

00582

5

281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE LOS AGENTES RELAJANTES DE LA MUSCULATURA
LISA DE LA PLANTA MEDICINAL DODONAEA VISCOSA (L.) JACQ.
(SAPINDACEAE)**

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS (QUIMICA FARMACEUTICA)

Presenta

M. en C. María Alejandra Rojas Molina

FALLA DE ORIGEN

México, D.F. Noviembre de 1995.



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 está 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	Dra. Ofelia Espejo Ochoa
Primer Vocal	Dr. Robert Bye Buttler
Segundo Vocal	Dr. Eugene Bratoeff Titeff
Tercer Vocal	Dr. Hector Ponce Monter
Secretario	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Primer Suplente	Dr. Carlos Hoyo
Segundo Suplente	Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. Rachel Mata Essayag del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM; en el Laboratorio de la Dra. Silvia Cruz Martín del Campo del Departamento de Farmacología, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV, IPN; en el Laboratorio del Dr. Héctor Ponce Monter de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; en el laboratorio de Neurofisiología de la Facultad de Medicina y en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Química de la U.A.Q.

Asesor:	Dra. Rachel Mata Essayag
Co-Asesor:	Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo
Sustentante:	María Alejandra Rojas Molina

CONTENIDO

Página

LISTA DE CUADROS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	4
2. ANTECEDENTES	
2.1. Antecedentes de las especies seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar.....	7
2.2. Antecedentes de la <i>Dodonaea viscosa</i>	13
2.3. Agentes antiespasmódicos de origen vegetal:.....	21
Antagonistas colinérgicos muscarínicos.....	21
Agonistas opioides.....	33
Bloqueadores de canales de Ca ²⁺ de origen vegetal.....	36
Inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa.....	49
Activadores de la adenilato ciclasa.....	50
Relajantes musculares de origen vegetal con mecanismo de acción no caracterizado.....	51
3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	54
3.1. Objetivos específicos.....	56
4. RESULTADOS.....	59
5. DISCUSION GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	62
5.1 Potencial espasmolítico de algunas plantas utilizadas en la la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales.....	62
5.2 Compuestos relajantes de la musculatura lisa de <i>Dodonaea viscosa</i>	66
6. CONCLUSIONES.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	76
BIBLIOGRAFIA.....	77
APENDICE I.....	92

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Especies vegetales seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar.....	6
Cuadro 2. Estudios fitoquímicos realizados sobre algunas de las especies seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar.....	7
Cuadro 3. Estudios fitoquímicos realizados sobre <i>D. viscosa</i>	13
Cuadro 4. Antagonistas colinérgicos muscarínicos.....	22
Cuadro 5. Alcaloides pirrolizidínicos con propiedades antiespasmódicas.....	32
Cuadro 6. Agonistas opioides aislados del <i>Papaver somniferum</i>	34
Cuadro 7. Bloqueadores de canales de calcio con aplicación terapéutica.....	41
Cuadro 8. Alcaloides benciltetrahidroisoquinolínicos y bis-benciltetrahidroisoquinolínicos	43
Cuadro 9. Ejemplos de flavonoides bloqueadores de canales de Ca ²⁺	45
Cuadro 10. Ejemplos de metabolitos secundarios bloqueadores de canales de Ca ²⁺	47
Cuadro 11. Ejemplos de metabolitos secundarios relajantes de la musculatura lisa con mecanismo de acción indeterminado.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Representación del receptor muscarínico.....	26
Figura 2. Activación de: a) una enzima efectora o b) un canal iónico por la interacción de un receptor con su ligando mediante una proteína G.....	27
Figura 3. Conformación requerida para la interacción de la Ach y la atropina con los receptores colinérgicos muscarínicos.....	30
Figura 4. Representación del canal de Ca²⁺ voltaje-dependiente tipo L.....	39
Figura 5. Estructura química de la papaverina.....	50
Figura 6. Estructura química de la forskolina.....	51

RESUMEN

La presente disertación describe el efecto espasmolítico y antimicrobiano de los extractos totales derivados de ocho especies vegetales de amplio uso en la medicina popular de México. Las especies evaluadas incluyen: *Conyza filaginoides* (D.C) Hieron (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* D.C. var. stramonium (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae) y *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae) .

El efecto antiespasmódico se determinó *in vitro* utilizando una preparación de ileón aislado de rata. En todos los casos se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre la contracción espontánea del músculo aislado. Los ocho extractos ensayados inhibieron las contracciones espontáneas del ileón, encontrándose que el efecto farmacológico observado era dependiente de la concentración. El extracto de *D. viscosa* ($CI_{50}=11.91 \mu\text{g/ml}$) fué el más activo, con una potencia comparable a la del extracto metanólico de *Datura lanosa* Barclay ex Bye (Solanaceae) ($CI_{50}=9.65 \mu\text{g/ml}$), que fué utilizado como un control positivo.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas objeto de estudio se realizó utilizando 10 cepas de enterobacterias patógenas que incluyeron: *Aeromona hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*. Los resultados indicaron que siete de las nueve especies evaluadas (incluyendo *D. lanosa*) poseen efectos antibacterianos. Sin embargo, la acción antibiótica que presentaron los

extractos no justifica por sí sola el uso tradicional de las plantas para el tratamiento de "desórdenes gastrointestinales" de etiología bacteriana.

Los resultados derivados del rastreo farmacológico de los extractos crudos permitieron corroborar el efecto espasmolítico que se les atribuye a las especies vegetales investigadas en la medicina popular. De manera adicional, la estrategia implementada permitió seleccionar a la *D. viscosa* como el candidato más idóneo para la obtención de principios activos potenciales con propiedades espasmolíticas.

El efecto relajante de la contracción espontánea del íleo de rata presentado por el extracto de *D. viscosa* se confirmó en el modelo de ileón de cobayo el cual fué utilizado como bioensayo para monitorear el estudio fitoquímico de la planta. El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de *D. viscosa* condujo el aislamiento de cuatro principios activos que produjeron una inhibición, dependiente de la concentración, de las contracciones espontáneas del ileón de cobayo. Los principios espasmolíticos se caracterizaron como: la sakuranetina ($CI_{50}=15.98 \mu\text{g/ml}$), la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona ($CI_{50}=15.89 \mu\text{g/ml}$), el ácido huatriwaico ($CI_{50}=8.59 \mu\text{g/ml}$) y el *ent*-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16)14-dien-3 β -8 α -diol ($CI_{50}=6.17 \mu\text{g/ml}$). De manera adicional, los compuestos inhibieron las contracciones del ileón de cobayo inducidas por estimulación eléctrica. La sakuranetina y el *ent*-labdano resultaron ser los relajantes más potentes con CI_{50} de 4.69 $\mu\text{g/ml}$ y 19.37 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

En otra serie de experimentos diseñados para ampliar la caracterización farmacológica de los compuestos aislados, se evaluó el efecto de los mismos sobre las contracciones del ileón de cobayo inducidas por la acetilcolina (Ach), la histamina y el cloruro de bario. En estos ensayos, la sakuranetina y el *ent*-labdano inhibieron las contracciones evocadas por la (Ach), la histamina y el cloruro de bario en el ileón de cobayo. Los resultados obtenidos sugerían que

el mecanismo de acción del efecto relajante producido por estos compuestos era inespecífico y que probablemente ambas sustancias estaban actuando en un paso común en el mecanismo de la contracción muscular inducido por los espasmógenos de prueba. Esta hipótesis se confirmó cuando se demostró que ambos compuestos producían una inhibición de las contracciones inducidas por Ca^{2+} en el útero de rata, originando un desplazamiento hacia la derecha de las curvas concentración-respuesta de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos indicaron que el efecto relajante de la musculatura lisa producida por la sakuranetina y el *ent*-labdano se debe a una interferencia del metabolismo de Ca^{2+} en la célula muscular.

Por otra parte, la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona inhibió las contracciones del ileón de cobayo inducidas por la histamina y el cloruro de bario, sin afectar la respuesta de la acetilcolina. La falta de antagonismo en la respuesta a la Ach presentada por la flavona, aparentemente descarta la posibilidad de que este compuesto interfiere con el influjo de Ca^{2+} en la célula muscular, como se ha descrito para otros flavonoles. Sin embargo, es necesaria la realización de más investigaciones a fin de comprobar esta propuesta.

El ácido huatriwaico provocó en el ileón de cobayo una inhibición de las contracciones inducidas por la histamina y un incremento de las contracciones evocadas por el cloruro de bario, sin modificar las contracciones inducidas por la Ach. Este comportamiento complejo no se puede explicar considerando un mecanismo de acción simple y evidentemente es necesario realizar una investigación farmacológica más detallada con el objeto de caracterizar el modo de acción de este diterpenoide.

