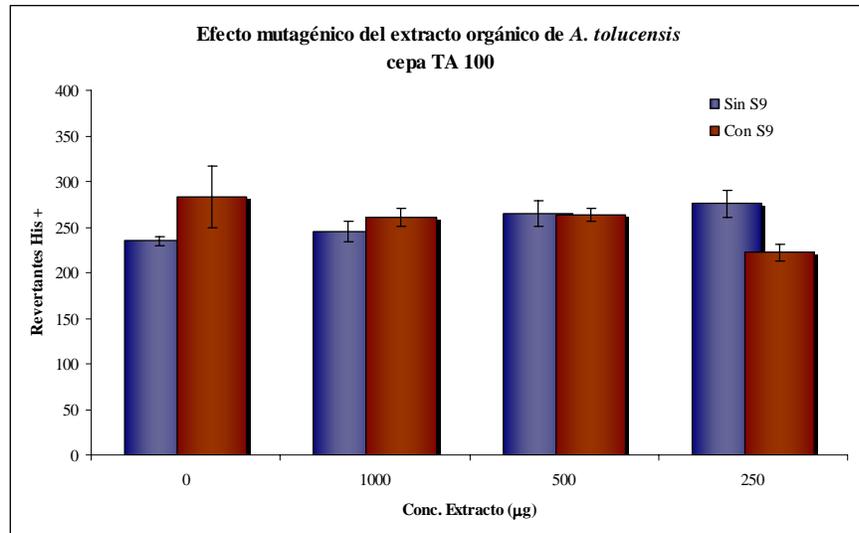


Gráfica 2. Variación del peso corporal de los ratones durante la Fase II.

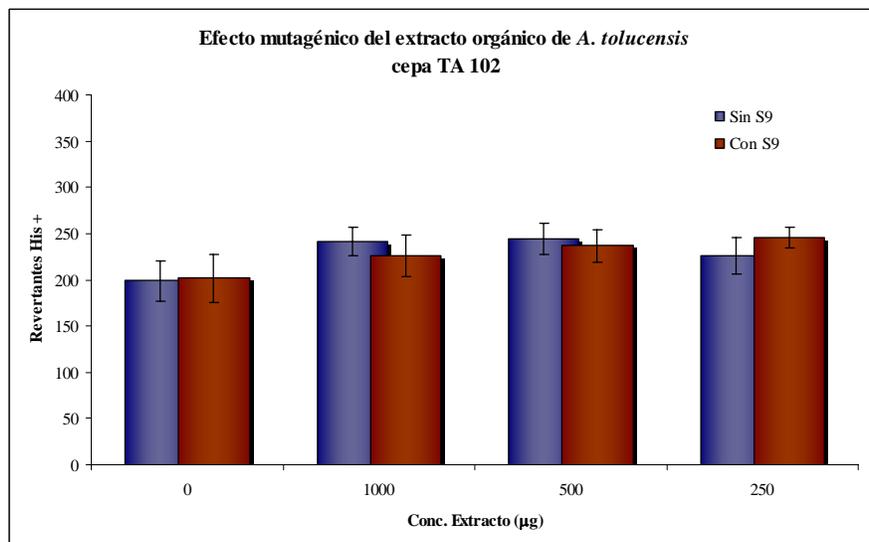
Las distintas mutaciones en el operón de His de las bacterias constituyen blancos específicos para mutágenos que causan daño en el ADN por diversos mecanismos, de tal forma que algunas mutaciones adicionales próximas a estos puntos, pueden ocasionar una restauración de la funcionalidad de los genes e inducir la capacidad para sintetizar His. Estas nuevas células bacterianas mutantes (His +) pueden crecer en ausencia de His y formar colonias, por este motivo, la prueba de Ames es conocida también como un ensayo de reversión (Ames *et al.*, 1975; Maron y Ames, 1983).

Una modificación del ensayo original de Ames consiste en incorporar al medio de cultivo bacteriano un extracto de células de mamífero, además del supuesto mutágeno y, la cepa bacteriana de prueba. Esta modificación permite evaluar el efecto del metabolismo celular animal sobre el mutágeno potencial y así establecer su posible mutagenicidad en un sistema biológico más complejo. El sistema celular más utilizado es la denominada fracción S9, que se obtiene a partir de un homogenizado de hígado de ratas previamente tratadas con un potente inductor de los citocromos P-450, el Aroclor 1254 (Ames *et al.*, 1975; Maron y Ames, 1983). Esta fracción así tratada, puede ocasionar la formación de mutágenos a partir del extracto o sustancia de prueba, mimetizando así las condiciones que pudiesen presentarse en un organismo vivo que consuma estos productos.

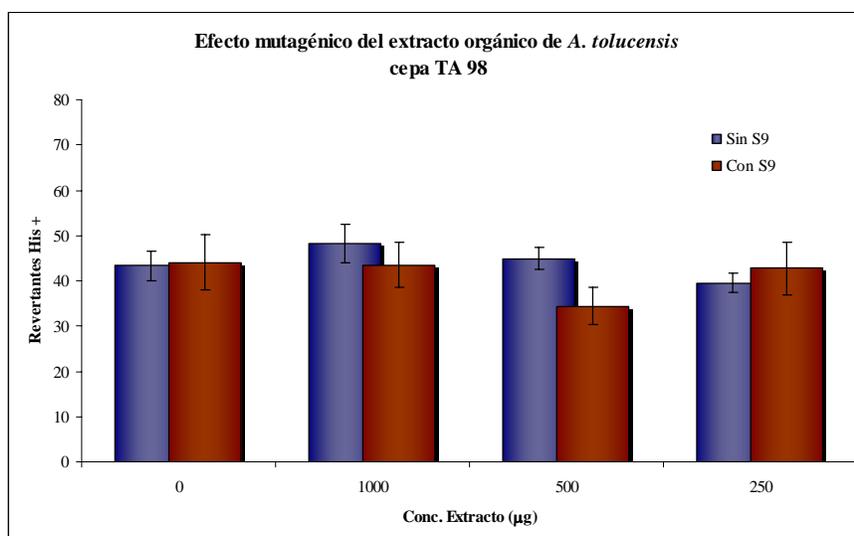
Los resultados obtenidos para la evaluación del extracto orgánico de la especie *A. toluensis* nos muestran que el extracto no provocó la reversión de la mutación de las cepas evaluadas de *S. typhimurium* (TA 98, TA 100 y TA 102), ya que las mismas no fueron capaces de crecer en un medio mínimo sin el suplemento de His. En las **Gráficas 3-5** se ilustra el comportamiento del crecimiento bacteriano en presencia del extracto, con y sin la fracción S9 del homogenizado de rata.



Gráfica 3. Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de *A. tolucensis* por el método de incorporación directa con (■) y sin (■) la fracción S9. La bacteria fue incubada con el extracto a las concentraciones de 0, 1000, 500 y 250 µg. El número de revertantes His⁺ espontáneas fueron 234.7 ± 4.7 (■) y 283.1 ± 33.9 (■). El número de revertantes His⁺ inducidas por los mutágenos ciclofosfamida y N-etilen-N-nitrosoguanidina fueron 407.7 ± 34.0 y 4692.0 ± 571.8 , respectivamente.



Gráfica 4. Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de *A. tolucensis* por el método de incorporación directa con (■) y sin (■) fracción S9. La bacteria fue incubada con el extracto a las concentraciones de 0, 1000, 500 y 250 µg. El número de revertantes His⁺ espontáneas fueron 199.1 ± 21.6 (■) y 201.7 ± 26.2 (■). El número de revertantes His⁺ inducidas por los mutágenos mitomicina C y 2AA fueron 3636.2 ± 291.1 y 3356.0 ± 452.2 , respectivamente.



Gráfica 5. Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico de *A. toluensis* por el método de incorporación directa con (■) y sin (■) fracción S9. La bacteria fue incubada con el extracto a las concentraciones de 0, 1000, 500 y 250 µg. El número de revertantes His + espontáneas fueron 43.3 ± 3.3 (■) y 44.1 ± 6.1 (■). El número de revertantes His + inducidas por los mutágenos ácido picrolónico y 2AA fueron 254.6 ± 27.6 y 3636.2 ± 291.1 , respectivamente.

4.2 ENSAYOS DE EFICACIA

Las pruebas de eficacia realizadas en este estudio consistieron en la determinación del potencial antiespasmódico y antibacteriano del extracto íntegro y aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas de la planta. Como se indicó en la sección de antecedentes, la especie se usa en las prácticas médicas populares como un agente carminativo, estimulante del apetito y contra la blenorrea (Martínez, 1989; Bye, 2005), por lo tanto, es probable que la planta contenga principios activos con propiedades espasmolíticas y antisépticas. Para demostrar esta hipótesis, se realizaron dos conjuntos de evaluaciones farmacológicas: en la primera se determinó el supuesto efecto antimicrobiano contra una batería de microorganismos Gram positivos y negativos, empleando el método de difusión en disco en cajas de Petri (Mitscher *et al.*, 1972, 1987; NCCLS, 2003; Alderman y Smith, 2001). Posteriormente, se estableció el efecto antiespasmódico del extracto orgánico y aceite esencial mediante una serie de experimentos *in vitro*, utilizando el modelo del íleon aislado de cobayo (Williamson *et al.*, 1996).

4.2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ORGÁNICO Y ACEITE ESENCIAL DE *A. toluensis*

Aunque previamente se comprobó que la especie *A. toluensis* tiene efecto contra *Mycobacterium tuberculosis* (Figueroa, 2004), agente etiológico de la tuberculosis, en el presente estudio se decidió ampliar los estudios de eficacia incrementando la batería de microorganismos de prueba. Los microorganismos seleccionados son causantes de enfermedades infecciosas en diversos organismos. Las infecciones de la piel causadas por el género *Staphylococcus* son una de las más frecuentes tanto en el hombre como en animales, ya que ésta especie contiene patógenos comunes para ambos; *Pseudomonas aeruginosa* es el agente causal de enfermedades como dermatitis y otitis externa; *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* destacan entre los principales agentes causales de gastroenteritis y fiebres entéricas, respectivamente, además de ocasionar septicemias e infecciones urinarias. *Bacillus subtilis* es uno de los principales patógenos relacionado con intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Romero, 1994; Eloff, 1998).

Para determinar el efecto antibacteriano se midió el efecto del extracto y aceite esencial sobre el crecimiento de microorganismos Gram positivos y negativos (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhi*). Este efecto se cuantificó midiendo los halos de inhibición generados alrededor del disco impregnado con una cantidad conocida de la muestra de prueba. Los resultados obtenidos se compararon con los halos de inhibición formados por el control positivo seleccionado con base en la susceptibilidad de cada microorganismo de prueba (NCCLS, 1997, 2003). La concentración del antibiótico control empleada fue mayor a la CCI con la finalidad de garantizar la difusión de la cantidad de antibiótico necesaria para inducir un halo de inhibición significativo.

El estudio del efecto antimicrobiano permitió evidenciar que el extracto íntegro inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas *S. aureus* y *B. subtilis* con CCI de 49.6 y 138.5 µg/disco, respectivamente. Por otra parte, el aceite esencial inhibió el crecimiento tanto de las bacterias Gram positivas, como de las Gram negativas *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhi* (**Cuadro 6**). Estos resultados se encuentran en armonía con el efecto antimicobacteriano previamente demostrado por el extracto (Figueroa, 2004).

Cuadro 6. Concentraciones críticas inhibitorias (CCI) del extracto y aceite esencial de *A. toluensis*.

Microorganismo de prueba	Concentración Crítica Inhibitoria (µg/disco)	
	Extracto orgánico	Aceite esencial
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	49.6	251.8
<i>Bacillus subtilis</i> ²	138.5	498.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ³	> 1000	750.9
<i>Salmonella typhi</i> ⁴	> 1000	750.6
<i>Escherichia coli</i> ³	> 1000	739.3

Controles positivos: ¹Amikacina, ²Vancomicina, ³Gentamicina, ⁴Ciprofloxacina

4.2.2 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIESPASMÓDICO DEL EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL DE *A. toluensis* SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA E INDUCIDA EN ÍLEON AISLADO DE COBAYO

Para determinar el efecto antiespasmódico del extracto y aceite esencial se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero se evaluó el efecto de los preparados sobre la inhibición de la contracción espontánea del íleon de cobayo (**Figura 8**). En el segundo se determinó la acción del aceite y el extracto sobre las contracciones inducidas por diferentes agentes espasmógenos [acetilcolina (1×10^{-4} M), histamina (1×10^{-3} M), serotonina (1×10^{-4} M) y BaCl₂ (1×10^{-2} M); **Figura 9**]. La finalidad de este segundo grupo de experimentos fue iniciar el estudio del probable modo de acción tanto del aceite como del extracto íntegro.

De acuerdo a los resultados que se ilustran en el **Cuadro 7**, el aceite induce una inhibición significativa y dependiente de la concentración de las contracciones espontáneas del íleon de cobayo. Esta relajación provocada por el aceite esencial, si bien fue importante, resultó un tanto menor que la de la papaverina, alcaloide utilizado como control positivo (**Gráfica 6**).

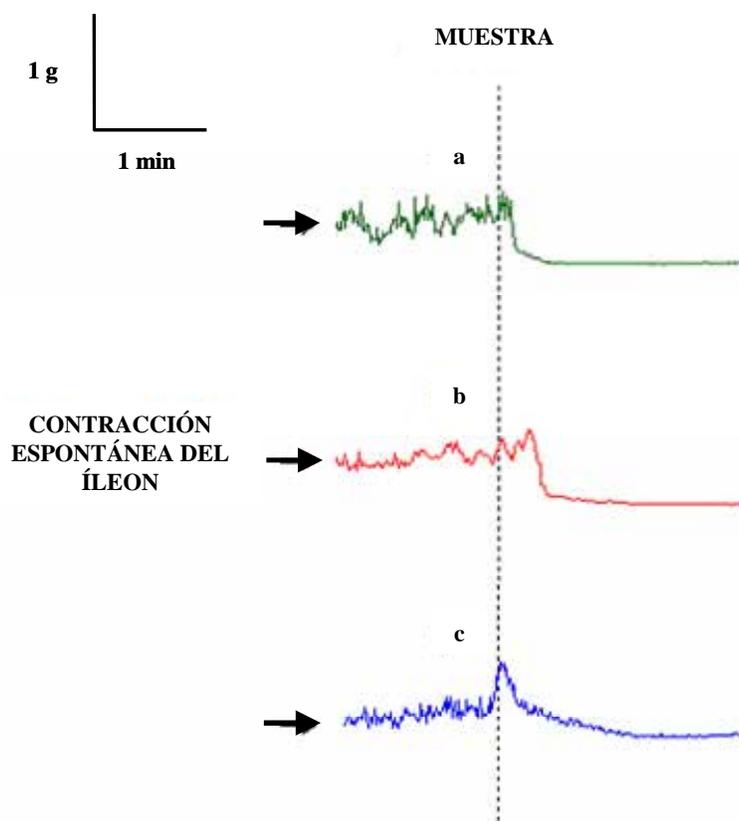


Figura 8. Registro representativo del efecto de la a) papaverina, b) aceite esencial y c) extracto orgánico sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

Cuadro 7. Concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) y efecto máximo a la concentración de $10^3 \mu\text{g/mL}$ ($E_{\text{máx}}$ [$10^{-3} \mu\text{g/mL}$]) obtenidos para el extracto orgánico, aceite esencial y papaverina sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo.

Muestra evaluada	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm EEM	$E_{\text{máx}}$ ($10^{-3} \mu\text{g/mL}$) \pm EEM
Extracto orgánico	1153.1 ± 753.5	$46.7^* \pm 4.1$
Aceite esencial	116.4 ± 23.2	$86.5^* \pm 3.8$
Papaverina ^a	35.0 ± 31.4	$100.0^* \pm 0.0$

^aControl positivo, *existe diferencia significativa de $p < 0.05$ con respecto al control

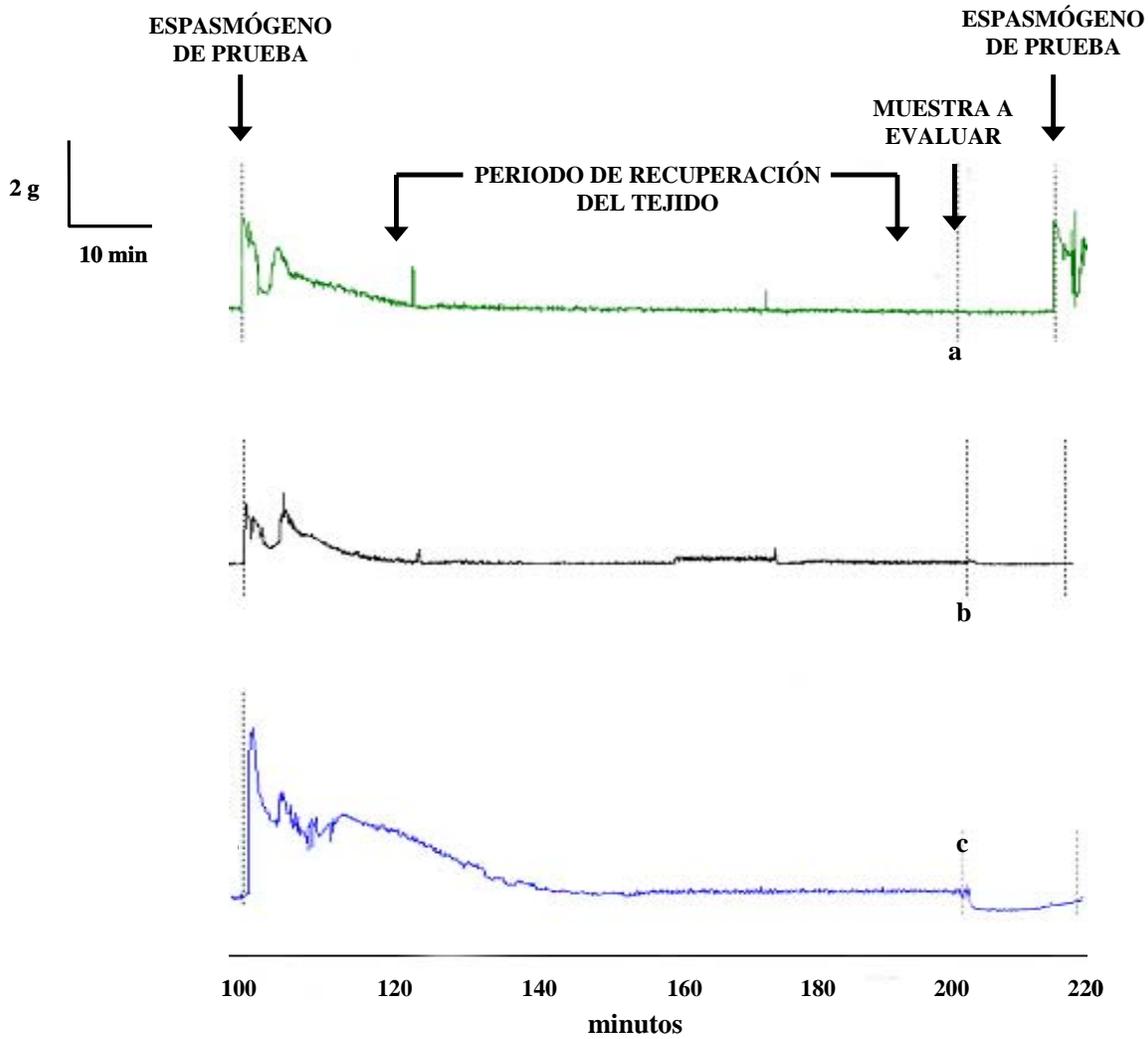
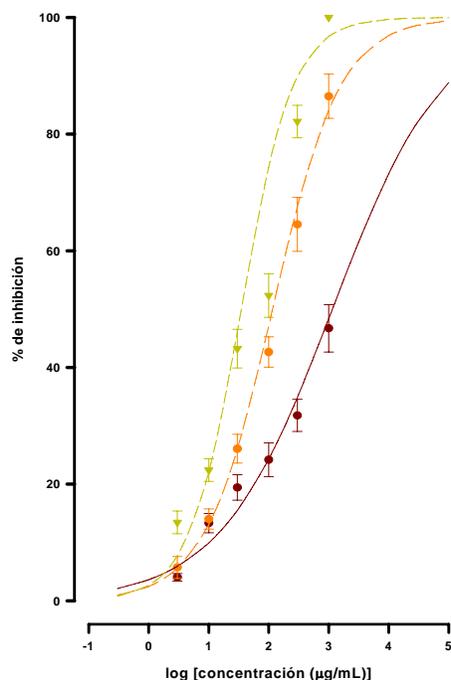


Figura 9. Registro típico representativo del efecto del a) blanco de disolvente, b) extracto orgánico y c) aceite esencial sobre las contracciones inducidas por los espasmógenos de prueba sobre el íleon aislado de cobayo.



Gráfica 6. Curvas de concentración-respuesta que muestran el efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de la papaverina (▼), aceite esencial (●) y extracto orgánico (●).

El efecto antiespasmódico del extracto y aceite esencial se evaluó también después de un tratamiento inicial del tejido con acetilcolina, histamina, serotonina y $BaCl_2$, en experimentos separados. La selección de acetilcolina, histamina y serotonina como agonistas se debe a que los mismos desencadenan los procesos de transducción de señales que involucran a los receptores membranales acoplados a las proteínas G. Estos agonistas, al unirse a su receptor, promueven la hidrólisis del fosfatidil-4,5-difosfato (PDP) por acción de la fosfolipasa C y, así, generar diacil glicerol (DG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3). Este último promueve la liberación de calcio, necesario para la contracción del músculo liso gastrointestinal (**Figura 10**; Lecci *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 1996; Katzung, 1992, 2002; Kating y Trevor, 1998; Samuelsson, 1991). El cloruro de bario se utilizó para corroborar la posible interferencia de los dos preparados en el transporte y/o metabolismo de calcio en la célula muscular, debido a que el bario, de manera similar al calcio, activa las proteínas contráctiles del músculo (Webb, 2003). Asimismo, se sabe que el cloruro de bario ocasiona una despolarización de la membrana celular del músculo, originando la activación

de los canales de calcio voltaje-dependientes, con el subsiguiente aumento de la entrada de calcio a la célula. El aumento intracelular de la concentración de calcio provoca también un incremento de la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (REL) (Van Den Broucke y Lemli, 1982; Capasso *et al.*, 1991). Cualquier producto que interfiera con esta secuencia de eventos provoca una relajación de la musculatura lisa gastrointestinal.

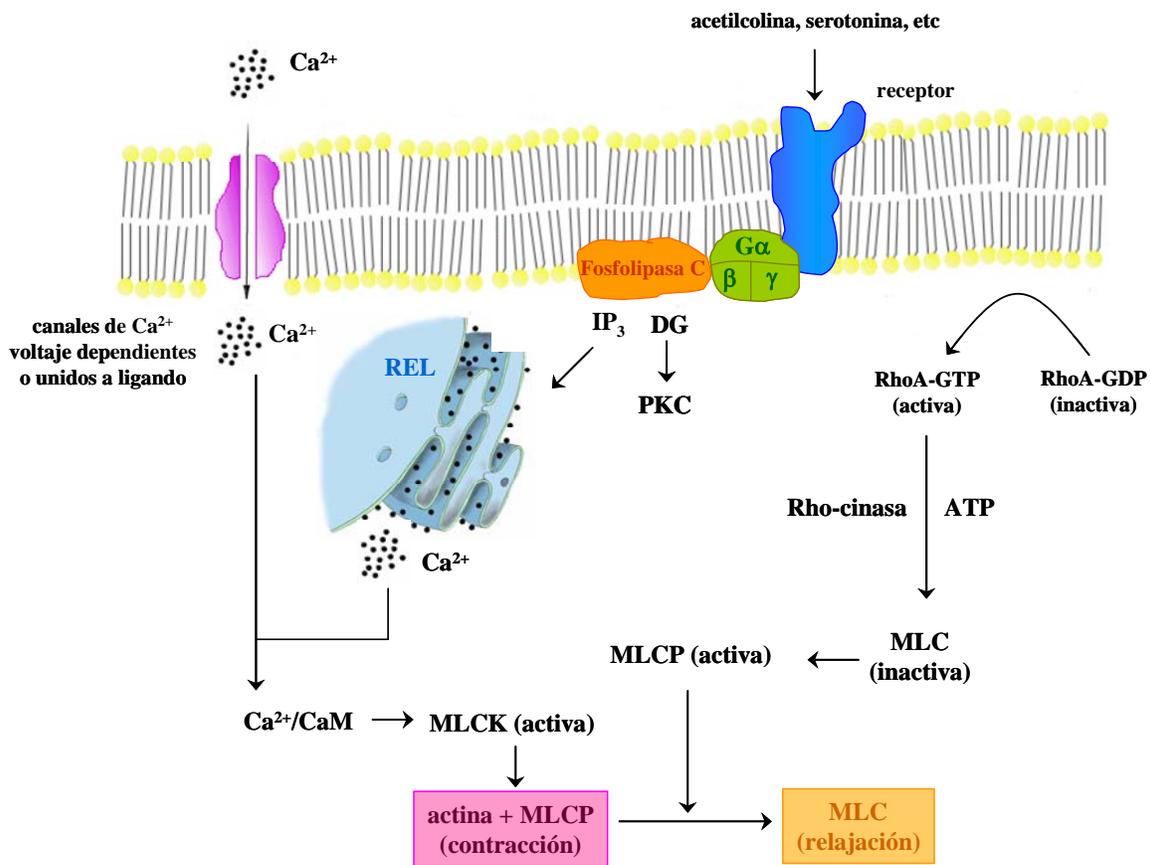


Figura 10. Transducción de señales en el músculo liso visceral.

Los tratamientos con el aceite y el extracto orgánico de *A. toluensis* provocaron un efecto antagónico significativo de las contracciones inducidas por los espasmógenos seleccionados (Cuadro 8; Gráfica 7). La acción sobre las contracciones provocadas por serotonina fue la más importante; este neurotransmisor es relevante para la regulación de la

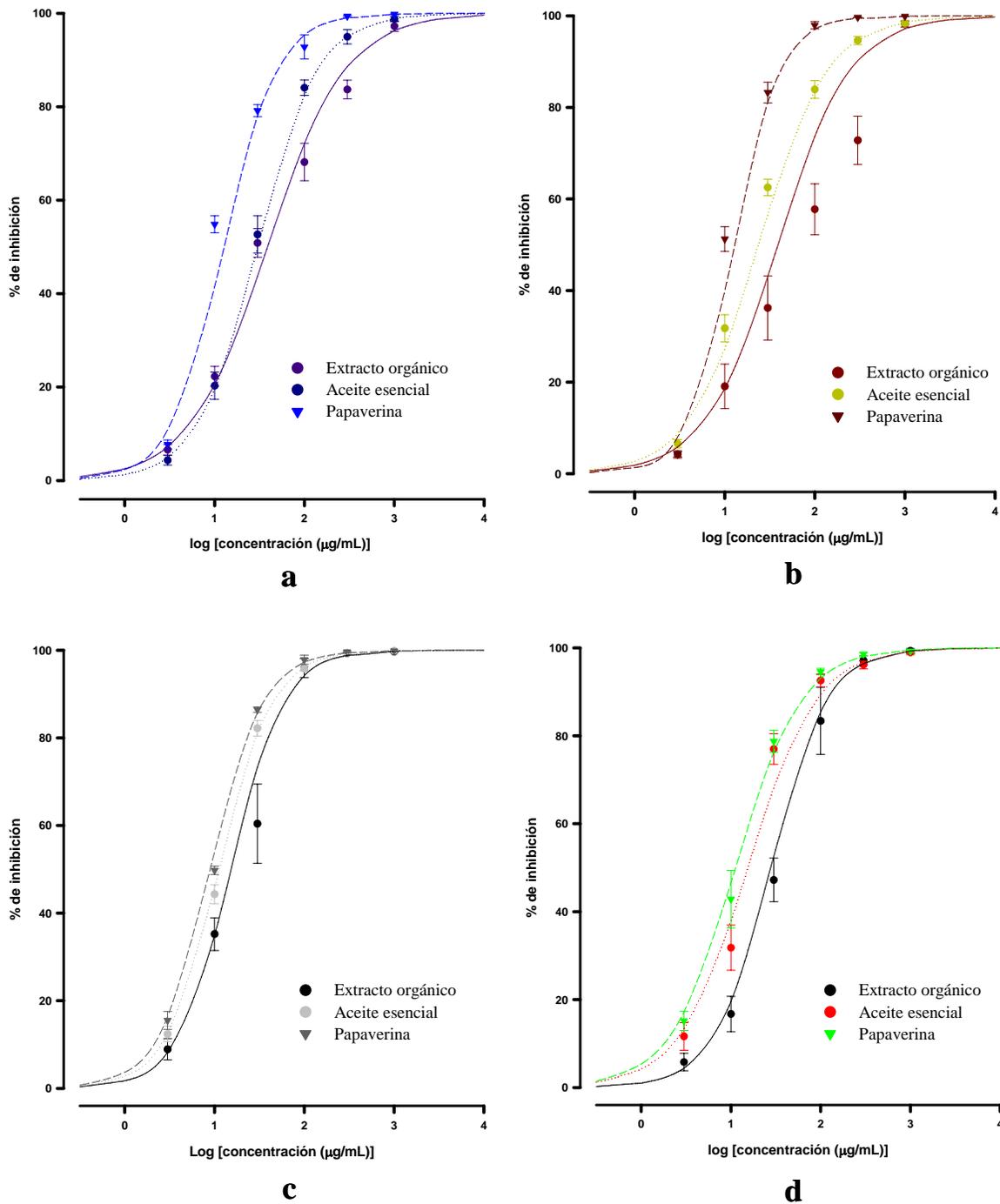
motilidad colónica, secreción de HCl, agua y electrolitos, así como, la relajación del tono fundal, por mencionar algunas (Foxx-Orenstein *et al.*, 1996; Spiller, 2002; Baxter *et al.*, 1991).

Cuadro 8. Concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀) y efecto máximo a la concentración de 10³ µg/mL (E_{máx} [10⁻³ µg/mL]) obtenidos para el extracto orgánico, aceite esencial y papaverina sobre las contracciones inducidas en íleon aislado de cobayo por los diferentes espasmógenos.

Muestra evaluada	CI ₅₀ (µg/mL) ± EEM			
	acetilcolina (1 × 10 ⁻⁴ M)	histamina (1 × 10 ⁻³ M)	serotonina (1 × 10 ⁻⁴ M)	BaCl ₂ (1 × 10 ⁻² M)
Extracto orgánico	38.7 ± 12.3	53.4 ± 32.5	15.2 ± 5.1	27.8 ± 5.0
Aceite esencial	30.0 ± 2.8	23.7 ± 5.0	11.1 ± 1.5	15.4 ± 4.9
Papaverina^a	12.7 ± 4.1	12.8 ± 4.3	9.0 ± 1.8	11.3 ± 3.2
	E _{máx} (10 ⁻³ µg/mL) ± EEM			
Extracto orgánico	97.2* ± 1.1	98.2* ± 0.7	99.7* ± 0.1	99.3* ± 0.5
Aceite esencial	98.8* ± 0.6	98.4* ± 0.4	98.8* ± 0.1	98.9* ± 0.5
Papaverina^a	100.0* ± 0.0	100.0* ± 0.0	100.0* ± 0.0	100.0* ± 0.0

^a Control positivo, * existe diferencia significativa de p<0.05 con respecto al control

El conjunto de resultados recién descritos sugiere que los preparados de *A. tolucensis* provocan su efecto relajante de la musculatura lisa a través de un mecanismo inespecífico que involucra la inhibición de la entrada de calcio a la célula. También es posible que el modo de acción involucre una inhibición de los procesos de transducción de señales regulados por el ión calcio o de las proteínas que participan en el proceso de contracción.