1. INTRODUCCION

La flora mexicana, con su gran diversidad y riqueza, constituye indudablemente el principal recurso terapéutico empleado en la medicina tradicional. Estudios recientes indican que en México existen siete mil especies vegetales, botánicamente clasificadas, que son utilizadas por la población mexicana con fines curativos (Lozoya, 1993). De estas especies, se ha descrito un "grupo básico de 1000 plantas" que ha sido empleado en la medicina tradicional de México durante casi 400 años. La gran mayoría de estos vegetales son utilizados para el tratamiento de enfermedades comunes tales como infecciones respiratorias y de la piel, desórdenes gastrointestinales, hipertensión, dolor y diabetes o para inducir el sueño o el parto (Lozoya, 1994).

Las encuestas nacionales sobre el uso de remedios vegetales en la medicina tradicional mexicana realizadas por investigadores del Instituto Mexicano del Seguro Social durante la última década, indican que aproximadamente el 78% de las plantas que prescriben los médicos tradicionales se emplean para el tratamiento de padecimientos digestivos, respiratorios y de la piel (Aguilar y Camacho, 1984; Lozoya *et al.*, 1987; Aguilar *et al.*, 1994). Resulta interesante señalar que el mayor porcentaje de estas especies vegetales (38 %) se utiliza para tratar diversos desórdenes gastrointestinales e incluyen plantas a las que se les atribuyen efectos antiparasitarios, espasmolíticos, laxantes, antidiarréicos y coleréticos (Aguilar y Camacho, 1984; Lozoya *et al.*, 1987). Esta información corrobora el hecho de que las enfermedades gastrointestinales constituyen uno de los padecimientos más difundidos en el país y demuestra que la medicina tradicional se avoca fundamentalmente a la solución de los problemas de salud más básicos de la población mexicana.

Desafortunadamente, en México el porcentaje de las especies vegetales medicinales estudiadas desde el punto de vista farmacológico es relativamente

bajo y actualmente se considera que de todas las especies en uso sólo se conocen, con criterios de carácter experimental y científico, las propiedades farmacológicas de aproximadamente el 1.5% (Lozoya, 1993).

En el caso particular de las plantas utilizadas para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, las cinco especies de mayor uso en nuestro país son las siguientes: *Mentha piperita* (espasmolítico y digestivo), *Matricaria chamomilla* (espasmolítico, antiinflamatorio y digestivo), *Artemisia mexicana* (desparasitante y espasmolítico), *Chenopodium ambrosioides* (desparasitante y espasmolítico) y *Psidium guajava* (antidiarreico) (Lozoya, 1987). Es importante señalar que estas plantas ya han sido objeto de estudios fitoquímicos y farmacológicos que de alguna manera permiten explicar, parcial o totalmente, su uso medicinal. Sin embargo, cabe mencionar que estos estudios, realizados en gran parte por investigadores extranjeros, no fueron el resultado de investigaciones multidisciplinarias sistemáticas, sino más bien el producto de trabajos aislados.

Con base en estos antecedentes, resulta evidente que en la actualidad sólo se tiene un conocimiento empírico de la gran mayoría de las especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana para la cura de los llamados "desórdenes gastrointestinales", ya que a la fecha no se han efectuado estudios sistemáticos tendientes a determinar su efecto farmacológico, ni tampoco se han realizado estudios fitoquímicos biodirigidos con miras a la caracterización de sus principios activos.

Desde esta perspectiva surgió la presente disertación, como parte de un proyecto de investigación interdisciplinario que tiene por objeto obtener principios activos espasmolíticos potenciales a partir de especies de la flora medicinal mexicana seleccionadas mediante un rastreo farmacológico preliminar.

En el caso del presente trabajo, las especies preseleccionadas para su evaluación farmacológica preliminar fueron las siguientes: *Conyza flaginoides*

(D.C) Hieron (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* D.C. var. *stramonium* (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae) y *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae). Todas ellas gozan de reputación folclórica como agentes espasmolíticos para el tratamiento de diversos padecimientos gastrointestinales que incluyen cólicos, diarrea y disentería (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies vegetales seleccionadas para el raestro farmacológico preliminar.

Nombre científico	Nombres vulgares	Parte usada
<i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)	Comolxochitl, simonillo, hierba amarga, jimonillo	Planta entera
<i>Croton fragilis</i> (Euphorbiaceae)	—	Corteza y hojas
<i>Dodonaea viscosa</i> (Sapindaceae)	Cuerno de cabra, chapuliztle cacho venado	Partes aéreas
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Asteraceae)	Escobilla, jarilla, tatalenchos pegajosa, xonequilitl	Planta entera
<i>Parthenium tomentosum</i> (Asteraceae)	—	Planta entera
<i>Potentilla thurberi</i> (Rosaceae)	—	Corteza
<i>Pterogonum atrorubens</i> (Polygonaceae)	—	Corteza
<i>Zornia venosa</i> (Fabaceae)	Hierba de la víbora	Planta entera

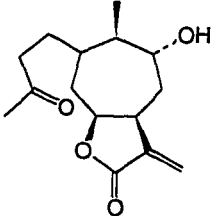
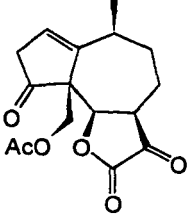
2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES DE LAS LAS ESPECIES SELECCIONADAS PARA EL RASTREO FARMACOLOGICO

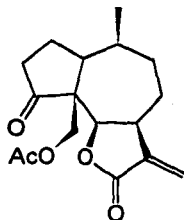
Las especies *Conyza filaginoides*, *Gymnosperma glutinosum*, *Parthenium tomentosum* y *Zornia venosa* han sido objeto de estudios fitoquímicos previos. Los resultados derivados de estos trabajos se especifican en el Cuadro 2.

Una revisión en la bibliografía demostró que ninguna de las especies seleccionadas ha sido evaluada como agente antiespasmódico.

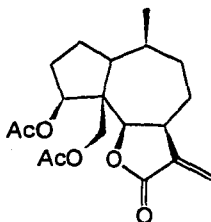
Cuadro 2. Estudios fitoquímicos realizados sobre algunas de las especies seleccionadas para el rastreo farmacológico preliminar.

Planta	Metabolito aislado	Referencias
<i>P. tomentosum</i>	 <p data-bbox="434 884 558 911">1. Ivalbatina</p>	Maldonado <i>et al.</i> , 1985.
<i>P. tomentosum</i>	 <p data-bbox="412 1166 579 1193">2, Partomentina</p>	Maldonado <i>et al.</i> , 1985.

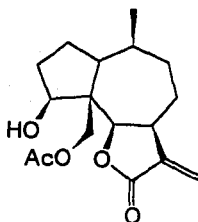
Continuación del cuadro 2

P. tomentosum

3, Incanina

Maldonado *et al.*,
1985.*P. tomentosum*

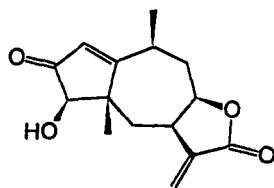
4, Ligulatina

Maldonado *et al.*,
1985.*P. tomentosum*

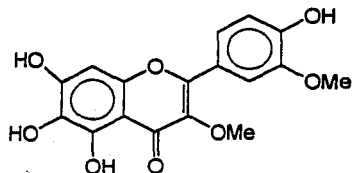
5, 4-O-Desacetyl-ligulatina

Maldonado *et al.*,
1985.*P. tomentosum*6, Aceites esenciales: Sabineno,
camfeno, pineno, terpinoleno, limoneno,
ocimeno, 1, 8-cineol.Kukamoto *et al.*,
1985.

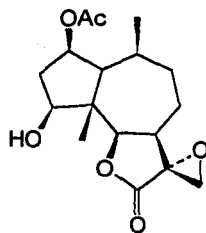
Continuación del cuadro 2

P. tomentosum

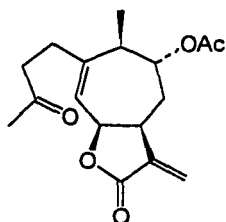
7, 1-Dehidro-peruvina

Maldonado *et al.*,
1985.*P. tomentosum*

8, 3,3'-Dimetoxi-quercetagenina

Rodríguez *et al.*,
1972.*P. tomentosum*

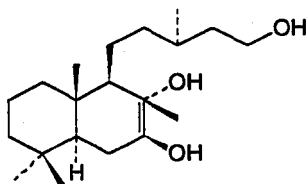
9, Parthoximentina

Maldonado *et al.*,
1985.*P. tomentosum*

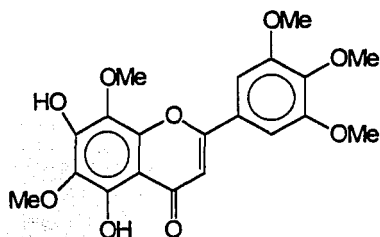
10, Acetifivalbatina

Maldonado *et al.*,
1985.