Gráfica 7. Curvas concentración-respuesta que muestran el efecto inhibitorio del extracto orgánico, aceite esencial y papaverina de las contracciones inducidas por los espasmógenos **a)** acetilcolina (1×10^{-4} M), **b)** histamina (1×10^{-3} M), **c)** serotonina (1×10^{-4} M) y **d)** BaCl_2 (1×10^{-2} M).

4.3 INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA DE LA ESPECIE *Arracacia toluensis* (H. B. K.) Hemsl. var. *multifida* (S. Wats.) Math. & Const. (Umbelliferae)

Con la finalidad de completar el estudio químico de la especie y establecer los parámetros de identidad y composición para el control de calidad de la droga cruda, se realizó una reinvestigación química del material vegetal proveniente de una nueva recolecta de la planta. Para ello, el extracto orgánico (160 g) se sometió a un fraccionamiento primario mediante una CCA utilizando gel de sílice como fase estacionaria, como se indicó en la parte experimental. Este proceso permitió la obtención de siete fracciones primarias (**Cuadro 4**).

De la fracción **F₁** cristalizó de manera espontánea un compuesto identificado como la isoimperatorina (**1**). De manera adicional, la purificación por CLAE (**Figura 11**) de la fracción primaria **F₁** (1.5 g) permitió el aislamiento de dos cumarinas identificadas como el ostol (**2**) y la suberosina (**3**), con un rendimiento en relación al peso seco del material vegetal de 0.005 y 0.0015 %, respectivamente.

El fraccionamiento por CCA de la fracción **F₂** (2.0 g) generó cinco fracciones secundarias. De la fracción secundaria **F_{2-II}** se purificó, mediante una CCFP, la escoparona (**6**) con un rendimiento del 0.00085 %. La purificación por CLAE de la fracción **F_{2-III}** (**Figura 12**), permitió el aislamiento de tres cumarinas identificadas como el 8-MOP (**4**), la herniarina (**5**) y la isoimperatorina (**1**). Los rendimientos de estos compuestos en relación al peso seco del material vegetal son los siguientes: 0.0035, 0.0005 y 0.0275 %, respectivamente.

La resolución de la fracción primaria **F₄** mediante CCA y CCFP permitió el aislamiento de las cumarinas umbeliferona (**7**) y dihidrooxipeucedanina (**8**) con un rendimiento de 0.00175 y 0.00125 %, respectivamente.

Por último, la purificación de los compuestos presentes en la fracción **F₅** se realizó mediante el empleo de las técnicas cromatográficas convencionales (CCA, CCFP y CLAE). Este proceso permitió el aislamiento de tres cumarinas adicionales identificadas como la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**; **Figura 13**), el 5-MOP (**9**) y la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**). Los rendimientos de estos compuestos en relación al peso seco del material vegetal son los siguientes: 0.0006, 0.001 y 0.00125 %, respectivamente.

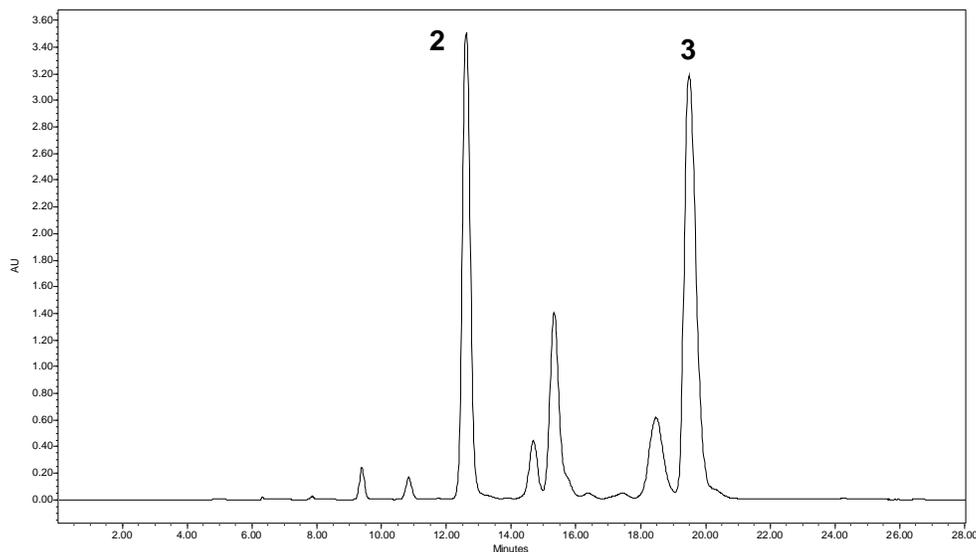


Figura 11. Cromatograma de la fracción primaria F_1 . Condiciones de análisis: Detector UV, 270 nm. Sistema de elución: Hex- CH_2Cl_2 -AcOEt (75:25:5). Flujo de 0.5 mL/min. Concentración 0.1 mg/50 μ L. Pico: **2** (t_R 12.61 min) y **3** (t_R 19.50 min).

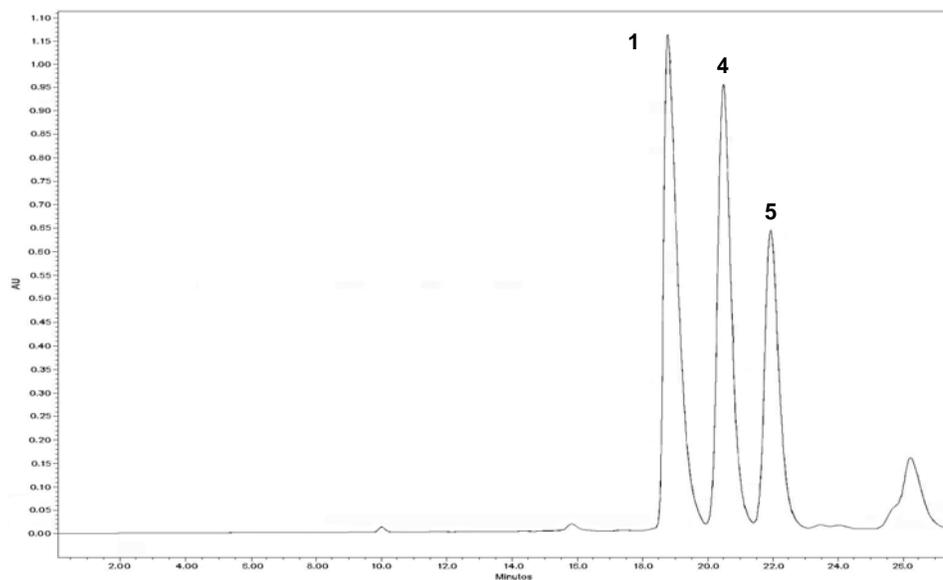


Figura 12. Cromatograma de la fracción secundaria F_{2-III} . Condiciones de análisis: Detector UV, 270 nm. Sistema de elución: CH_2Cl_2 -MeOH (99:1). Flujo de 0.35 mL/min. Concentración 0.1 mg/50 μ L. Pico: **1** (t_R 18.76 min); **4** (t_R 20.48 min) y **5** (t_R 21.94 min).

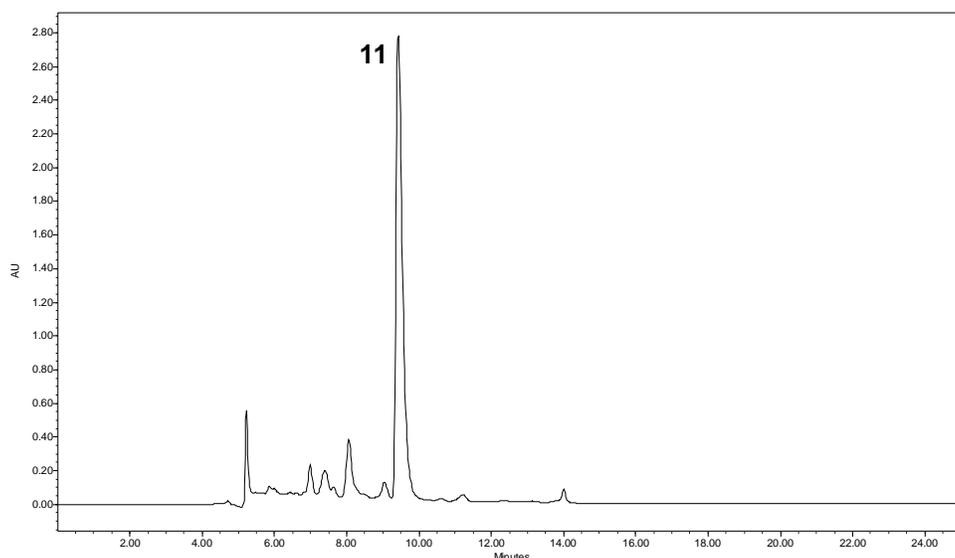


Figura 13. Cromatograma de la fracción primaria **F**_{5-II}. Condiciones de análisis: Detector UV, 270 nm. Sistema de elución: Hex-CH₂Cl₂-AcOEt (40:30:30). Flujo de 0.5 mL/min. Concentración 0.25 mg/50 μ L. Pico: **11** t_R (9.49 min).

4.3.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS CUMARINAS AISLADAS DE *A. toluensis*

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos obtenidos en el presente estudio se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

De las once cumarinas obtenidas a partir de *A. toluensis* en la presente investigación, los compuestos **1-8** se identificaron mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de muestras auténticas. En consecuencia, en la presente sección se discutirán únicamente la elucidación estructural de las cumarinas sencillas, 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**) y 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**) y de la furanocumarina, 5-MOP (**9**).

4.3.1.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA 7-METOXI-6-HIDROXI CUMARINA (10) Y LA 6-METOXI-7-HIDROXI CUMARINA (11)

Los productos **10** y **11** se aislaron como sólidos blancos con puntos de fusión 178-180 °C y 230-232 °C, respectivamente. Los espectros en el IR de los dos compuestos presentan bandas de absorción asociadas a grupos carbonilo de α -pirona (1721 cm^{-1}), dobles enlaces (1603 , 1250 , 1075 y 836 cm^{-1}) y grupos fenólicos (3284 cm^{-1}). La EMIE permitió determinar la fórmula molecular de cada compuesto como $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_4$. Esta fórmula permite siete grados de insaturación. El ión molecular observado en una relación de masa-carga (m/z) de 192 uma (pico base), sugiere que estos productos son isómeros estructurales.

Los espectros de RMN (**Cuadros 9** y **10**) de los productos **10** y **11**, al igual que los de la escoparona (**6**), presentaron el perfil típico de una cumarina simple sustituida en las posiciones C-6 y C-7 (Estevez-Braun y González, 2002). La principal diferencia entre los espectros de RMN de los productos **10** y **11** con respecto a los del producto **6**, radica en la presencia de señales para un grupo hidroxilo ($\delta_{\text{H}} \sim 6.1$) y un solo grupo metoxilo ($\delta_{\text{H}} \sim 3.98$), en lugar de los dos grupos metoxilo observados en los espectros de la escoparona (**6**). En consecuencia, la diferencia entre **10** y **11** consiste en la ubicación de los grupos metoxilo e hidroxilo en el anillo carbocíclico. En el caso del compuesto **11**, los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY para los hidrógenos en C-5 (H-5/CH₃O-6 y H-4) y C-8 (H-8/OH-7) permitieron confirmar que los grupos metoxilo e hidroxilo se encontraban en las posiciones C-6 y C-7 del núcleo base, respectivamente (**Figura 14**). Por el contrario, en el caso del compuesto **10**, las correlaciones observadas en el espectro NOESY para los hidrógenos en C-5 (H-5/H-4 y OH-6) y C-8 (CH₃O-7/H-8) son congruentes con la ubicación del grupo hidroxilo en C-6 y el grupo metoxilo en C-7.

Estas observaciones permitieron caracterizar a los productos **10** y **11** como la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina y la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina, respectivamente.

Cuadro 9. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ^1H de las cumarinas escoparona (**6**), 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**) y 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**).

POSICIÓN	escoparona (6)	7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10)	6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)
3	6.29 (d, $J = 9.3$ Hz)	6.27 (d, $J = 9.6$ Hz)	6.29 (d, $J = 9.6$ Hz)
4	7.63 (d, $J = 9.5$ Hz)	7.60 (d, $J = 9.6$ Hz)	7.59 (d, $J = 9.6$ Hz)
5	6.86 (s)	6.85 (s)	6.97 (s)
8	6.85 (s)	6.92 (s)	6.84 (s)
CH₃O-6	3.93 (s)	3.96 (s)	-
OH-6	-	-	5.54 (sa)
CH₃O-7	3.96 (s)	-	3.98 (s)
OH-7	-	6.15 (sa)	-

Cuadro 10. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ^{13}C de las cumarinas escoparona (**6**), 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**) y 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**).

POSICIÓN	escoparona (6)	7-metoxi-6-hidroxi cumarina (10)	6-metoxi-7-hidroxi cumarina (11)
2	161.38	161.47	160.50
3	113.57	113.40	113.98
4	143.26	143.31	143.29
4a	111.43	111.48	111.04
5	107.96	107.44	107.4
6	150.04	150.23	149.28
7	146.35	149.65	143.29
8	100.03	103.17	99.34
8a	152.86	150.23	149.28
CH₃O-6	-	-	52.44
CH₃O-7	56.36	56.39	-

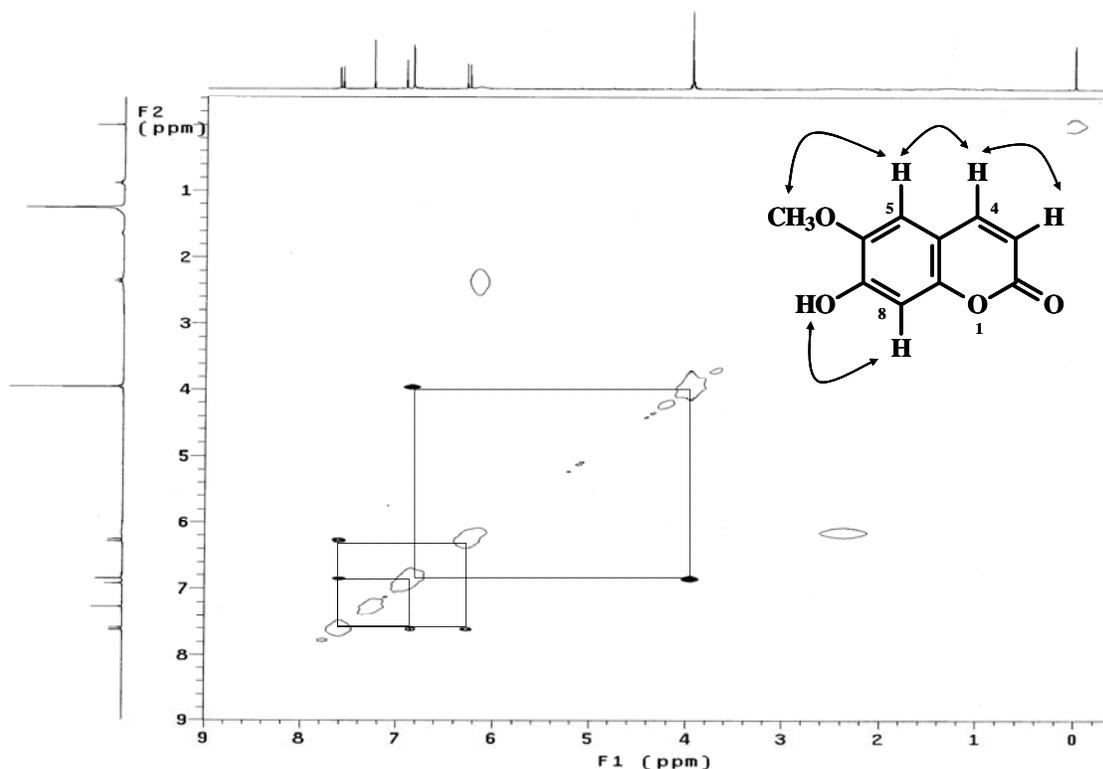


Figura 14. Espectro NOESY de la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

4.3.1.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LA FURANOCUMARINA 5-MOP (**9**)

El análisis detallado de los espectros de RMN del producto **9** permitió establecer que es una furanocumarina lineal (Ivie, 1978; Harkar *et al.*, 1984). Este compuesto se obtuvo como un sólido blanco, con un punto de fusión de 187-188 °C. El ión molecular en el EMIE del producto natural corresponde a la fórmula $C_{12}H_8O_4$, la cual permite nueve insaturaciones. El análisis detallado de los espectros de RMN (**Cuadros 11** y **12**) del compuesto **9**, mostró que estos son muy similares a los del 8-MOP (**4**), difiriendo fundamentalmente en los desplazamientos químicos atribuibles a la porción furano [δ_H 7.02 (dd, $J = 1.0, 2.4$, H-3') y 7.59 (d, $J = 2.4$, H-2')] , y en las correlaciones observadas en el espectro NOESY para los hidrógenos en C-3 (H-3/H-4), C-4 (H-4/OCH₃), y en C-3' (H-3'/H-2'; **Figura 15**). Estas son consistentes con la presencia del metoxilo en C-5 y el anillo

de furano fusionado entre C-6 y C-7. Por lo tanto, el compuesto se caracterizó como el 5-MOP (9).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹H de las cumarinas 5-MOP (9) y 8-MOP (4).