Continuación del cuadro 2

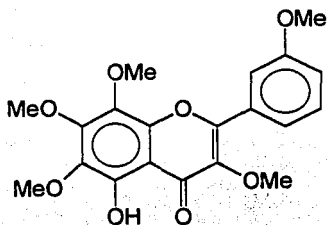
G. glutinosumMiyakado *et al.*,
1974.

11, Gymnospermina

G. glutinosum

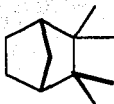
Domínguez, 1974.

12, Luiselizondina

G. glutinosum

Domínguez, 1974.

13, Emmaosunina

G. glutinosum

Domínguez, 1974.

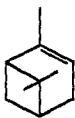
14, Camfeno

Continuación del cuadro 2

G. glutinosum

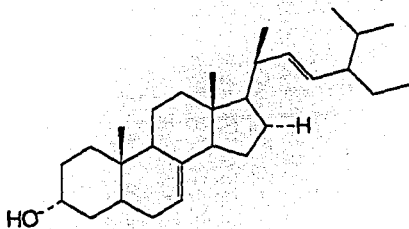
15, Felandreno

Domínguez, 1974.

G. glutinosum

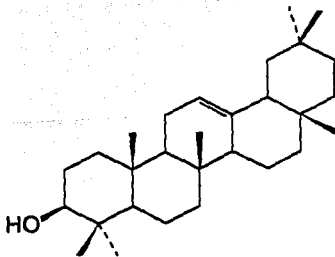
16, Pinano .

Domínguez, 1974.

C. filaginoides

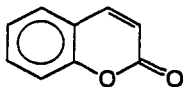
17, Spinasterol

Domínguez, 1972.

C. filaginoides18, β -amyrina

Domínguez, 1972.

Continuación del cuadro 2

Z. venosa

López, 1981.

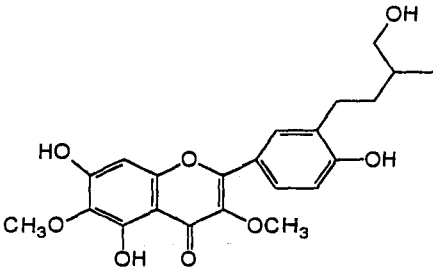
19, Cumarina

2.2 ANTECEDENTES DE DODONAEA VISCOSA

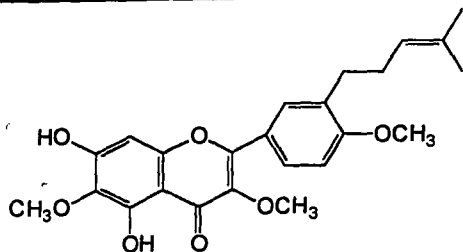
Desde el punto de vista fitoquímico *D. viscosa* ha sido investigada por varios autores. Estas investigaciones permitieron el aislamiento y caracterización de varios flavonoides (Sastry y Nayudamma, 1966; Sachdev y Kulshreshtha, 1983; Mata *et al.*, 1991), algunos diterpenoides (Hsu *et al.*, 1971; Sachdev y Kulshreshtha., 1983; Mata *et al.*, 1991), taninos condensados (Sastry y Nayudamma, 1986), algunos triterpenoides (Wagner *et al.*, 1987), un ester p-cumárico del L-mio-inositol (Mata *et al.*, 1991) (Cuadro 3).

De las semillas se obtuvieron dos saponinas con actividad biológica, los dodonósidos A y B. La mezcla de saponinas posee propiedades antisudorantes, molusquicidas e incrementan la fagocitosis (Wagner *et al.*, 1987).

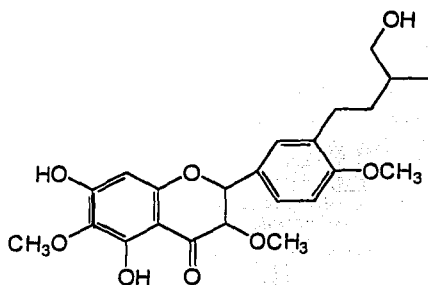
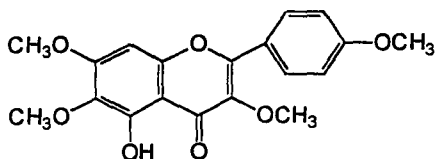
Cuadro 3. Estudios fitoquímicos realizados sobre *Dodonaea viscosa*.

Metabolito aislado	Referencia
 <p data-bbox="313 1045 430 1068">20, Aliarina</p>	<p data-bbox="589 749 867 803">Sachdev y Kulshershatha, 1982.</p>

Continuación del cuadro 3



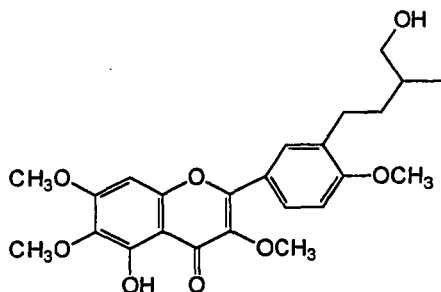
21, Viscosol

Sachdev y Kulshershatha,
1986.22, 5,7-dihidroxi-3'-(3-hidroxi-metil-butil)-
3,6,4'-trimetoxi-flavonaSachdev y Kulshershatha,
1983.

23, 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetra-metoxi-flavona

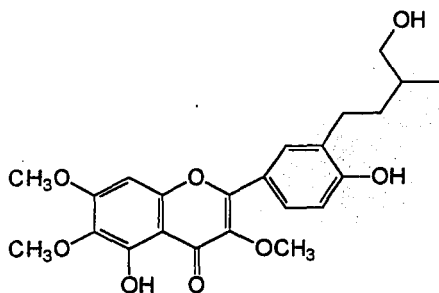
Dreyer, 1978.

Continuación del cuadro 3



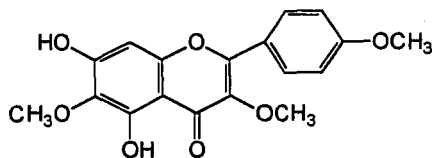
Sachdev y Kulshershatha,
1983.

24, 3'-(3-hidroxi-metil-butil)-3,5,6,7,4'
penta-metoxi-flavona



Sachdev y Kulshershatha,
1983.

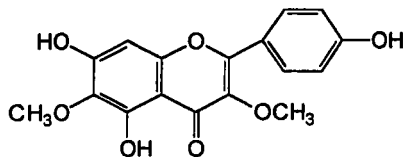
25, 5,4'-dihidroxi-3'-(3-hidroxi-metil-butil)
-3,6,7-trimetoxi-flavona



Dreyer, 1978.

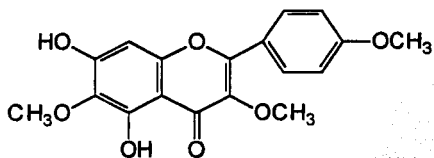
26, Santina

Continuación del cuadro 3



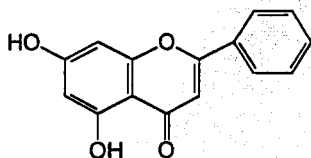
27, Penduletina

Dreyer, 1978.

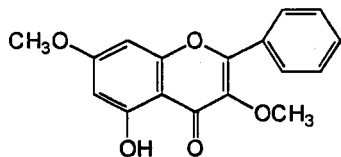


28, 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxi-flavona

Dreyer, 1978.



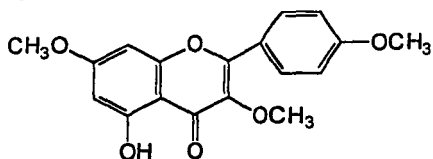
29, Pinoembrina

Sachdev y Kulshershatha,
1983.

30, 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-flavona

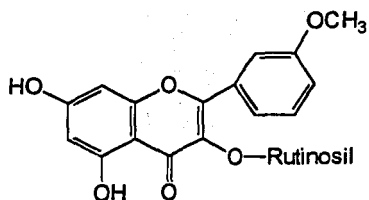
Sachdev y Kulshershatha,
1983.

Continuación del cuadro 3



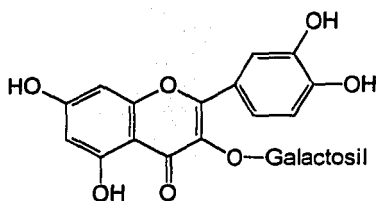
Dreyer, 1978.

31, 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxi-flavona

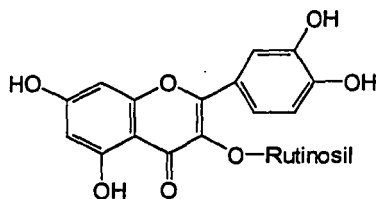


Nair y Subramanian, 1975.

32, 3-O-Rutinosil isoramnetina



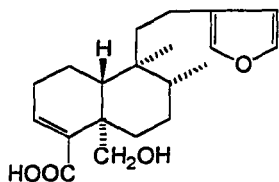
Nair y Subramanian, 1975.