POSICIÓN	8-MOP (4)	5-MOP (9)
3	6.30 (d, <i>J</i> = 94 Hz)	6.27 (d, <i>J</i> = 9.78 Hz)
4	7.7 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz)	8.15 (dd, <i>J</i> = 0.66, 9.78 Hz)
5	7.36 (s)	-
8	-	7.14 (dd, <i>J</i> = 0.68, 1.0 Hz)
2'	7.70 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	7.59 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz)
3'	6.83 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	7.02 (dd, <i>J</i> = 1.0, 2.4 Hz)
CH ₃ O-	4.31 (s)	4.27 (s)

Cuadro 12. Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN ¹³C de las cumarinas 5-MOP (9) y 8-MOP (4).

POSICIÓN	8-MOP (4)	5-MOP (9)
2	160.45	161.25
3	114.75	112.54
4	144.32	139.28
4a	116.47	106.39
5	112.88	149.55
6	126.11	112.65
7	147.66	158.36
8	132.79	93.84
8a	144.76	152.69
2'	146.63	144.78
3'	106.71	105.03
CH ₃ O-	61.34	60.10

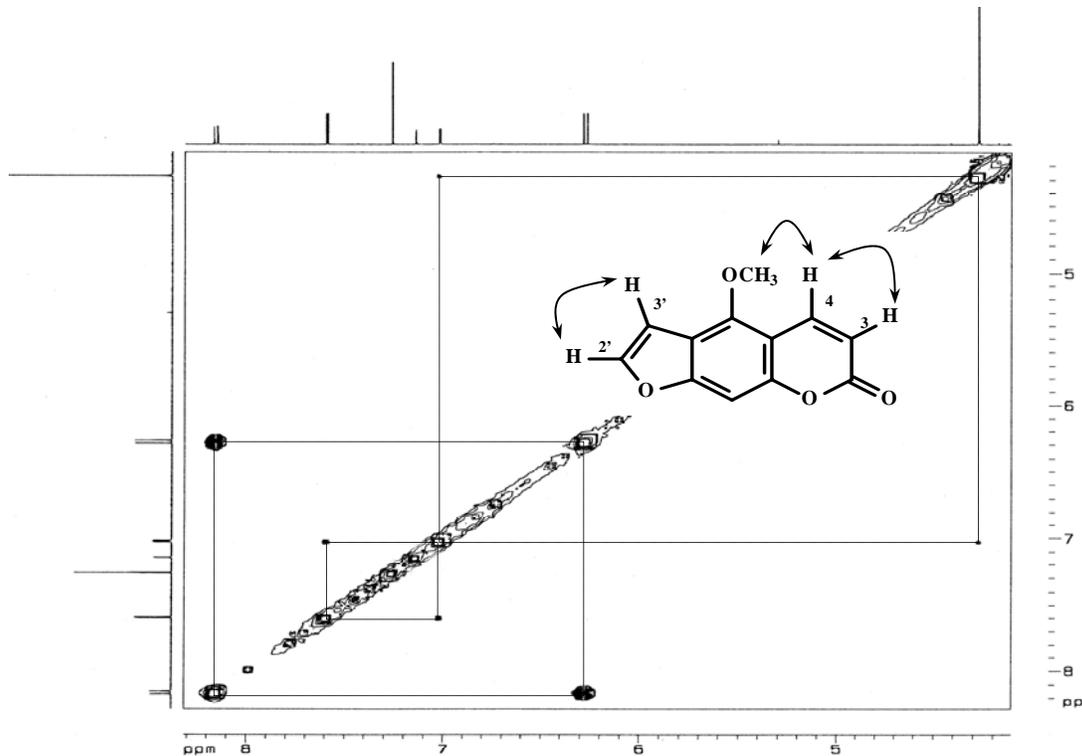


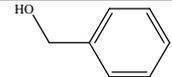
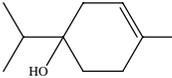
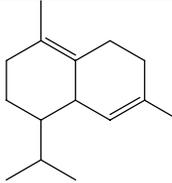
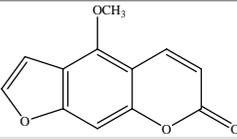
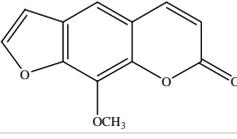
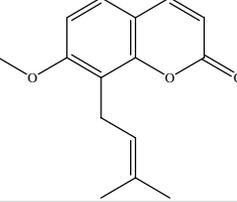
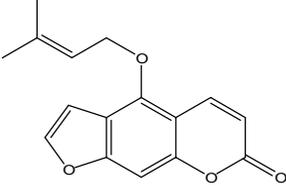
Figura 15. Vista parcial del espectro NOESY del 5-MOP (**9**) mostrando las correlaciones señaladas en la estructura.

4.3.2 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS PARTES AÉREAS DE *A. toluensis*

El análisis por CG-EM del aceite esencial, preparado a partir de las partes aéreas de *A. toluensis* por hidrodestilación, permitió la identificación de siete metabolitos secundarios que constituyen el 45.8 % del total del aceite esencial (**Figura 16; Cuadro 13**). La identificación de los compuestos alcohol bencílico (**12**), terpinen-4-ol (**13**) y α -cadineno (**14**) se realizó por coelución con muestras auténticas adquiridas comercialmente. Los productos **2**, **3**, **4** y **9** se identificaron por coelución con las cumarinas obtenidas previamente del estudio del extracto íntegro. Así mismo, se realizó la comparación de los espectros de masas de los compuestos presentes en la esencia con aquellos de los compuestos de referencia incluidos en la biblioteca de datos del equipo. Los resultados de

este análisis permitieron identificar a las cumarinas ostol (**2**; 21.69 %) y suberosina (**3**; 10.65 %), como los componentes mayoritarios presentes en la esencia de *A. toluensis*.

Cuadro 13. Compuestos identificados en el aceite esencial de *A. toluensis* por cromatografía de gases.

COMPUESTO	t _R (min)	ESTRUCTURA	COMPOSICIÓN (%)/ FÓRMULA MOLECULAR
alcohol bencílico (12)	9.13		3.20/C ₇ H ₈ O
terpinen-4-ol (13)	11.66		2.54/C ₁₀ H ₁₈ O
α-cadineno (14)	16.24		2.16/C ₁₅ H ₂₄
5-MOP (9)	23.27		1.98/C ₁₂ H ₈ O ₄
8-MOP (4)	23.46		3.54/C ₁₂ H ₈ O ₄
ostol (2)	24.18		21.69/C ₁₅ H ₁₆ O ₃
suberosina (3)	24.84		10.65/C ₁₅ H ₁₆ O ₃

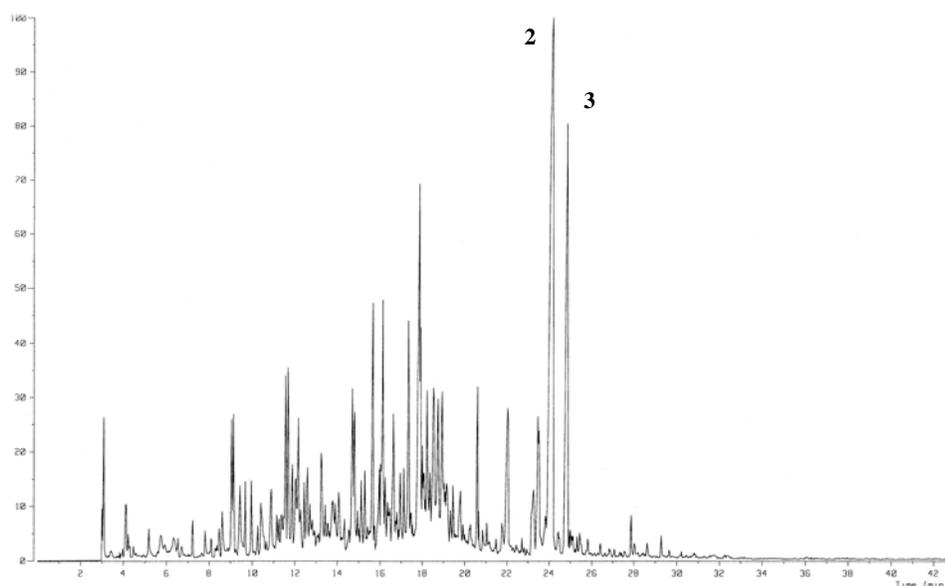


Figura 16. Cromatograma del aceite esencial de *A. toluensis* obtenido por cromatografía de gases.

4.4 CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad que se aplican a las drogas crudas involucran los ensayos de identidad, pureza y composición (FHEUM, 2001; WHO, 1998).

4.4.1 ENSAYOS DE IDENTIDAD Y COMPOSICIÓN

Los ensayos de identidad permiten la identificación oficial de las drogas crudas. Cuando se conoce la composición química de las drogas es posible establecer su (s) compuesto (s) marcador (es) y perfil (es) cromatográfico (s), que a menudo constituyen las pruebas de identidad más utilizadas. Los compuestos marcadores son sustancias químicamente definidas o grupos de sustancias de utilidad analítica, aunque idealmente deberían de constituir a los principios activos. Otras pruebas de identidad importantes son las botánicas, tanto macroscópicas como microscópicas. Estas últimas son importantes cuando las drogas crudas se expenden en mezclas.

En el presente trabajo se establecieron los perfiles cromatográficos por CLAE de un extracto íntegro provenientes de dos recolectas de la planta.

El perfil de los extractos orgánicos, así como, del extracto enriquecido con los compuestos **1**, **2**, **4** y **9** se indica en la **Figura 17** y se obtuvo por ensayo y error. Desde el punto de vista analítico, este perfil tiene las ventajas siguientes: el tiempo de corrida es corto y las fases utilizadas, (estacionaria y móvil), son económicas. Este análisis permitió establecer que la isoimperatorina (**1**), el ostol (**2**), el 8-MOP (**4**) y el 5-MOP (**9**) constituyen los compuestos marcadores para la identificación de la especie *A. toluensis* (**Cuadro 14**).

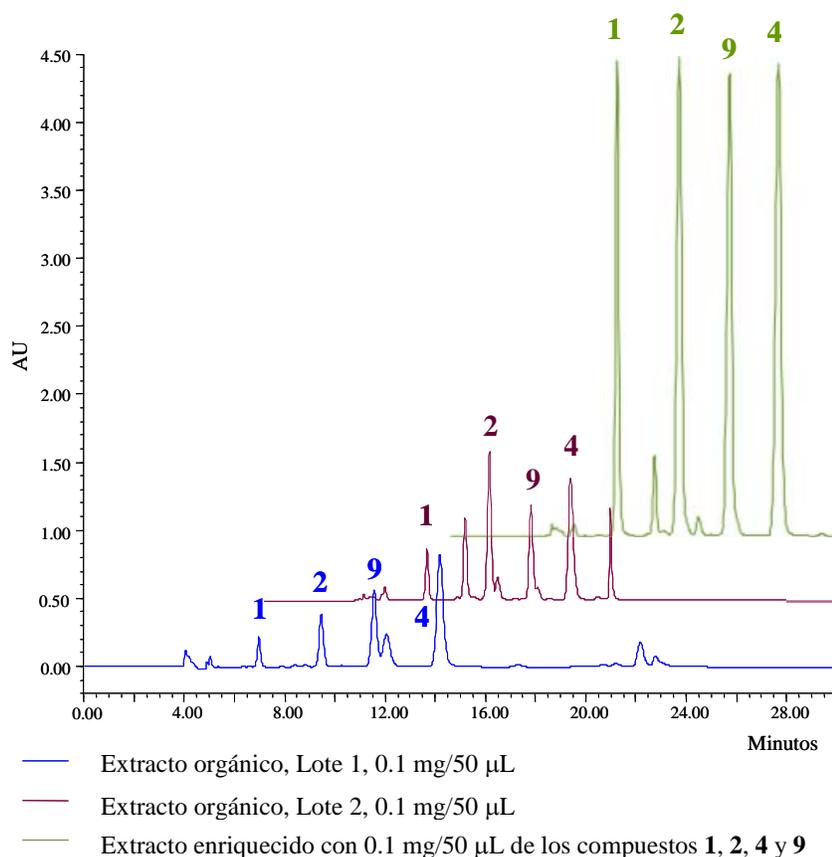


Figura 17. Cromatograma de los extractos orgánicos de *A. toluensis* (lote 1 y 2) obtenido por CLAE. Fase móvil: sistema isocrático ternario constituido por hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (80:7:13), velocidad de flujo 0.6 mL/min. Fase estacionaria: columna Nova-Pak® Silica (Waters, tamaño de partícula de 6 µm), de 3.9 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud.

Cuadro 14. Compuestos identificados en los extractos orgánicos de *A. toluensis* (lote 1 y 2) por CLAE.

COMPUESTO	t _R (min)	COMPOSICIÓN (%)	
		Lote 1	Lote 2
isoimperatorina (1)	6.78	6.81	8.57
ostol (2)	9.14	6.17	10.93
5-MOP (9)	11.01	27.79	19.13
8-MOP (4)	13.02	33.02	27.40

4.4.1.1 ENSAYOS DE COMPOSICIÓN

Los ensayos de composición permiten determinar cuantitativamente el contenido de principios activos y/o marcadores. Este parámetro resulta fundamental no sólo para la calidad de las drogas crudas, sino también para la elaboración de preparados estandarizados. En el presente estudio se desarrolló un método por CLAE, tomando como base los perfiles establecidos durante el desarrollo de las pruebas de identidad.

Una vez desarrollado el método de análisis, de manera general, para la valoración cuantitativa de una sustancia o un grupo de sustancias mediante CLAE, es necesario, en primer lugar, determinar el área bajo la curva (ABC) de los picos generados por una serie de soluciones de concentraciones conocidas del analito, en este caso de las cumarinas isoimperatorina (1), ostol (2), 8-MOP (4) y 5-MOP (9), que al ser los principios activos de la planta son los marcadores adecuados. Los resultados derivados de esta determinación permiten la construcción de las curvas de calibración, que serán de utilidad para determinar la concentración de la muestra (s) objeto (s) de análisis. Si el método de detección de los componentes seleccionados presentes en el extracto implica la espectroscopia UV, es necesario establecer sus máximos de absorción a una longitud de onda determinada, mismos que deben ser específicos para los analitos elegidos.

Una vez establecido el procedimiento para cuantificar los principios activos, el método debe de ser validado. Las características típicas de la validación son: linealidad, precisión, exactitud y especificidad.

4.4.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.4.2.1 SELECTIVIDAD

La selectividad del método propuesto se demostró mediante la obtención de los espectros de absorción al UV-Visible del extracto orgánico de la especie *A. tolucensis* y del extracto enriquecido con los compuestos de interés. Los resultados se ilustran en las **Figuras 18 y 19**.