33, 3-O- β -D-Galactosil quercetina

Nair y Subramanian, 1975.

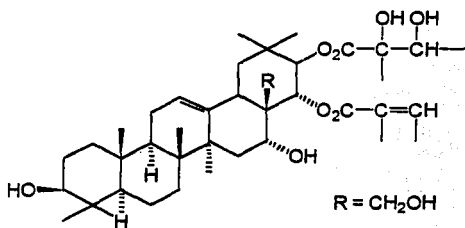
34, 3-O-Rutinosil quercetina

Continuación del cuadro 3

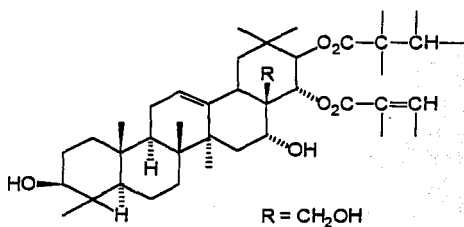


35, Acido Hautriwaico

Hsu y Hong-Yen, 1971.



36, (2,3-dihidroxi-2-metil-butiroilo)-22-ageloato de jegosapogenoilo

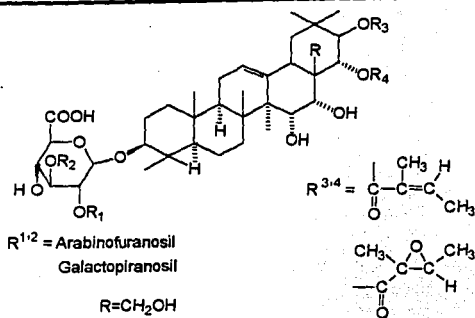
Dimbi *et al.*, 1985.

37, 22-22-diangeloato de barrigenilo

Dimbi *et al.*, 1985.

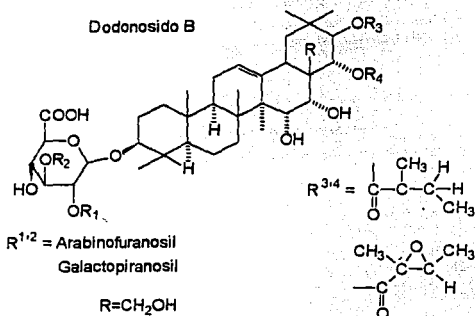
Continuación del cuadro 3

Wagner y Ludwig, 1987.

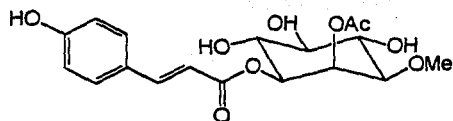


38, Dodonosido A

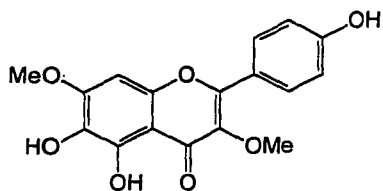
Wagner y Ludwig, 1987.



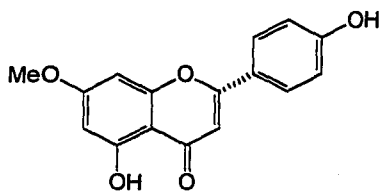
39, Dodonosido B

Mata *et al.*, 1991.40, 1-L-1-O-metil-2-acetil-3-p-cumaril-*myo*-inositol

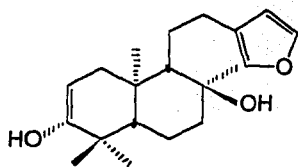
Continuación del cuadro 3

Mata *et al.*, 1991.

41, 3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona

Mata *et al.*, 1991.

42, sakuranetina

Mata *et al.*, 1991.43, ent-15,16-epoxi-9- α H-labda-
13(16)14-dien-3 β ,8 α -diol

2.3 AGENTES ANTIESPASMÓDICOS DE ORIGEN VEGETAL

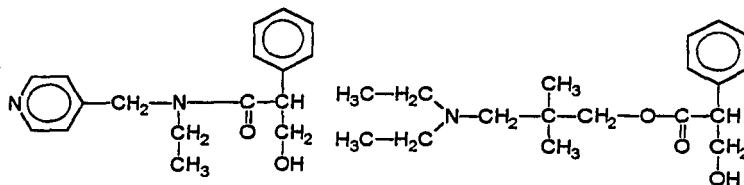
Un antiespasmódico es un compuesto que, al inducir relajación, inhibe los espasmos musculares. Los antiespasmódicos empleados para el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales son sustancias que disminuyen la función motora del músculo liso del tracto digestivo y comprenden dos grupos principales de fármacos: los antagonistas colinérgicos muscarínicos y los agonistas opiodes (Gilman *et al.*, 1992). Existen otras clases de relajantes de la musculatura lisa gastrointestinal cuyo uso terapéutico para este fin se encuentra restringido, debido a sus importantes efectos sobre otros tipos de músculo liso, entre estos compuestos se incluyen: los agonistas β adrenérgicos, las metilxantinas y los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} . Por otra parte, existen otros fármacos que, como consecuencia de o adicionalmente a su principal efecto farmacológico, relajan la musculatura lisa intestinal entre los que se pueden mencionar los anestésicos locales y los antagonistas histaminérgicos, entre otros (Gilman *et al.*, 1992).

Los antiespasmódicos de origen vegetal se pueden clasificar en cinco grupos principales, de acuerdo con su mecanismo de acción: los antagonistas colinérgicos muscarínicos, los agonistas de neuropéptidos endógenos, los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} , los inhibidores de la adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) fosfodiesterasa y los activadores de la adenilato ciclasa. Es importante hacer notar, que existen muchos productos naturales de origen vegetal con propiedades espasmolíticas cuyo mecanismo de acción no ha sido caracterizado.

ANTAGONISTAS COLINERGICOS MUSCARINICOS

Los metabolitos secundarios más importantes de este grupo son los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina. Aunque también se han descrito algunos alcaloides pirrolizidínicos con propiedades anticolinérgicas muscarínicas.

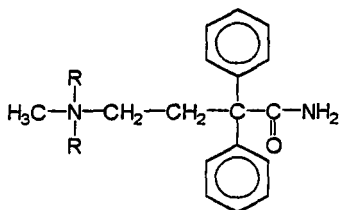
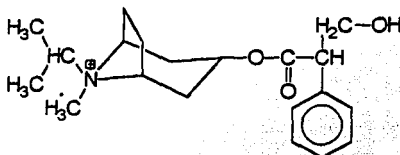
Continuación del cuadro 4



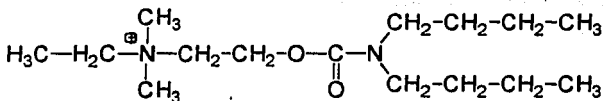
48, Tropicamida

49, Amprotopina

3. Compuestos de amonio cuaternario

50, Ambutorio (R = etil, R' = metil)
Isopropamida (R = R' = isopropil)

51, Ipratropio (Sch 1 000)



52, Dibutolina

La atropina se considera como el prototipo de los agentes antimuscarínicos y su estructura molecular ha constituido un modelo para la obtención de numerosos compuestos semisintéticos y sintéticos de acción más selectiva, sobre todo a nivel del intestino. En el Cuadro 4 se muestran las fórmulas de diversos fármacos de tipo atropínico, los cuales se dividen en dos

grupos principales: aminas terciarias y compuestos de amonio cuaternario (Foye *et al.*, 1995).

El efecto farmacológico de los bloqueadores muscarínicos es cualitativamente el opuesto al efecto de la Ach en los receptores muscarínicos: las dosis pequeñas reducen la secreción salival y bronquial y la sudoración; dosis mayores producen midriasis y bloqueo de los efectos vagales sobre el corazón, por lo que originan un aumento de la frecuencia cardíaca; dosis aún mayores inhiben el control parasimpático de la vejiga y el tracto gastrointestinal, produciendo una inhibición de la micción y de la motilidad intestinal (Londong, 1986).

La atropina y la escopolamina son bloqueadores competitivos de los receptores muscarínicos localizados en los órganos efectores inervados por el sistema nervioso autónomo parasimpático y de los receptores muscarínicos neuronales y ganglionares localizados en el sistema nervioso periférico (SNP) y en el SNC (Gilman *et al.*, 1992; Foye, 1995).

Con el objeto de facilitar la comprensión del mecanismo de acción de los antagonistas muscarínicos, a continuación se describen de manera breve los receptores colinérgicos muscarínicos y sus mecanismos de transducción de señales.