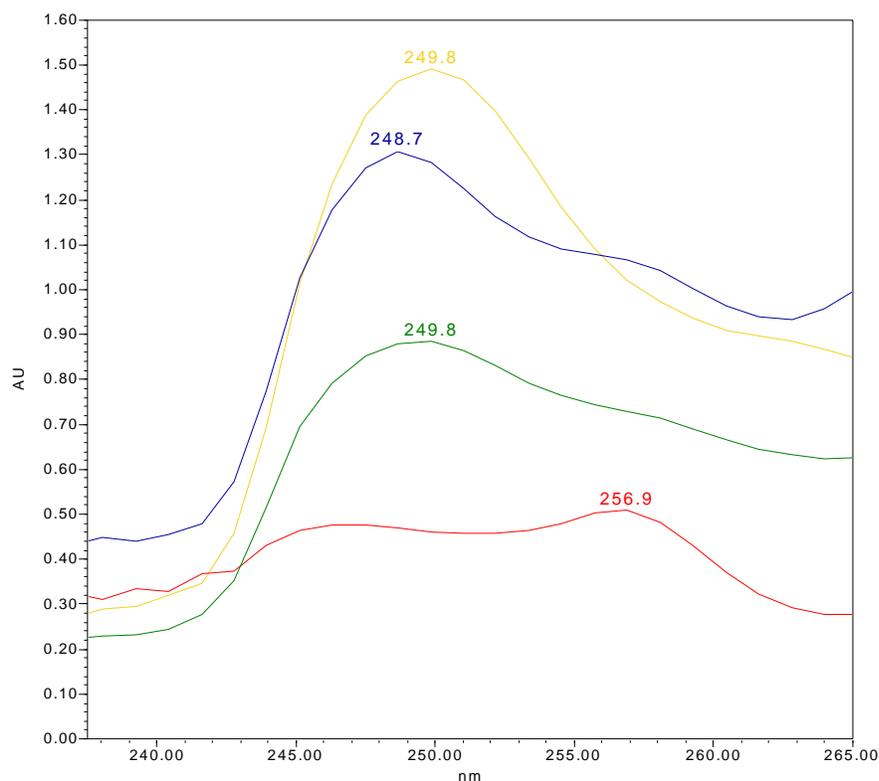


Figura 18. Espectros UV obtenidos a partir del extracto orgánico de *A. tolucensis*. Detector: PDA 996. Fase móvil: Hex-CH₂Cl₂-AcOEt (80:7:13). Tiempos de retención, $\lambda_{\text{máx}}$: (—) 6.968 min, 249.8 nm (**1**), (—) 9.344 min, 256.9 nm (**2**), (—) 11.616 min, 248.7 nm (**9**) y (—) 13.510 min, 249.8 nm (**4**).

Como se puede observar en la **Figura 19**, la adición de 0.01 mg de los analitos **1**, **2**, **4** y **9** a una muestra que contenía 0.1 mg del extracto orgánico, produjo un incremento de la absorbancia sin modificar los máximos de absorción. Estos resultados nos indican que el

incremento de la respuesta se debe únicamente a la presencia de las cumarinas **1**, **2**, **4** y **9**. Por lo tanto el método es selectivo.

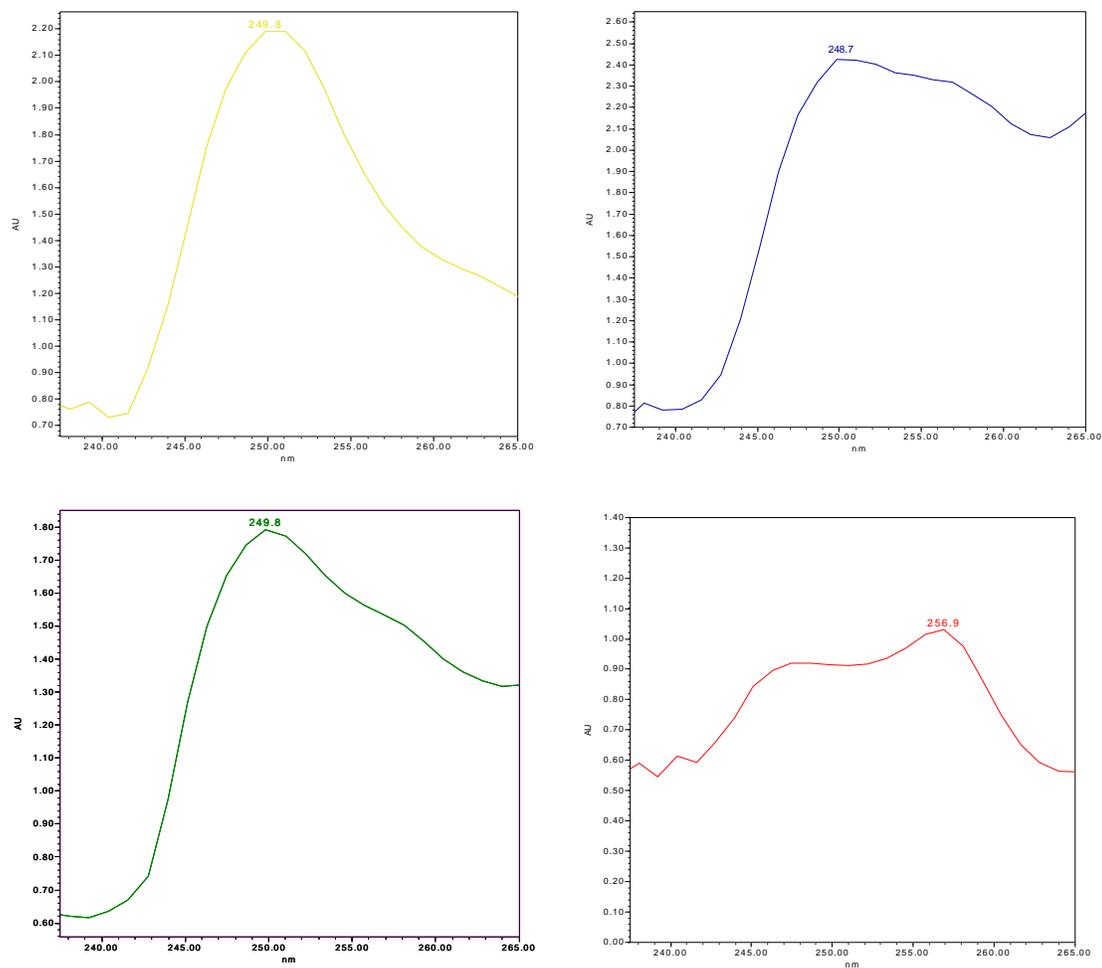


Figura 19. Espectros UV del extracto orgánico enriquecido de *A. toluensis*. Detector: PDA 996. Fase móvil: Hex-CH₂Cl₂-AcOEt (80:7:13). Tiempos de retención, $\lambda_{\text{máx}}$: (—) 6.968 min, 249.8 nm (**1**), (—) 9.344 min, 256.9 nm (**2**), (—) 11.616 min, 248.7 nm (**9**) y (—) 13.510 min, 249.8 nm (**4**).

4.4.2.2 LINEALIDAD Y EXACTITUD

La linealidad del sistema se determinó construyendo cuatro curvas de calibración, una para cada compuesto, en un rango de concentraciones entre 0.002 a 0.2 µg/µL, de acuerdo a las normas establecidas en las guías de la SFSTP e ICH, es decir, considerando la relación entre la respuesta y la concentración del analito en la muestra (Hubert *et al.*, 1999; ICHQ2A, 1998; ICHQ2B, 1998).

Los compuestos utilizados como estándares durante el desarrollo del método analítico fueron previamente aislados de la misma especie y tienen una pureza del 99 %, de acuerdo a los análisis espectroscópicos realizados. Los resultados de las curvas de calibración se resumen en el **Cuadro 15**. El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante una regresión lineal simple. El cálculo de los coeficientes de regresión se realizó mediante el programa SigmaStat.

Cuadro 15. Análisis de varianza de las curvas de calibración de las cumarinas **1, 2, 4 y 9**.

COMPUESTO	ECUACIÓN DE LA REGRESIÓN LINEAL	R ²	F
isoimperatorina (1)	ABC = 41378.633 + 134241168.640x	1	10336.551
ostol (2)	ABC = 126389.712 + 109919163.976x	1	11537.737
8-MOP (4)	ABC = 658409.435 + 165066937.174x	0.998	2573.820
5-MOP (9)	ABC = -245015.251 + 152849796.643x	0.999	3639.282

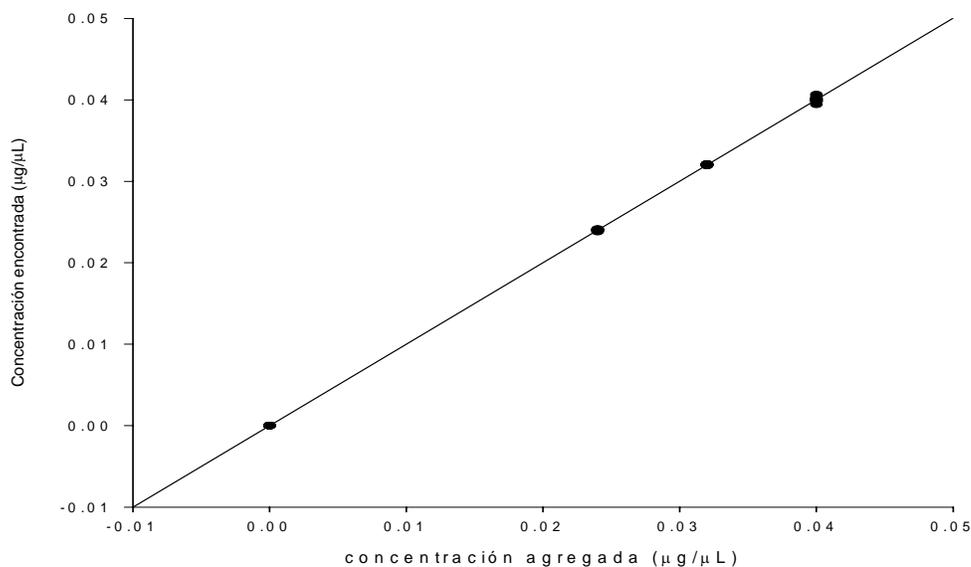
F_(0.05,1,4) = **224.583**. En todos los casos n=6

Para evaluar si las ecuaciones anteriores describen adecuadamente la relación entre las dos variables (concentración y absorbancia) y, si se pueden utilizar como líneas de predicción y estimación, se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal para cada curva. Como se desprende de los resultados indicados en el **Cuadro 15**, el parámetro F (estadístico de Fischer), calculado para cada regresión, supera su valor crítico (F_(0.05,1,4)= **224.583**), por lo tanto, la variación en la respuesta se encuentra explicada por

los modelos propuestos. Posteriormente, las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión demostraron que las pendientes de las rectas de las regresiones obtenidas son diferentes a cero y las ordenadas al origen tienen los siguientes valores: 41378.633 (**1**), 126389.712 (**2**), 658409.435 (**4**), -245015.251 (**9**).

Finalmente, los coeficientes de determinación (R^2) calculados para los compuestos **1, 2, 4 y 9 (Cuadro 15)** indican que los datos de la variable Y (ABC) correlacionan en un 100, 100, 99.8 y 99.9 %, respectivamente, con los valores de la variable aleatoria X (concentración). Con base en las evidencias presentadas anteriormente, se establece que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

La exactitud del método analítico, es decir la correspondencia entre el valor de concentración obtenido experimentalmente y el de referencia, se evaluó determinando el recobro absoluto de los analitos **1, 2, 4 y 9** incorporados al extracto a tres concentraciones diferentes (0.04, 0.032 y 0.024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), en experimentos independientes. El recobro del analito se calcula intrapolando la absorbancia de las muestras enriquecidas en las curvas de calibración construidas con los estándares seleccionados para determinar la linealidad del sistema. A continuación, se comparan los valores de concentración calculados a partir de las curvas con los valores agregados. Por último, se realiza un análisis de regresión lineal con las concentraciones de recobro para corroborar que la pendiente sea igual a 1 y el intercepto cero con un nivel de confianza mínimo del 95 % (**Gráfica 8**). Los resultados de este análisis se resumen en el **Cuadro 16**. De estos resultados se infiere que el método analítico es exacto.



Gráfica 8. Curva de linealidad y exactitud por recobro.

Cuadro 16. Recobro de las muestras estándar durante la determinación de la linealidad y exactitud del método analítico.

Concentración de analito adicionada a la matriz (µg/µL)	Concentración de analito obtenida por recobro (µg/µL)			
	isoimperatorina (1)	ostol (2)	5-MOP (9)	8-MOP (4)
0.040	0.040	0.041	0.040	0.040
0.040	0.040	0.040	0.040	0.040
0.040	0.040	0.040	0.039	0.040
0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
0.024	0.024	0.024	0.024	0.024
0.024	0.024	0.024	0.024	0.024
0.024	0.024	0.024	0.024	0.024

Linear Regression

Data source: Data 1 in Notebook2

ABC = -0.00000336 + 1.001 x

N = 48.000

R = 1.000 Rsqr = 1.000 Adj Rsqr = 1.000

Standard Error of Estimate = 0.000

	Coefficient	Std. Error	t	P	Std. Coeff.
Constant	-0.00000336	0.0000446	-0.0755	0.940	
Col 1	1.001	0.00158	635.307	<0.001	1.000

Analysis of Variance:

	DF	SS	MS	F	P
Regression	1	0.0108	0.0108	403614.918	<0.001
Residual	46	0.00000123	0.0000000267		
Total	47	0.0108	0.000229		

PRESS = 0.00000134

Durbin-Watson Statistic = 2.347 Passed

Normality Test: Failed (P = <0.001)

Constant Variance Test: Failed (P = <0.001)

4.4.2.3 PRECISIÓN

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales y usualmente se expresa en términos de desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV). La precisión se mide por el grado de reproducibilidad y/o repetición (repetibilidad) del método analítico bajo condiciones normales de análisis. De acuerdo a los resultados indicados en el **Cuadro 17**, el método analítico es preciso ($CV \leq 3\%$), ya que los valores de CV (%), tanto entre analistas como entre días de análisis, no presentaron una variación significativa.

Una vez demostrada la validez del método analítico, se procedió a cuantificar el contenido de isoimperatorina (**1**), ostol (**2**), 8-MOP (**4**) y 5-MOP (**9**) presentes en dos lotes diferentes de material vegetal. Los resultados obtenidos se indican en la **Cuadro 18**.

Cuadro 17. Valores de precisión del sistema.

COMPUESTO	Coeficiente de variación (%)		
	I ^a	II ^a	I ^b
isoimperatorina (1)	2.9	2.4	2.6
ostol (2)	2.7	3.0	2.9
5-MOP (9)	3.0	2.9	2.5
8-MOP (4)	2.7	2.3	2.7

I^a día uno, analista uno; II^a día uno, analista dos; I^b día dos, analista uno

Cuadro 18. Cuantificación de las cumarinas 1, 2, 4 y 9 por CLAE en los extractos orgánicos (lote 1 y 2) de *A. toluensis*.

COMPUESTO	CANTIDAD DE ANALITO			
	Lote 1		Lote 2	
	µg	%	µg	%
isoimperatorina (1)	0.04	4.1	0.07	6.9
ostol (2)	0.13	12.9	0.30	30.1
5-MOP (9)	0.22	22.1	0.20	20.3
8-MOP (4)	0.17	16.7	0.15	15.3

4.5 RESULTADOS ADICIONALES

4.5.1 EFECTO DE LOS PRODUCTOS NATURALES SOBRE LA ENZIMA PDE1 DEPENDIENTE DE CALMODULINA (CaM)

En la presente investigación no se evaluó el efecto antiespasmódico, ni antimicrobiano de los productos aislados, debido a que estas propiedades se encuentran bien documentadas en la literatura especializada para las cumarinas mayoritarias obtenidas en este estudio (Hoult y Paya, 1996; Ojala *et al.*, 2000; Estevez-Braun y González, 2002; De Souza *et al.*, 2005). En particular, los estudios sobre el ostol (2) son bastante extensos. De tal forma que este compuesto provoca la relajación del músculo liso gastrointestinal y de las vías respiratorias (Teng *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1993; Ko *et al.*,

1992; Rizvi *et al.*, 1979). De manera adicional, los posibles blancos de acción del efecto antiespasmódico de algunos de estos productos han sido analizados. Así, estudios reportados en la literatura sobre el 5-MOP (**9**), el ostol (**2**), la umbeliferona (**7**), la herniarina (**5**) y la escopoletina (**11**) permitieron evidenciar su efecto antagónico sobre las contracciones de la musculatura lisa gastrointestinal provocadas por acetilcolina, histamina, cloruro de bario y KCl (Spiller, 2002). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la presente investigación para el extracto y aceite esencial de *A. toluensis*. Finalmente, cabe señalar que el ostol (**2**) inhibe a las fosfodiesterasas del AMPc y GMPc en traquea (Teng *et al.*, 1994).

Entonces, con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre el mecanismo relajante de la musculatura lisa de estos productos, se investigó su efecto sobre la calmodulina (CaM), proteína que juega un papel muy importante en la fase inicial de la contracción del músculo liso y en la transducción de señales reguladas por calcio a nivel celular. Cuando se incrementan los niveles intracelulares de este ión, se forma el complejo Ca^{2+} -CaM, el cual activa a la proteína cinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de CaM (MLCK) promoviendo así la fosforilación de la serina 19 de las cadenas ligeras regulatorias de miosina (RMLC). Esta fosforilación provoca la interacción de la actina y la miosina, estimula la actividad de la ATPasa e induce la formación de enlaces (o puentes) cruzados entre la miosina y la actina (Voet *et al.*, 2002; Woodrum y Brophy, 2001), promoviéndose así la contracción del músculo liso. La relajación del músculo liso ocurre cuando se elimina el estímulo contráctil o por acción directa de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil (**Figura 20**); en cualquiera de estos casos, el proceso de relajación requiere de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el incremento de la actividad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) (Webb, 2003).

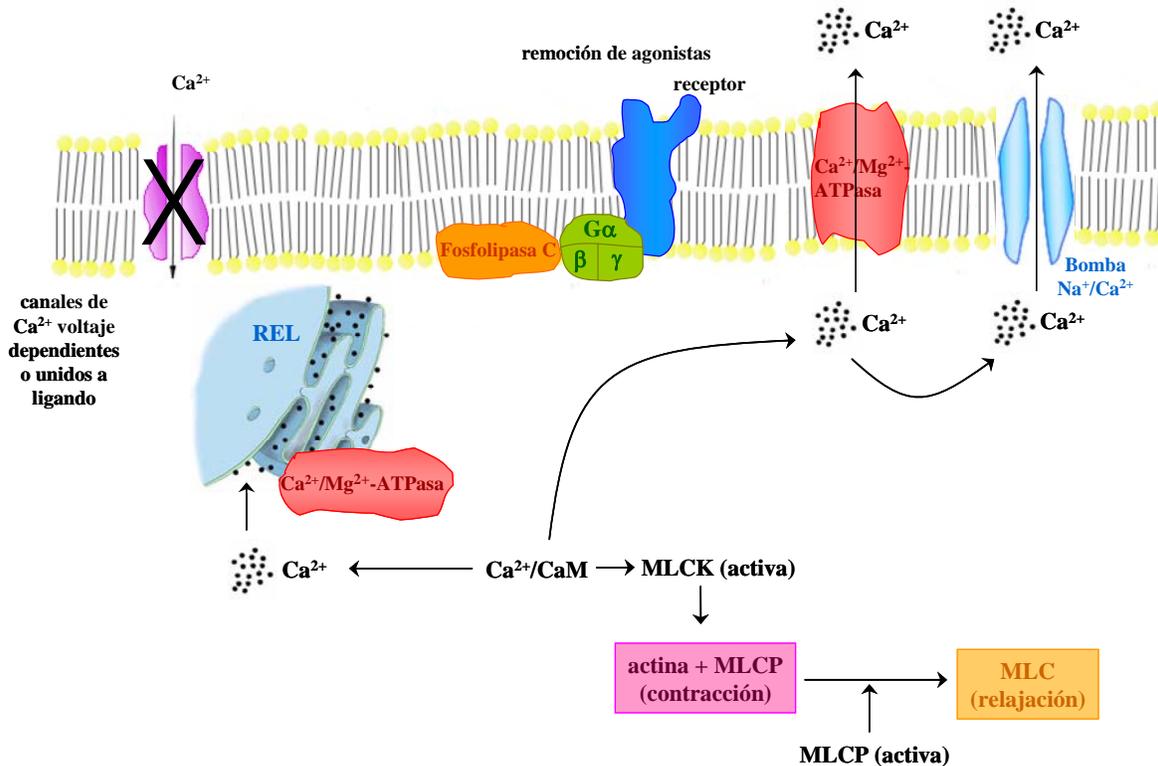


Figura 20. Mecanismo de relajación del músculo liso visceral.

Los agentes relajantes de la musculatura lisa del tracto gastrointestinal actúan promoviendo la formación de AMPc y/o GMPc, mediante la estimulación de receptores β -adrenérgicos y/o de la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), respectivamente, lo que trae como consecuencia la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y/o de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG). Ambas enzimas inducen la relajación del músculo liso debido, en primer lugar, a un decremento en la afinidad de unión de la MLCK por el complejo Ca^{2+} -CaM, probablemente por la activación de la MLCP (Katzung, 1992, 2002; Carvajal *et al.*, 2000) y, en segundo lugar, por la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante cualquiera de los siguientes mecanismos (Lucas *et al.*, 2000; Makhoulf y Murphy, 1997):

- a) Disminución de la formación de Ca^{2+} por inhibición de la formación de IP_3 y la liberación de Ca^{2+} del REL dependiente de IP_3 .

- b) Reducción del flujo de Ca^{2+} por inhibición de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L, dañando directamente la actividad del canal, o indirectamente, por estimulación de los canales de K^+ . Así, la membrana se hiperpolariza y los canales de Ca^{2+} se inactivan.
- c) Incremento en el flujo de Ca^{2+} por activación de dos canales iónicos: la bomba Ca^{2+} -ATPasa y el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$.
- d) Incremento en la captación de los iones Ca^{2+} en el REL, vía la activación de la bomba ATPasa (mecanismo regulado únicamente por la PKG).

Alternativamente, un mecanismo que involucra al neurotransmisor óxido nítrico (NO) ha sido estudiado por numerosos investigadores (Wendehenne *et al.*, 2001; Kurjak *et al.*, 2001; Lecci *et al.*, 2002). El NO participa en la relajación no adrenérgica-no colinérgica (NANC) del músculo liso visceral actuando directamente sobre las células del músculo liso, o indirectamente, modulando los reflejos neuronales, por ejemplo, regulando selectivamente la liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas. El NO generado en las neuronas del sistema entérico, se difunde rápidamente a través de las membranas de las células blanco, donde se une al grupo hemo de la enzima GCs e induce un cambio conformacional que activa a la enzima para promover la síntesis del segundo mensajero GMPc. El GMPc produce relajación muscular mediante la activación de una MLCP dependiente de GMPc. Esta enzima desfosforila a la RMLC la cual pierde su actividad ATPasa y, en consecuencia, la formación del complejo actina-miosina indispensable para la contracción muscular (Wendehenne *et al.*, 2001; Holzer *et al.*, 1997; Olgart *et al.*, 1997; **Figura 21**).

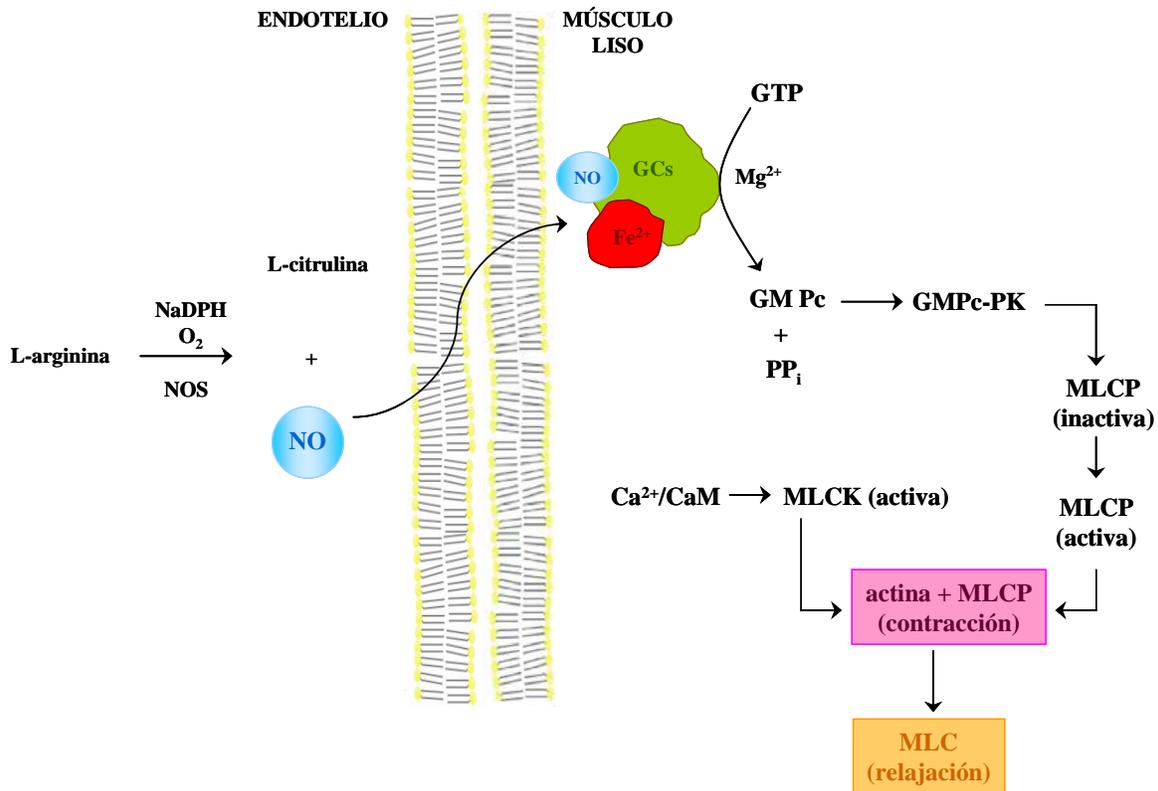


Figura 21. Relajación NANC del músculo liso visceral.

Para determinar el efecto de las cumarinas sobre la CaM se utilizó un ensayo espectrofotocolorimétrico utilizando como enzima monitora la fosfodiesterasa dependiente de CaM (PDE1). Esta enzima se utiliza comúnmente para detectar nuevos inhibidores de la CaM y en general, para demostrar la actividad de la CaM en estudios bioquímicos (Sharma y Wang, 1979; Leung *et al.*, 1984; Sharma, 1997).

El método espectrofotocolorimétrico utilizado para determinar la actividad enzimática de la PDE1 se basa en la cuantificación del fósforo inorgánico generado a partir de la hidrólisis de AMPc en presencia de la 5'-nucleotidasa de *Crotalus atrox* (**Figura 22**). La cantidad de fósforo cuantificado correlaciona directamente con la actividad del complejo CaM-PDE1 formado.

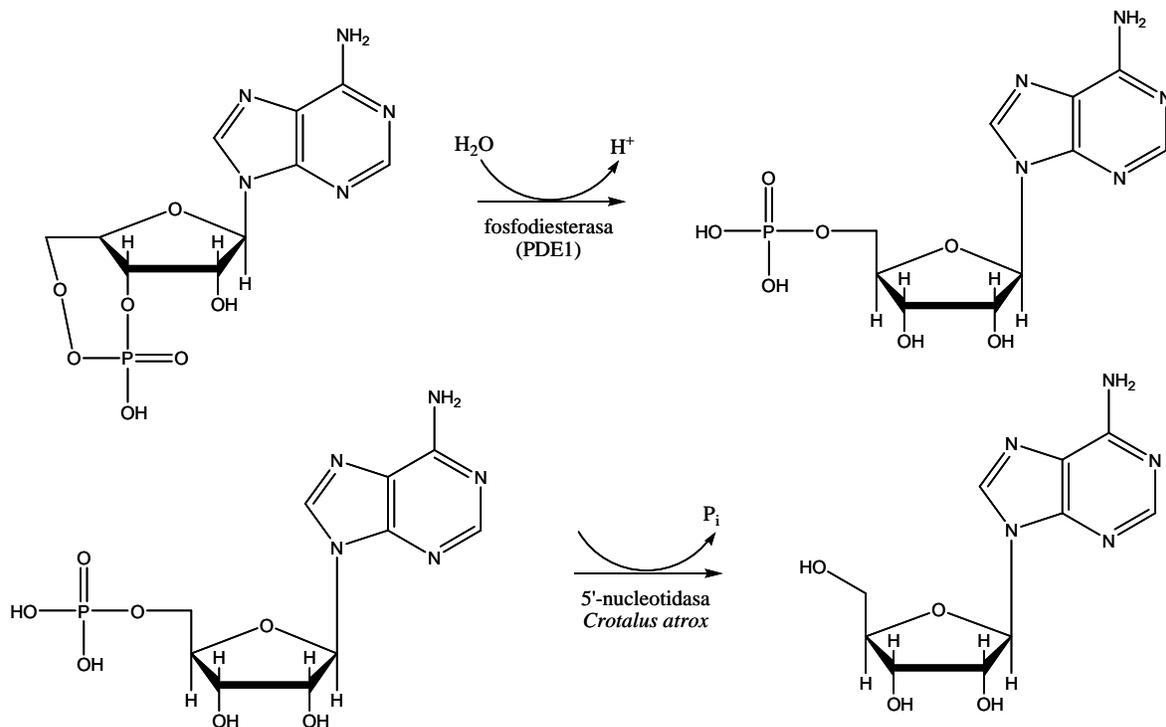
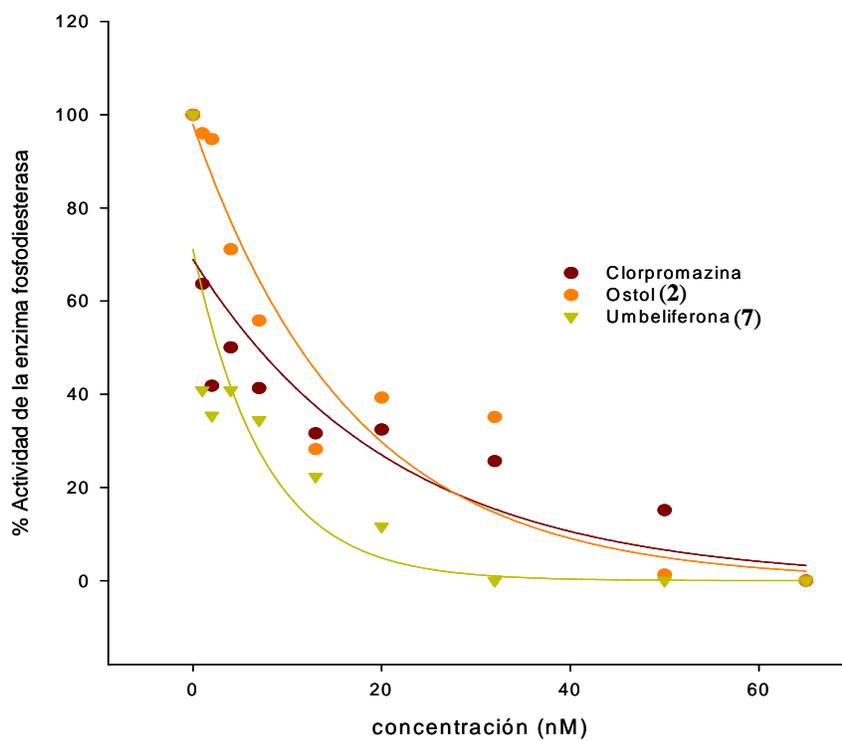


Figura 22. Hidrólisis enzimática del AMPc.