Los receptores colinérgicos se clasifican en dos grupos principales: nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos son canales iónicos abiertos por ligando cuya activación provoca un aumento rápido en la permeabilidad celular al Na^+ y al K^+ , despolarización y excitación (Gilman *et al.*, 1992). Por otra parte, los receptores muscarínicos pertenecen a la clase de los receptores acoplados a proteína G (Haga, 1985)

Los receptores muscarínicos son glucoproteínas con pesos moleculares de aproximadamente 80 KDa y, como ya se mencionó, pertenecen a una superfamilia de proteínas receptoras cuyas funciones están mediadas por interacción con proteínas G (Haga *et al.*, 1985; 1986). Estos receptores constan

de 400-600 residuos de aminoácidos con un arreglo de siete segmentos transmembranales, en el cual el grupo COOH se localiza en la región extracelular y el grupo NH₂ terminal se localiza intracelularmente. El sitio de unión para la Acetilcolina (ACh), sus agonistas y antagonistas, se encuentra en el interior del haz de hélices que se localiza extracelularmente, de tal forma que la unión al ligando puede inducir un cambio conformacional en la superficie citoplasmática del receptor (Bonner, 1989) (Figura 1).

La proteína G acoplada al receptor membranal muscarínico, actúa como un enlace entre el sitio de unión al ligando en la superficie celular y la enzima localizada en el lado citoplásmico de la membrana celular. La proteína G está unida a la superficie interna de la membrana plasmática y consiste de tres subunidades designadas como α , β y γ . Cuando el sistema se encuentra en fase inactiva porque no existe unión de ligando en el receptor membranal, el difosfato de guanina (GDP) se une a la subunidad α . En el momento en que se une un ligando (agonista) al receptor membranal, aumenta la afinidad de la subunidad α por el trifosfato de guanina (GTP). La fijación de GTP activa la subunidad α y entonces el complejo α -GTP se disocia del complejo $\beta\gamma$, el cual se une a la enzima efectora asociada modificando su actividad (Figura 2). Las enzimas efectoras cuya función se encuentra regulada por proteínas G acopladas a receptores colinérgicos muscarínicos son la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C (Gilman *et al.*, 1992).

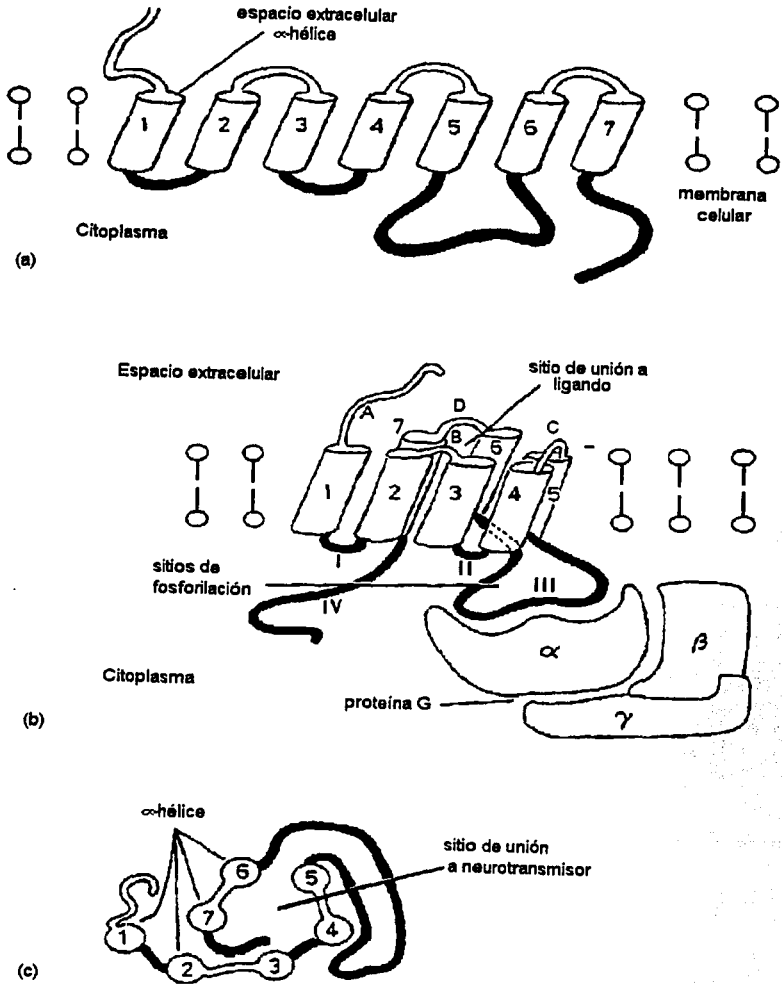
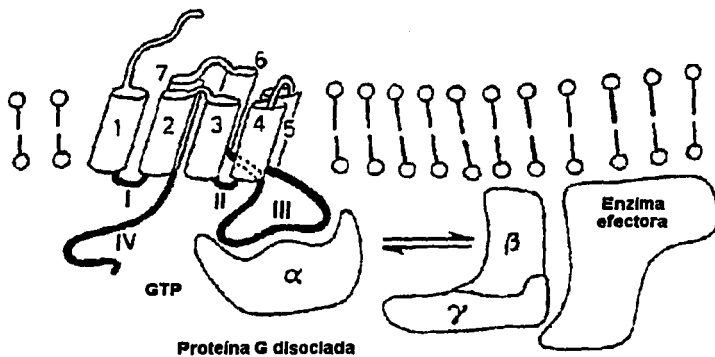
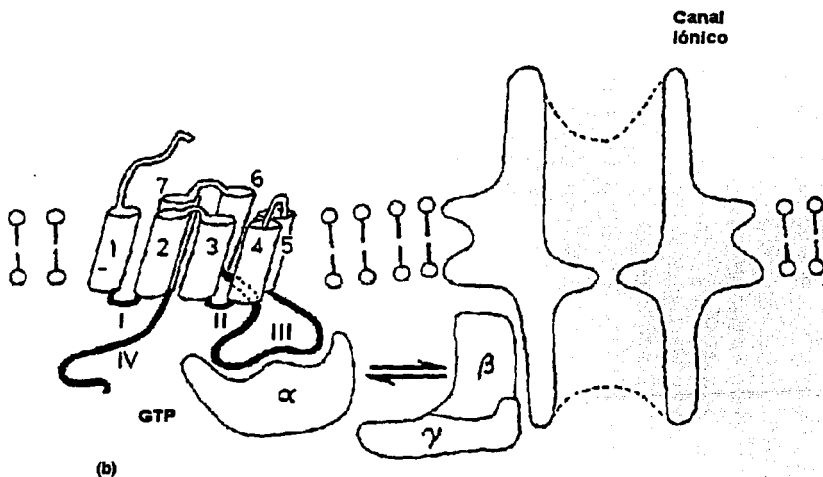


Figura 1. Representación del receptor muscarínico.



(a)



(b)

Figura 2. Activación de: a) una enzima efectora o b) un canal iónico por la interacción de un receptor con su ligando mediante una proteína G.

Actualmente se han detectado, por clonación molecular, cinco subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos designados como M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5 (Bonner, 1989). Los receptores M_1 se localizan en los ganglios y en varias glándulas secretoras; los receptores M_2 predominan en el miocardio y también parecen encontrarse en el músculo liso; los receptores M_3 se localizan en el músculo liso y las glándulas secretoras y existe poca información con relación a la localización de los receptores M_4 y M_5 . Los cinco subtipos de receptores se localizan en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Gilman *et al.*, 1992).

Los receptores muscarínicos actúan por dos vías, dependiendo de la enzima efectora acoplada a la proteína G asociada al receptor. Los receptores M_1 , M_3 y M_5 parecen activar una proteína G que es la responsable de la estimulación de la actividad de la fosfolipasa C; el resultado es la hidrólisis de los polifosfatos de fosfatidilinositol membranales para formar polifosfatos de inositol. Algunos de los isómeros del polifosfato de inositol, principalmente el inositol-1,4,5 trifosfato, producen una liberación de Ca^{2+} intracelular de los depósitos en el retículo endoplásmico. De tal forma, que estos receptores median fenómenos Ca^{2+} -dependientes como la contracción del músculo liso y la secreción (Berridge, 1988). El otro producto de la reacción de la fosfolipasa C, el diacilglicerol, activa con el Ca^{2+} una proteína cinasa C, modulando la actividad de diferentes sistemas enzimáticos (Nishizuka, 1986).

Los receptores M_2 y M_4 interactúan con proteínas G_i produciendo inhibición de la adenilato ciclasa, activación de los canales de K^+ y modulación de la actividad de los canales de Ca^{2+} en ciertos tipos celulares (Gilman, 1987). Las consecuencias funcionales de estos efectos son más evidentes en el miocardio, donde la inhibición de la adenilato ciclasa y la activación de los canales de K^+ podrían explicar los efectos ionotrópicos y cronotrópicos negativos de la Ach (Gilman *et al.*, 1992).