Los resultados de las determinaciones (**Gráfica 9**) indican que las cumarinas ostol (**2**) y umbeliferona (**7**) inhiben la actividad del complejo CaM-PDE1 de manera dependiente de la concentración. La umbeliferona (**7**) presentó la mayor actividad y, a la concentración de 32 nM, inhibió en un cien por ciento la actividad del complejo. Como se aprecia también en la **Gráfica 9**, el efecto de esta cumarina fue mayor que el de la clorpromazina, conocido inhibidor de la CaM empleado como control positivo (Ovadi, 1989; Hook y Means, 2001; Cantabrana *et al.*, 1995). El ostol (**2**) también inhibió significativamente la actividad enzimática de la PDE1 dependiente de la CaM. Estos resultados indican entonces que la CaM podría constituir un blanco de acción en la relajación de la musculatura lisa provocada por estas cumarinas.



Gráfica 9. Efecto de los compuestos **2** (●) y **7** (▼) sobre la actividad enzimática del complejo CaM-PDE1.

V. CONCLUSIONES

5.1 El estudio químico del extracto orgánico obtenido a partir de las partes aéreas de la especie *A. toluensis* permitió el aislamiento de once metabolitos secundarios pertenecientes a la categoría de las cumarinas. Las estructuras moleculares de estos compuestos corresponden a la isoimperatorina (**1**), el ostol (**2**), la suberosina (**3**), el 8-MOP (**4**), la herniarina (**5**), la escoparona (**6**), la umbeliferona (**7**), la dihidrooxipeucedanina (**8**), el 5-MOP (**9**), la 7-metoxi-6-hidroxi cumarina (**10**) y la 6-metoxi-7-hidroxi cumarina (**11**). En todos los casos, las estructuras se establecieron con base en evidencias de tipo espectroscópicas y espectrométricas.

5.2 El análisis del aceite esencial de la planta, mediante la aplicación de la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, reveló que la suberosina (**3**) y el ostol (**2**) son sus constituyentes mayoritarios. Otros componentes caracterizados en la esencia son el alcohol bencílico (**12**), el terpinen-4-ol (**13**) y el α -cadineno (**14**).

5.3 El aceite esencial y el extracto orgánico de la planta presentaron acción antimicrobiana y antiespasmódica. Así, el extracto orgánico inhibe significativamente el crecimiento de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, en tanto que el aceite esencial, el de las bacterias Gram positivas y Gram negativas *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las propiedades antiespasmódicas quedaron de manifiesto al comprobarse que los preparados de la planta inhiben las contracciones espontáneas e inducidas (acetilcolina, histamina, serotonina y BaCl₂) en íleon de cobayo. Estas propiedades pueden estar asociadas a los usos medicinales que se le atribuyen a las especies del género *Arracacia* en México para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales e indudablemente constituyen parámetros de la eficacia de la planta.

5.4 La inocuidad del extracto orgánico de *A. toluensis* se demostró de manera preliminar mediante la evaluación de la toxicidad aguda en ratones de acuerdo al método de Lorke. El valor de DL₅₀ de 2852 mg/Kg calculado permite clasificar a la planta como poco tóxica para animales de experimentación. De manera adicional, los resultados obtenidos en la prueba de Ames indican que el extracto no es mutagénico ya que no provocó la reversión de una mutación puntual en varias cepas de *S. typhimurium*.

5.5 Utilizando un ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad enzimática de la PDE1 basado en la cuantificación del fósforo inorgánico generado de la hidrólisis de AMPc diseñado por Sharma y Wang. Se estableció que el ostol (2) y la umbeliferona (7) interactúan con el complejo CaM-PDE1. La interacción de estas cumarinas con la proteína calmodulina *in vitro* permite proponer que la proteína constituye un blanco de acción a nivel molecular en el efecto relajante de la musculatura lisa provocada por los dos productos naturales.

5.6 Se desarrolló un método analítico por CLAE para cuantificar el contenido de las cumarinas isoimperatorina (1), ostol (2), 8-MOP (4) y 5-MOP (9) en el extracto orgánico de *A. toluensis*. El método se validó de acuerdo a los criterios analíticos convencionales y se comprobó que es selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones ensayadas. El método desarrollado será de utilidad para realizar las pruebas de composición e identidad de la especie, ya que las condiciones analíticas utilizadas para el desarrollo de la prueba de composición permitieron establecer, al mismo tiempo, los perfiles cromatográficos para las pruebas de identidad.

5.7 La información científica generada a través de la presente investigación aporta el conocimiento para integrar una monografía de tipo OMS que indudablemente contribuirá al uso racional de *A. toluensis*.

VI. PERSPECTIVAS

6.1 Realizar la identificación botánica microscópica de *A. toluensis* var. *multifida* con la finalidad de completar los ensayos de identidad de la droga cruda. En este sentido, el equipo del Dr. Robert Bye en el Jardín Botánico de la UNAM tienen a su cargo esta actividad.

6.2 Realizar los estudios fitoquímicos conducentes a explorar la composición, eficacia, identidad e inocuidad de la especie *A. atropurpurea* estrechamente relacionada desde el punto de vista etnomédico con la especie *A. toluensis*.

6.3 Realizar los estudios de toxicidad crónica de los preparados a base de *A. toluensis*.

6.4 Establecer la naturaleza de la inhibición del complejo CAM-PDE1 provocada por los compuestos **2** y **7**.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alderman, D J y Smith, P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. *Aquaculture*, **196**, 211–243, 2001.
- Ames, B N, McCann, J y Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **31**, 347-364, 1975.
- Artiges, A. What are the legal requirements for the use of phytopharmaceutical drugs in France. *J. Ethnopharmacology*, **32**, 231-234, 1991.
- Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Editorial Instituto Nacional Indigenista. México, volumen 3, 1994.
- Bauer, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drugs standard be achieved? *Drug Infor. J.*, **32**, 101-110, 1999.
- Baxter, G S, Craig, D A y Clarke, D E. 5-Hydroxytryptamine₄ receptors mediate relaxation of the rat oesophageal tunica muscularis mucosae. *Archives of Pharmacology*, **343**, 439-446, 1991.
- Bonati, A. How and why should we standardize phytopharmaceutical drugs for clinical validation? *J. Ethnopharmacology*, **32**, 195-197, 1991.
- Bye, R y Linares, E. The role of plants found in the Mexican markets and their importance in ethnobotanical studies. *Journal of Ethnobiology*, **3** (1), 1-13, 1983.
- Bye, R. Comunicación personal. Instituto de Biología, UNAM, 2005.
- Calderon, J y Ríos, T. Isolation and identification of some constituents of *Arracacia vaginata*. *Lloydia*, **38** (2), 174-175, 1975.
- Cantabrana, B, Vallina, J R P, Menendes, L e Hidalgo, A. Spasmolytic and calmodulin inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs *in vitro*. *Life Sci.*, **57**, 1333-1341, 1995.
- Capasso, A, Pinto, A, Mascolo, N, Autore, G y Capasso, F. Reduction of agonist-induced contraction of guinea-pig ileum by flavonoids. *Phytother. Res.*, **5**, 85-87, 1991.
- Carvajal, J A, Germain, A M, Huidobro-Toro, J P y Weiner, C P. Molecular Mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation. *J. Cell. Physiol.*, **184**, 409-420, 2000.

- Chen, J, Chiou, W F, Chen, C C y Chen, C F. Effect of the plant-extract [component] osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. *Journal of Urology*, **163** (6), 1975-1980, 2000.
- Constance, L. History of the classification of Umbelliferae (Apiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **64**, 1-13, 1971.
- Constance, L y Affolter, J M. Three new species and a new combination in *Arracacia* Bancroft (Umbelliferae/Apiaceae). *Brittonia*, **47** (3), 320-327, 1995.
- Cordell, G A y Quinn-Beattie, M L. Unpublished results from the NAPRALERT database. University of Illinois at Chicago, 2005.
- Cordell, G A y Colvard, M D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 5–14, 2005.
- Coulter, J M y Rose, J N. A synopsis of Mexican and Central American *Umbelliferae*. En: Proceedings of the Washington Academy of Sciences, **1**, 111-159, 1900.
- Delgado, G y Garduño, J. Pyranocoumarins from *Arracacia nelsonii*. *Phytochemistry*, **26** (4), 1139-1141, 1987.
- De Souza, S M, Monache, F D y Smânia A. Antibacterial Activity of Coumarins. *Z. Naturforsch.*, **60c**, 693-700, 2005.
- Diario Oficial de la Federación. DOF. Reglamento de Insumos para la Salud, DOF 04-II-1998.
- Diario Oficial de la Federación. DOF. Acuerdo por el que se determinan las plantas prohibidas o permitidas para tés, infusiones y aceites vegetales comestibles, DOF 15-XII-1999.
- Eloff, J N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, 1-8, 1998.
- Estevez-Braun, A y González, G A. Coumarins. *Natural Product Reports*, **14**, 465-475, 2002.
- Ettre, L y Kalasz, H. The Story of Thin-Layer Chromatography. *LCGC North America*, **19** (7), 712-721, 2001.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. ESCOP *Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs*. Fascículos 1 y 2. Exeter, UK, 1996.
- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. ESCOP *Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs*. Fascículos 3-5. Exeter, UK, 1997.

- European Scientific Cooperative on Phytotherapy. ESCOP *Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs*. Fascículo 6. Exeter, UK, 1999.
- Facheux, C, Asaah, E, Mpeck, M L y Tchounjeu, Z. Studying markets to identify medicinal species for domestication. *HerbalGram*, **60**, 38-46, 2003.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), Primera edición, Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2001.
- Farnsworth, N R, Akerele, O, Bingel, A S, Soejarto, D D y Guo, Z. Medicinal Plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, **63**, 965–981, 1985.
- Figueroa, M. Compuestos antimicobacterianos de *Arracacia toluensis* (H. B. K.) var. *multifida* Hemsley (S. Wats.) Mathias & Constance (Umbelliferae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2004.
- Foxx-Orenstein, A E, Kuemmerle, J F y Grider, J R. Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea pig intestine. *Gastroenterology*, **111** (5), 1281-1290, 1996.
- Frenk, M J, Enríquez, R E, Frati, M A, González, P E, Barraza, L M, Martínez, V E y Linares L P. Hacia una política farmacéutica integral para México. Primera edición, Secretaría de Salud, 2005.
- Harkar, S, Razdan, T K y Waight, E S. Steroid, Chromone and Coumarins from *Angelica officinalis*. *Phytochemistry*, **23**, 419-426, 1984.
- Hersch, M P. Destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México, 1996.
- Hisamoto, M, Kikuzaki, H y Nakatani N. Constituents of the Leaves of *Peucedanum japonicum* Thunb. and Their Biological Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 445-450, 2004.
- Holzer, P, Lippe, I, Tabizi, A L, Lenard, L y Bartho, L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J. Pharm. and Exp. Therap.*, **280**, 154-161, 1997.
- Hook, S y Means, A R. Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 471-505, 2001.
- Houghton, P. Old Yet New Pharmaceuticals from Plants. *J. Chem. Edu.*, **78**, 175-184, 2001.

- Hoult, J R y Paya, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, **27** (4), 713-722, 1996.
- Huang, L, Kashiwada, Y, Cosentino, L M, Fan, S, Chen, C H, McPhail, A T, Fujioka, T, Mihashi, K y Lee, K H. Anti-AIDS agents. 15. Synthesis and anti-HIV activity of dihydroseselinins and related analogs. *Journal of Medicinal Chemistry*, **37** (23), 3947-3955, 1994.
- Hubert, P, Chiap, P, Crommen, J, Boulanger, B, Chapuzet, E, Mercier, N, Bervoas-Martin, S, Chevalier, P, Grandjean, D, Lagorce, P, Lallier, M, Laparra, M C, Laurentie, M y Nivet, J C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Analytica Chimica Acta*, **391**, 135-148, 1999.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2A *Harmonised Tripartite Guideline*. En: Validation of Analytical Procedures. Minister of Health, Canada, 1998.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2B *Harmonised Tripartite Guideline*. En: Validation of Analytical Procedures: Methodology. Minister of Health, Canada, 1998.
- Ivie, W G. Linear Furocoumarins (Psoralens) from the Seed of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 1394-1402, 1978.
- Kating, B G y Trevor, A J. *Examination and Board Review. Pharmacology*, Appleton and Lange, 5th edition, Connecticut, 1998.
- Katzung, B G. *Basic and Clinical Pharmacology*, Editorial Appleton and Lange. 5th edition, 1992.
- Katzung, B G. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Manual Moderno, México, 2002.
- Knudsen, S R, Hermann, M y Sorensen, M. Flowering in six clones of the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **76**, 454-458, 2001.

- Ko, F N, Wu, T S, Liou, M J, Huang, T F y Teng, C M. Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. *European Journal of Pharmacology*, **219** (1), 29-34, 1992.
- Kurjak, M, Fritsch, R, Saur, D, Schusdziarra, V y Allescher, H D. Functional coupling between nitric oxide synthesis and vip release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5. *J. Physiol.*, **534**, 827-836, 2001.
- Lecci, A, Santicioli, P y Maggi, A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 630-641, 2002.
- Leung, P, Taylor, W A, Wang, J H y Tripton, C L. Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *J. Biol. Chem.*, **259**, 2742-2747, 1984.
- Li, L, Zhuang, F E, Zhao, G S y Zhao, D K. Effects of osthole on the isolated guinea pig ileum and taenia coli. *Yaoxue Xuebao*, **28** (12), 899-904, 1993.
- Lorke, D. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch. Toxicol.*, **54**, 275-287, 1983.
- Lowry, O H, Roseboug, N J, Farr, A L y Randall, R J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- Lozoya, X. Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaría de Salud, México, 255-270, 1993.
- Lucas, K A, Pitari, G M, Kazerounian, S, Ruiz-Stewart, I, Park, J, Schulz, S, Chepenik, K y Waldman, S. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharma. Rev.*, **52**, 375-413, 2000.
- Makhlouf, G M y Murphy, K S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal*, **9**, 269-276, 1997.
- Maron, D M y Ames, B N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215, 1983.
- Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. Primera edición. México, 1989.
- Menglan, S, Fading, P, Zehui, P, Watson, M F, Cannon, J F, Holmes-Smith, I, Kljuykov, E V, Phillippe, L R y Pimenov, M G. *Apiaceae* (Umbelliferae). *Flora of China*, **14**, 1-205, 2005.
- Mitscher, L A, Drake, S, Gollapudi, S R y Okwute, S K. A modern look at folkloric use of antiinfective agents. *Journal of Natural Products*, **50** (6), 1025-1040, 1987.

- Mitscher, L A, Leu, R P, Bathala, M S, Wu, W N, Beal, J L y White, R. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia*, **35** (2), 157-66, 1972.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 4ta. edición, M7-A4, Villanova, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*, 8th ed., M2-A8, Villanova, 2003.
- Ojala, T, Remes, S, Haansuu, P, Vuorela, H, Hiltunen, R, Átela, K y Vuorela P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, **73**, 299–305, 2000.
- Olgart, C, Wiklund, N P y Gustafsson, L E. Blockade of nitric oxide evoke smooth muscle contractions by an inhibitor of guanylyl cyclase. *Neuro Report*, **8**, 3355-3358, 1997.
- Ovadi, J. Effect of drugs on calmodulin-mediated enzymatic actions. En: *Progress in Drug Research*, Jucker, E. Editorial Brinkhauser Verlag, Germany, **33**, 353-395, 1989.
- Romero, C R. Manejo de Antimicrobianos. En *Microbiología y Parasitología Humana*. Bases Etiológicas de las Enfermedades. Editorial Médica Panamericana, México, 50-51, 1994.
- Risvi, S H, Shoeb, A, Kapil, R S y Popli, S P. Studies in medicinal plants: Part VII – spasmolytic coumarins from *Boeninghausenia albiflora* (Reich.). *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41** (5), 205-206, 1979.
- Samuelsson, G. Assay for Pharmacological activity: Non specific assays. En: *Methods in Plant Biochemistry*, **6**, 261-268, 1991.
- Sarker, S D y Nahar, L. Natural Medicine: The Genus *Angelica*. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1479-1500, 2004.
- Sharma, R K y Wang, J H. Preparation and assay of the Ca²⁺-dependent modulator protein. En: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*. Greengard, P y Robinson G A, Editorial Raven Press, New York, **10**, 187-198, 1979.
- Sharma, R K. Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonist. *Journal of Neurochemistry*, **69**, 845-850, 1997.