Tanto la atropina como la escopolamina son antagonistas colinérgicos muscarínicos no selectivos, que deben su efecto relajante de la musculatura

lisa gastrointestinal principalmente a su interacción y bloqueo de los receptores muscarínicos M_3 y M_1 , (Gilman *et al.*, 1992). Se ha propuesto que estos alcaloides tropánicos así como la Ach, requieren una conformación específica para interactuar con los receptores muscarínicos (Figura 3). En el caso de la Ach, se propone que los únicos grupos que interactúan con el receptor son el grupo catiónico amino cuaternario $[-N+(CH_3)_3]$ y el grupo metilo C(7), el primero mediante fuerzas electrostáticas y el segundo por fuerzas de Van der Waals. La distancia del plano que contiene los hidrógenos del C(7) al residuo catiónico en la Ach es muy similar a la distancia entre el anillo benzénico y el átomo de nitrógeno en la atropina (575 y 625 pm, respectivamente), indicando que ambas moléculas interactúan con el receptor muscarínico en el mismo sitio y de manera semejante. Las interacciones de Van der Waals del grupo metilo C(7) en la Ach es paralela a la interacción del anillo benzénico plano de la atropina; en tanto que los átomos de nitrógeno cargados positivamente interactúan con el mismo sitio aniónico en el receptor.

Las características estructurales que distinguen a los antagonistas muscarínicos parecen ser: a) la presencia de un grupo lipofílico capaz de interactuar con el receptor muscarínico mediante fuerzas de Van der Waals a una distancia de un grupo nitrógeno cargado positivamente semejante a la distancia entre el metilo C(7) y el nitrógeno en la Ach y b) la presencia de un grupo nucleofílico adicional, OH (3) en el caso de la atropina, en una relación espacial similar a la existente en la molécula de atropina (Pauling y Petcher, 1970; Foye *et al.* 1995).

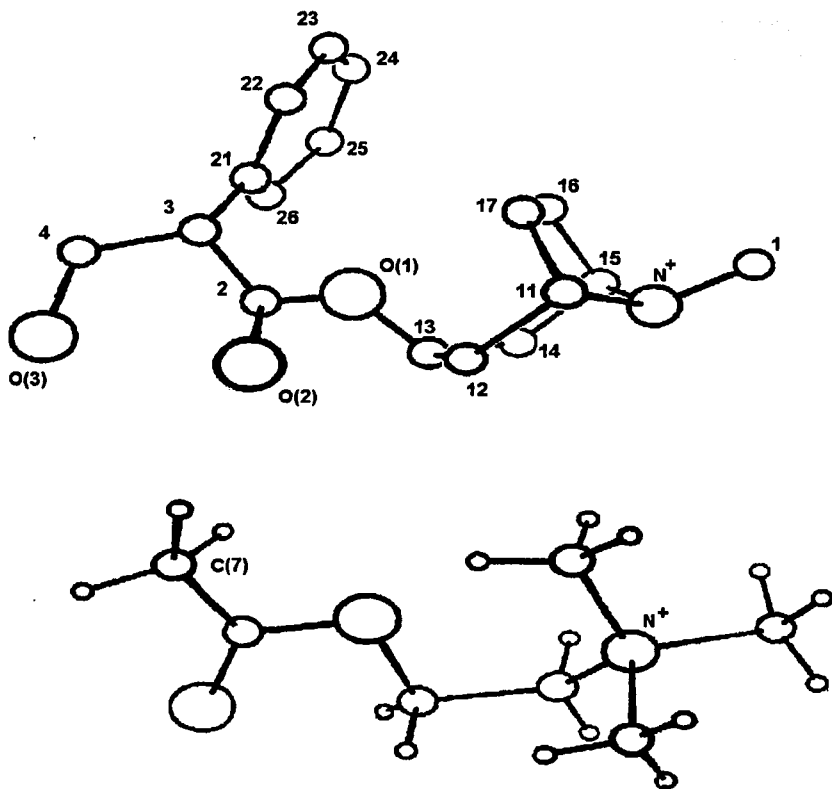


Figura 3. Conformación requerida para la interacción de las moléculas de la Ach y la atropina con los receptores colinérgicos muscarínicos.

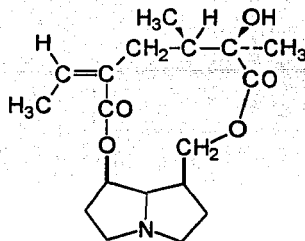
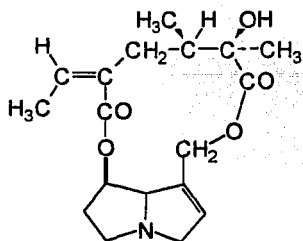
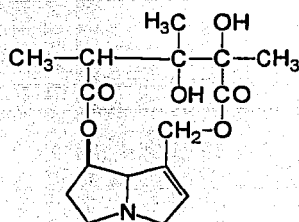
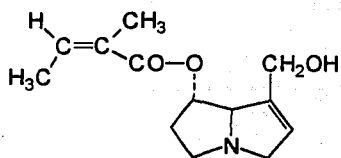
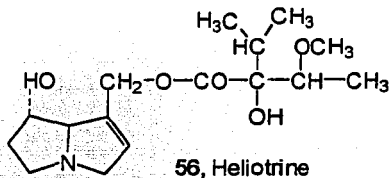
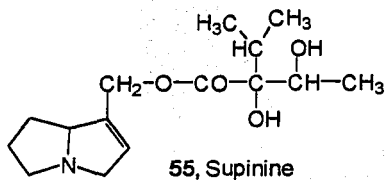
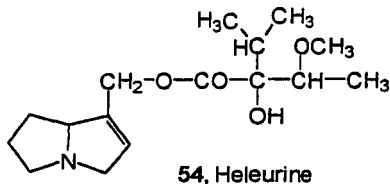
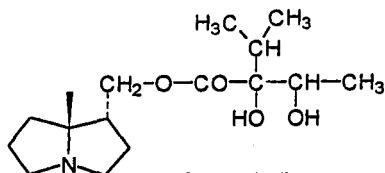
Alcaloides pirrolizidínicos con acción anticolinérgica muscarínica

Otro grupo de metabolitos secundarios a los que se les ha demostrado un efecto antiespasmódico relacionado con un bloqueo de los receptores muscarínicos, es el de los alcaloides pirrolizidínicos (Pomeroy y Raper, 1971; Hattocks, 1986 y referencias allí citadas). Este tipo de alcaloides se encuentra distribuido en diversas familias de plantas, que se han utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes afecciones. Sin embargo, el interés en el estudio de los alcaloides pirrolizidínicos ha disminuido debido principalmente a su hepatotoxicidad (Shoental, 1957; Culvenor *et al.*, 1962; Hattocks, 1986).

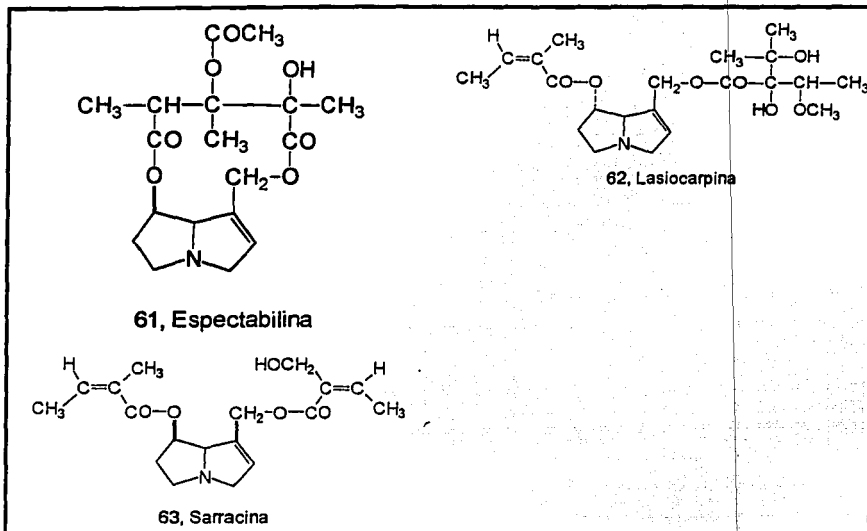
Pomeroy y Raper (Pomeroy y Raper, 1971) describieron la evaluación del efecto antiespasmódico de 11 alcaloides pirrolizidínicos, empleando una preparación de ileón aislado de cobayo (Cuadro 5). Los resultados de dicha investigación demostraron que estos metabolitos pueden dividirse en dos grupos, de acuerdo a su mecanismo de acción antiespasmódica. El primer grupo incluye pirrolizidinas que producen un bloqueo competitivo de los receptores colinérgicos muscarínicos (la platifilina, la cinaustralina, la heleurina y la supinina). El segundo grupo está constituido por pirrolizidinas con un mecanismo de acción inespecífico (la senecionina 59, la heliotrina 56, la 7-angelato-heiotridina 57, la sarracina 63, la espectabilina 61, la lasiocarpina 62 y la monotrotalina 58).

Los alcaloides pirrolizidínicos con posible actividad antimuscarínica poseen características estructurales similares a las de los antagonistas muscarínicos clásicos: un átomo de nitrógeno terciario, un enlace éster y grupos hidroxilos y alquilos. Mas aún, su estructura molecular indica que estos compuestos pueden adoptar una conformación que les permite unirse a todos los sitios de unión propuestos para los antagonistas de los receptores muscarínicos (Pomeroy y Raper, 1971).

Cuadro. 5 Alcaloides pirrolizidínicos relajantes de la musculatura lisa.



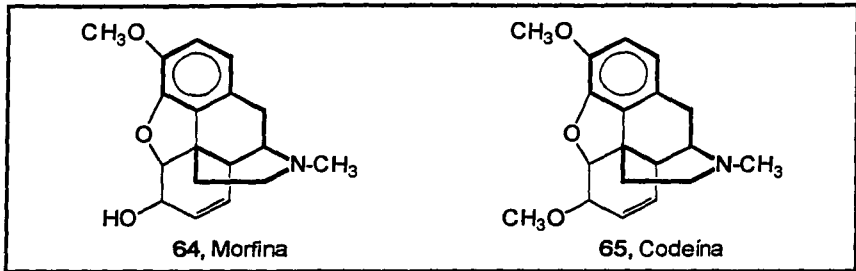
Continuación del cuadro 5

**AGONISTAS OPIOIDES**

Otro grupo importante de antiespasmódicos de origen vegetal incluye a los alcaloides del opio: morfina y codeína, que constituyen los únicos agonistas opioides aislados de fuentes vegetales.

El opio es el látex desecado que se obtiene por la incisión de las cápsulas de semillas inmaduras del *Papaver somniferum* Linné o su variedad *album* DeCandolle (Fam. Papaveraceae). A partir del opio se han aislado más de treinta alcaloides, entre los que destacan: la morfina, que se encuentra en una proporción de 4 a 21%; la codeína, de 0.8 a 2.5%; la noscapina, de 4 a 8%; la papaverina, de 0.5 a 2.5%; y la tebaína, de 0.5 a 2% (Tyler *et al.*, 1989) (Cuadro 6).

• Cuadro 6. Agonistas opiodes aislados del *Papaver somniferum*.



Considerando que la morfina y la codeína son agonistas directos de neuropéptidos opiodes, a continuación se describen algunos aspectos de los receptores opiodes que facilitarán la comprensión del mecanismo de acción de estos alcaloides.

Los péptidos opiodes constituyen el grupo de neuropéptidos más estudiado, cuya distribución celular y función se localiza principalmente en el CNS y en el tracto gastrointestinal. Actualmente se reconocen tres distintas familias químicas de neuropéptidos opiodes, las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas. Asimismo, existen evidencias, que apoyan la existencia de tres categorías principales de receptores opiodes, que se designan con las letras del alfabeto griego μ , κ y δ (Zukin y Zukin, 1981). Los tres tipos de receptores actúan principalmente por modulación inhibitoria de la transmisión sináptica en el SNC y en el plexo mientérico y se encuentran principalmente en las terminaciones nerviosas presinápticas donde su acción es el resultado de una disminución de la liberación de neurotransmisores excitadores. Los receptores μ y δ están asociados a una proteína G_i , de tal modo que la activación de los receptores origina una inhibición de la adenilato ciclasa. Sin embargo, éste no parece ser el único mecanismo involucrado en la función de estos receptores,

ya que por ejemplo, la activación de los receptores μ en las neuronas del locus caeruleus o de los receptores δ en las neuronas entéricas, produce activación de los canales rectificadores de K^+ originando una hiperpolarización de la membrana neuronal que ocasiona una reducción de la duración del potencial de acción presináptico, con la consecuente disminución de la liberación de neurotransmisores excitatorios (North y Williams, 1985). Por otra parte, la activación de los receptores κ produce un bloqueo de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo N en las neuronas del plexo mientérico y de los ganglios de las raíces dorsales (Cherubini y North, 1985). A la fecha se desconoce si estos efectos son el resultado directo de la interacción de una proteína G con el canal iónico o si implican la hidrólisis de los fosfoinositósidos (Gilman *et al.*, 1992; Foye *et al.*, 1995).

Con base en estudios de afinidad por agonistas, se han detectado dos tipos de receptores μ : los receptores μ_1 , localizados principalmente en el SNC y los receptores μ_2 localizados en el SNC y en el plexo mientérico (Gilman *et al.*, 1992).

La morfina y la codeína, al igual que todos los agonistas opioides, actúan principalmente en los receptores opioides tipo μ y tal vez en los κ y δ . Es probable que estos compuestos produzcan analgesia principalmente por su interacción con los receptores μ . Otras consecuencias de la activación de los receptores μ incluyen depresión respiratoria, miosis, reducción de la motilidad gastrointestinal y euforia. Se ha propuesto que los receptores μ_1 son los mediadores de las acciones analgésicas y que los receptores μ_2 y δ median la depresión respiratoria y la relajación de la musculatura lisa gastrointestinal (Pasternak, 1988).

En el tracto gastrointestinal, la morfina y los agonistas opioides disminuyen las secreciones gástrica, biliar, pancreática e intestinal y originan un aumento del tono basal de la porción antral del estómago y de los intestinos

delgado y grueso. Estos compuestos producen también un aumento de las contracciones intestinales rítmicas no propulsivas y una disminución del peristaltismo propulsivo; originando por lo tanto, que la circulación del contenido intestinal se retrase y, en consecuencia, se aumente la absorción de agua. Adicionalmente, el tono del esfínter anal se incrementa y esto, junto con la disminución del movimiento en todo el tubo digestivo, y la deshidratación de las heces, justifica el empleo de los agonistas opioides para el tratamiento de la diarrea (Gilman *et al.*, 1992).

Se propone que la disminución del peristaltismo producida por la morfina, la codeína y los agonistas opioides, probablemente se debe a su interacción con receptores μ_2 presentes en las fibras nerviosas posganglionares parasimpáticas, la cual origina una disminución de la liberación de Ach a partir de las terminales axónicas de las neuronas colinérgicas del plexo de Auerbach en el intestino (Coupar, 1987).

Los agonistas opioides constituyen los medicamentos básicos para el tratamiento farmacológico inespecífico de la diarrea. Aunque durante mucho tiempo se utilizaron soluciones hidroalcohólicas de polvo de opio, ahora se prefiere el uso de los agonistas opioides sintéticos tales como el difenoxilato, la loperamida y difenoxina, que producen una disminución de la motilidad intestinal y contrarrestan la secreción excesiva que acompaña a algunas formas de diarrea (Gilman *et al.*, 1992).

BLOQUEADORES DE CANALES DE Ca^{2+} DE ORIGEN VEGETAL

A partir de especies vegetales se han aislado numerosos metabolitos secundarios que tienen la propiedad de bloquear, específica o inespecíficamente, canales de Ca^{2+} . La diversidad estructural de estos compuestos incluye principalmente, alcaloides, flavonoides, terpenoides y cumarinas.

Con el objeto de comprender el mecanismo de acción de estos compuestos, en primer término se harán algunas consideraciones generales

acerca de los canales de Ca^{2+} , el papel del Ca^{2+} en la regulación de la contracción muscular y de los bloqueadores de canales de Ca^{2+} sintéticos y su aplicación terapéutica.

Canales de Ca^{2+}

La concentración intracelular de Ca^{2+} desempeña un papel crucial en la regulación de la actividad celular, controlando actividades como la secreción, la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, la actividad enzimática y la apertura de canales iónicos, entre otras (Hofmann *et al.*, 1994).

La entrada de calcio al interior de las células se lleva a cabo a través de canales localizados en la membrana plasmática y ocurre como respuesta a la despolarización membranar, en cuyo caso se activan canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, o mediante la estimulación de receptores a neurotransmisores activándose canales de Ca^{2+} ligando-dependientes (Hofmann *et al.*, 1994).

El flujo de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales voltaje-dependientes es responsable de: el acoplamiento excitación-contracción de la musculatura lisa, cardíaca y esquelética; la síntesis y liberación de neurotransmisores; la despolarización de los nodos sinoauricular y aurículo ventricular; la activación de diversos sistemas enzimáticos; la quimiotaxis y la diferenciación celular (Hagiwara y Yoshikami, 1981).

Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes se han dividido en dos grandes grupos: los canales activados e inactivados a bajos potenciales de membrana y los canales activados e inactivados a altos potenciales membranar. Dentro del primer grupo se encuentran los llamados canales T, en tanto que el segundo grupo se ha subdividido en cuatro clases distintas que incluyen: canales B (brain channels), canales L (long lasting channels), canales P (Purkinje channels) y canales N (neither L nor T channels). Los canales tipo B, L, P y N son activados a altos potenciales de membrana (aproximadamente 30 mV), se inactivan lentamente (son de larga duración) y se expresan en células neuronales y no neuronales (Tsien *et al.*, 1991).