- Sociedad Farmacéutica de México. Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México. Editorial Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento. Cuarta Edición, México, 1144, 1904.
- Spiller, R. Serotonergic modulating drugs for functional gastrointestinal diseases. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **54**, 11–20, 2002.
- Teng, C M, Lin, C H, Ko, F N, Wu, T S y Huang, T F. The relaxant action of osthole isolated from *Angelica pubescens* in guinea pig trachea. *Archives of Pharmacology*, **349** (2), 202-208, 1994.
- Thastrup, O, Knudsen, J B, Lemmich, J y Winther, K. Inhibition of human platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins, a new class of cAMP-phosphodiesterase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, **34** (12), 2137-2140, 1985.
- United States Pharmacopeia XXIV. The United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD, 1710-1712, 1814-1818 y 1884-1890.
- Van Den Broucke, C O y Lemli, J A. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Medica*, **45**, 188-190, 1982.
- Voet, D, Prett, C y Voet, J G. Fundamentals Biochemistry Uptade. Editorial Wiley & Sons, England, 2002.
- Wannissorn, B, Jarikasem, S, Siriwangchai, T y Thubthimthed S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, **76**, 233–236, 2005.
- Webb, C J. Andromonoecism, protandry, and sexual selection in Umbelliferae. *New Zealand Journal of Botany*, **19**, 335-338, 1981.
- Webb, R C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Edu.*, **27**, 201-206, 2003.
- Wendehenne, D, Pugin, A, Klessig, D F y Duner, J O. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.*, **6**, 177-183, 2001.
- Woodrum, D A y Brophy, C M. The Paradox of the Smooth Muscle Physiology. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **177**, 135-143, 2001.
- Williamson, E M, Okpako, D T y Evans, F J. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. En: Pharmacological Methods in Phytoterapy Research, Volume I, Editorial John Wiley & Sons, England, 1996.
- World Health Organization. WHO *Alma-Ata, Primary Health Care*. UNICEF, 1978.

- World Health Organization. WHO, *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, 1998
- World Health Organization. WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 1. Geneva, 1999.
- World Health Organization. WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 2. Geneva, 2001.
- Yiu-Cheong, W J, Wang-Fun, F, Jin-Xia, Z, Chung-Hang, L, Hoi-Lung, K, Meng-Su, Y, Ding, L y Hon-Yeung, C. Reversal of multidrug resistance in cancer cells by pyranocoumarins isolated from *Radix peucedani*. *European Journal of Pharmacology*, **473**, 9-17, 2003.

APÉNDICE I

1. ENSAYO DE MUTAGENICIDAD

- Sales de Vogel-Bonner (pH 7.4)

	g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	10
Ácido cítrico monohidratado	100
Fosfato de potasio dibásico anhidro (K_2HPO_4)	500
Fosfato de sodio y amonio $NaH_2PO_4 \cdot 4 H_2O$	175
Agua destilada	670

- Agar Vogel-Bonner

A. Medio mínimo de glucosa

	g
Agar	15
Glucosa	20
Agua destilada	800

B. Medio de sales Vogel-Bonner

	g
Sales de Vogel-Bonner	20 mL
Agua destilada	180 mL

- Esterilizar por calentamiento en autoclave los medios **A** y **B** a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, mezclar ambos medios y vertir 25 mL de este medio en cada caja de Petri.

- Buffer de Cloruros

	g
Cloruro de potasio	123 g
Cloruro de magnesio	81.4 g
Agua destilada	500 mL

- Esterilizar por filtración utilizando membranas marca Acrodisc® de 0.45 μm . Conservar en refrigeración a 4 °C.

- Buffer de fosfatos (pH 7.4)

	g
Fosfato de sodio dibásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	27.6 g
Fosfato de sodio monobásico (Na_2HPO_4)	28.4 g
Agua destilada	500 mL

- Esterilizar por calentamiento en autoclave a 121 °C y 21 lb/cm^2 , durante 15 minutos. Conservar en refrigeración a 4 °C.

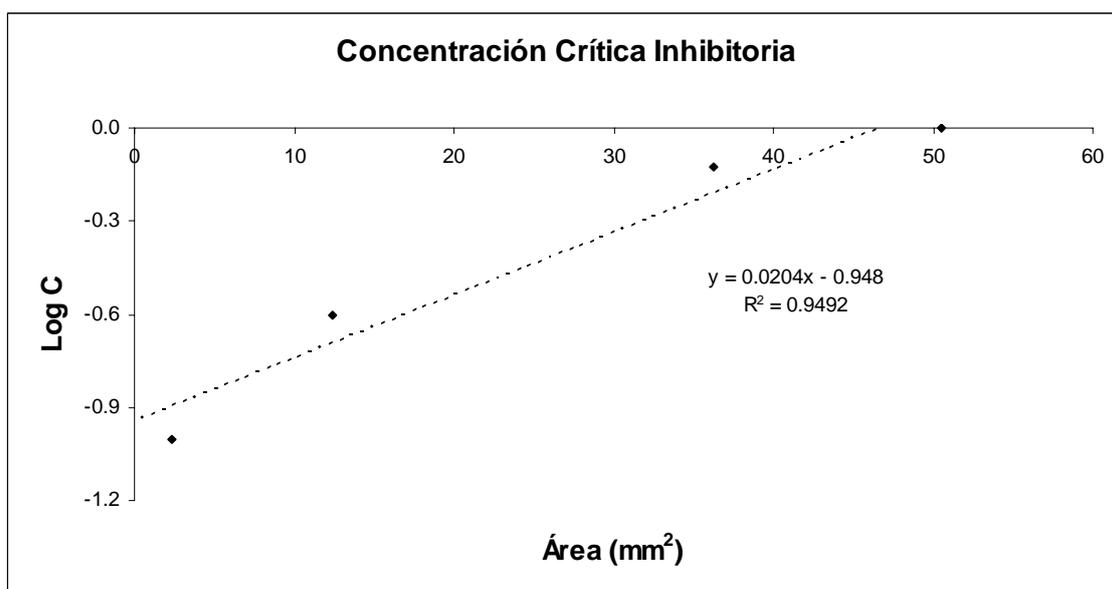
APÉNDICE II

1. CURVAS DE ANTIBIÓTICOS

A) Gram positivas

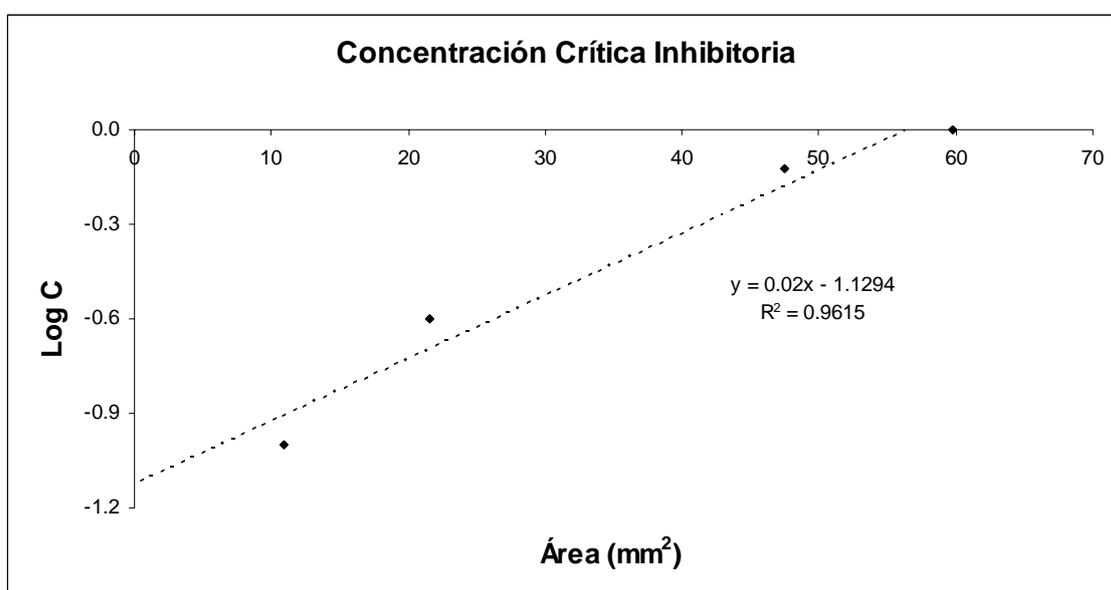
- Organismo de prueba: *S. aureus*, antibiótico: amikacina

Concentración de antibiótico (µg)	Log C	Zona de inhibición (mm)	Zona de inhibición estándar (mm)	Zona de inhibición corregida (mm)	Área (mm) ²
0.10	-1.00	9.33	15.83	9.04	2.31
0.25	-0.60	13.17	15.67	13.04	12.40
0.75	-0.12	18.00	15.50	18.04	36.25
1.00	0.00	19.83	15.17	20.21	50.47
		promedio:	15.54	CCI (µg)	0.11



- Organismo de prueba: *B. subtilis*, antibiótico: vancomicina

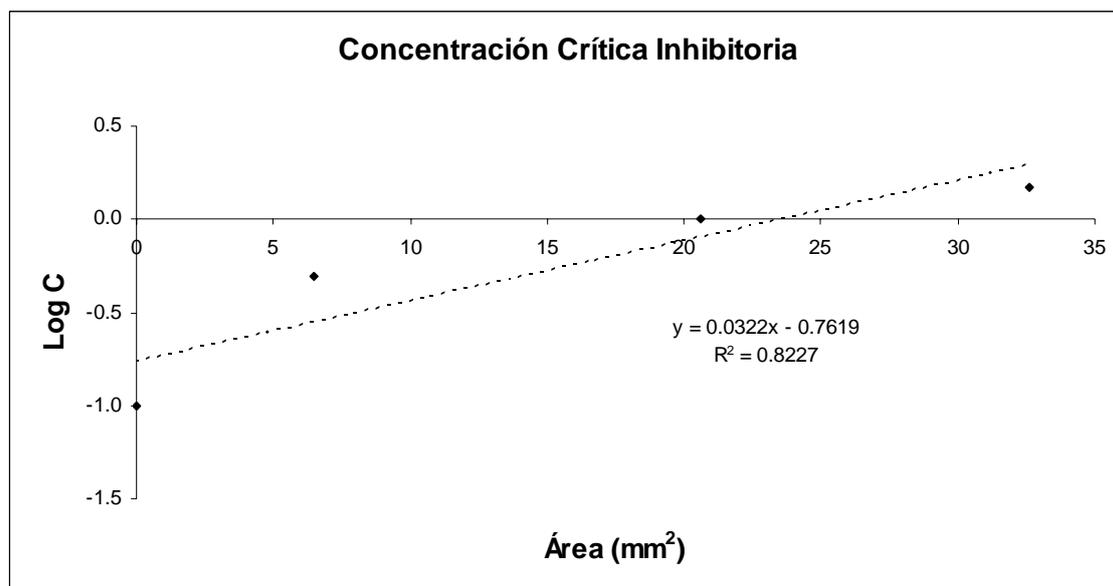
Concentración de antibiótico (µg)	Log C	Zona de inhibición (mm)	Zona de inhibición estándar (mm)	Zona de inhibición corregida (mm)	Área (mm) ²
0.10	-1.00	12.83	17.83	12.63	10.97
0.25	-0.60	15.50	17.83	15.29	21.58
0.75	-0.12	19.50	17.33	19.79	47.55
1.00	0.00	21.33	17.50	21.46	59.74
		promedio:	17.63	CCI (µg)	0.07



B) Gram negativas

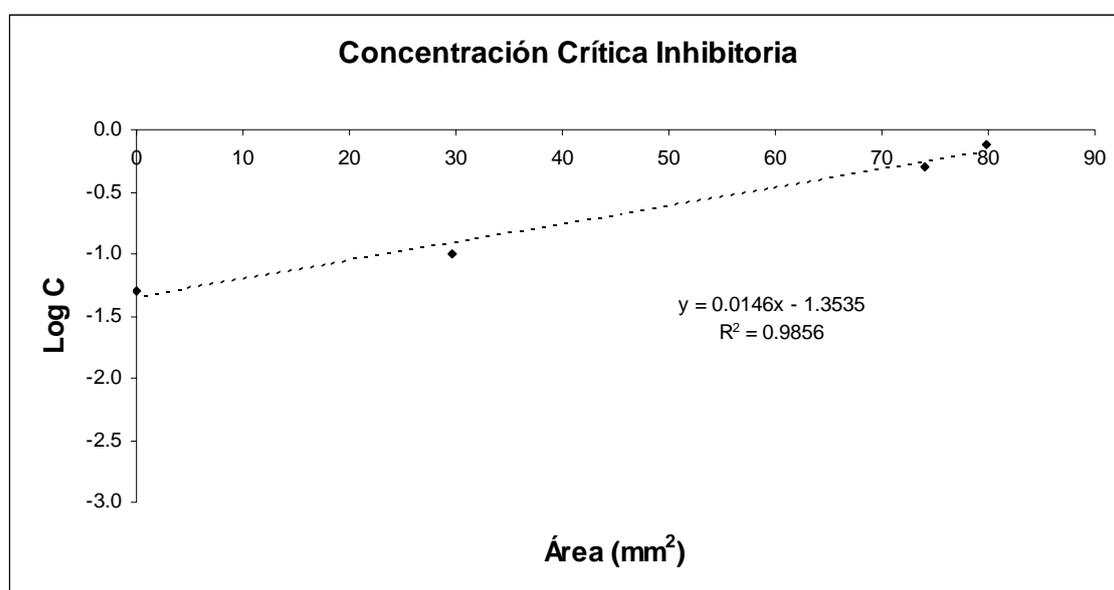
- Organismo de prueba: *P. aeruginosa*, antibiótico: gentamicina

Concentración de antibiótico (µg)	Log C	Zona de inhibición (mm)	Zona de inhibición estándar (mm)	Zona de inhibición corregida (mm)	Área (mm) ²
0.10	-1.00	6.00	13.33	5.75	0.02
0.50	-0.30	11.50	13.50	11.08	6.46
1.00	0.00	14.67	12.67	15.08	20.63
1.50	0.18	17.17	12.83	17.42	32.59
		promedio:	13.08	CCI (µg)	0.17



- Organismo de prueba: *E. coli*, antibiótico: gentamicina

Concentración de antibiótico (µg)	Log C	Zona de inhibición (mm)	Zona de inhibición estándar (mm)	Zona de inhibición corregida (mm)	Área (mm) ²
0.05	-1.30	6.00	20.00	5.88	0.00
0.10	-1.00	17.17	20.17	16.88	29.57
0.50	-0.30	23.17	19.83	23.21	74.03
0.75	-0.12	23.50	19.50	23.88	79.88
		promedio:	19.88	CCI (µg)	0.04



- Organismo de prueba: *S. typhi*, antibiótico: ciprofloxacina

Concentración de antibiótico (µg)	Log C	Zona de inhibición (mm)	Zona de inhibición estándar (mm)	Zona de inhibición corregida (mm)	Área (mm) ²
0.010	-2.00	11.33	17.83	12.25	9.77
0.025	-1.60	17.00	19.33	16.42	27.13
0.075	-1.12	22.83	19.00	22.58	68.75
0.100	-1.00	25.50	18.83	25.42	94.25
		promedio:	18.75	CCI (µg)	0.01