Los canales de Ca^{2+} tipo L se expresan en células neuronales y endocrinas; en células de músculo liso, esquelético y cardíaco; en los fibroblastos y en los riñones. En el músculo esquelético son esenciales para el proceso de acoplamiento excitación-contracción (Rios *et al.*, 1992). En el

corazón, son necesarios para la generación y propagación de los impulsos eléctricos y para la iniciación de la contracción en el músculo auricular y ventricular. En el músculo liso están involucrados en el proceso de contracción, para el cual proveen parte del calcio necesario. Sin embargo, no están involucrados en la liberación de neurotransmisores, ya que este proceso, esta ligado en varias células neuronales a canales tipo N. Por otra parte, los canales tipo B constituyen el mayor tipo de canales de Ca^{2+} distribuidos en las neuronas (Hofman *et al.*, 1994).

La gran mayoría de los estudios realizados sobre la estructura molecular de los canales de calcio se han llevado a cabo en canales purificados de músculo esquelético. El canal de Ca^{2+} tipo L aislado de músculo esquelético esta compuesto de cuatro proteínas (Figura 4): la subunidad α_1 (212 kDa), que contiene los sitios de unión para todos los bloqueadores de Ca^{2+} conocidos, el sensor de voltaje y el poro conductor de calcio; la subunidad β (57 kDa) localizada intracelularmente; la subunidad transmembranal γ (25 kDa); y la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$, un dímero unido por puente disulfuro de 125 kDa (Hofman *et al.*, 1994).

Regulación de la contracción del músculo liso por el Ca^{2+}

Las células del músculo liso contienen las proteínas contráctiles actina, miosina y tropomiosina. La miosina, que tiene una actividad ATP-asa dependiente de Mg^{2+} y activada por la interacción con actina y calmodulina, es la principal proteína de los filamentos gruesos de la célula del músculo liso y se compone de dos subunidades de elevado peso molecular y cuatro subunidades de bajo peso molecular o cadenas ligeras. El peso molecular de cada subunidad de cadena pesada es de aproximadamente 200,000 daltons, en tanto que dos de las subunidades de cadenas ligeras pesan 20,000 daltones y las otras dos pesan 17,000 daltones.

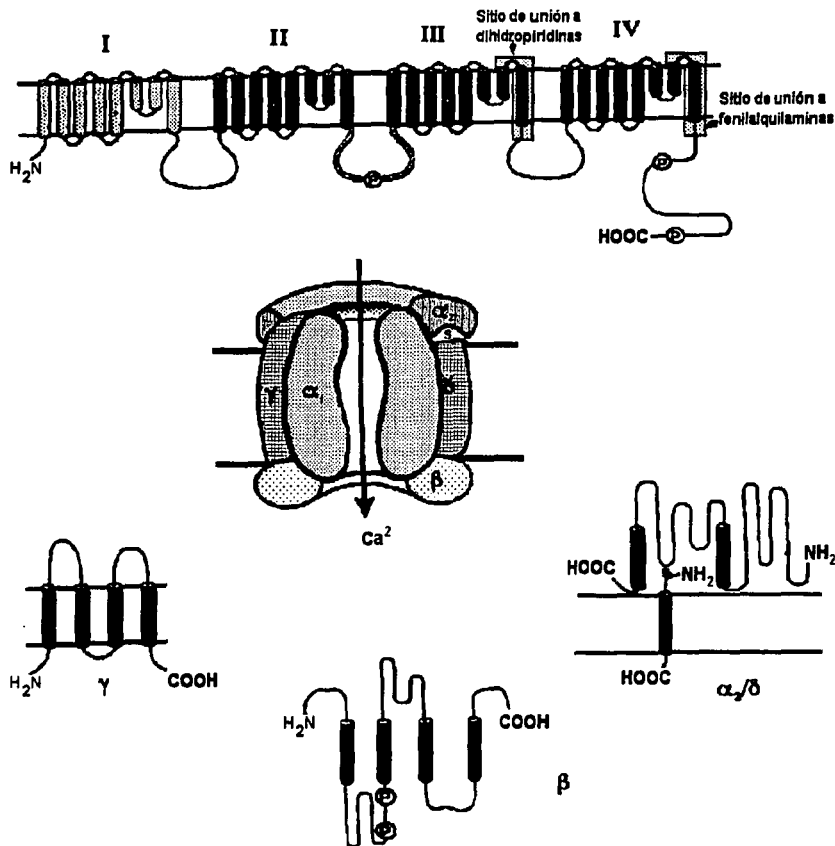


Figura 4. Representación del canal de Ca^{2+} -voltaje dependiente tipo L.

La forma hexamérica de la miosina se encuentra configurada en tres regiones, una de ellas forma una especie de "cola enrollada" contenida en el filamento grueso y las otras dos regiones forman "cabezas" que sobresalen del filamento grueso para formar puentes. Las regiones "cabeza" contienen los

dominios de unión a actina y el sitio catalítico para la hidrólisis de ATP. De acuerdo con la "teoría del deslizamiento de filamentos" de la contracción muscular, los filamentos gruesos (miosina) y los filamentos delgados (actina y tropomiosina) se deslizan traslapándose entre ellos, en un proceso que involucra la formación de enlaces a través de puentes cruzados entre la miosina y la actina con la correspondiente hidrólisis de ATP como suplemento de energía (Kamm y Stull, 1985).

Las interacciones entre actina y miosina en el músculo liso se encuentran reguladas por Ca^{2+} mediante diferentes mecanismos bioquímicos que comprenden procesos regulatorios en los filamentos gruesos y delgados. Durante la iniciación de la contracción, la concentración de Ca^{2+} intracelular aumenta mediante la activación de canales de Ca^{2+} membranales (principalmente canales tipo L) y/o mediante la liberación de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares. En la regulación de los filamentos gruesos, el Ca^{2+} se une a la calmodulina y el complejo calmodulina- Ca^{2+} se une y activa una cinasa de la cadena ligera de miosina de 20,000 daltones. La activación de esta protein cinasa resulta en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (cadena ligera P) estimulando la actividad ATPasa del complejo miosina-actina (Adelstein y Eisenberg, 1980).

La combinación del arreglo estructural y las propiedades enzimáticas de las proteínas contráctiles en la célula muscular actúa como un sistema de transducción químico-mecánico, convirtiendo la energía de hidrólisis de ATP en trabajo mecánico, el cual se expresa como fuerza en las contracciones isométricas y como acortamiento en las contracciones isotónicas: En la teoría del "deslizamiento de filamentos" la fuerza desarrollada se atribuye al número de puentes cruzados que se establecen entre las cadenas de miosina y actina, proceso que depende de la energía proporcionada por la hidrólisis de ATP (Kamm y Stull, 1985).

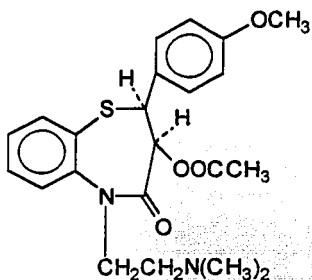
Bloqueadores de canales Ca^{2+}

Los bloqueadores de la entrada de Ca^{2+} constituyen un grupo muy heterogéneo de compuestos químicos que actúan principalmente a través de interacciones con sitios específicos en la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L. Estas sustancias bloqueadoras de los canales de

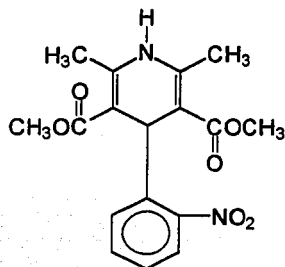
Ca^{2+} inhiben el influjo de Ca^{2+} en las células excitables de músculo liso, esquelético y cardíaco (Godfrain *et al.*, 1986).

Las principales categorías estructurales de los bloqueadores de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L con aplicación terapéutica incluyen: las fenilalquilaminas como el verapamil; las benzotiazepinas como el diltiazem y las 1,4-dihidropiridinas como la nifedipina (Cuadro 7).

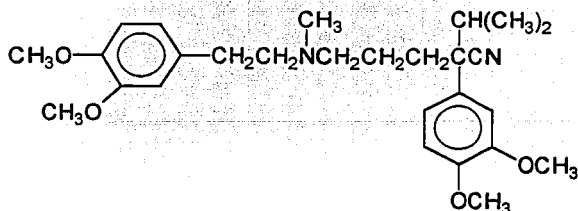
Cuadro 7. Bloqueadores de canales de calcio de uso clínico.



66, Diltiazem



67, Nifedipina



68, Verapamil

Las aplicaciones terapéuticas más importantes de estos compuestos se basan en sus efectos cardiovasculares, que incluyen una acción vasodilatadora

que reduce la tensión arterial induciendo reflejos simpáticos que dan como resultado un aumento en la frecuencia cardíaca e inotropismo positivo. Por esta razón, los bloqueadores de canales de Ca^{2+} son utilizados en el tratamiento de numerosas enfermedades cardiovasculares, tales como la hipertensión arterial, la angina de pecho y la insuficiencia cardíaca, entre otras. Se emplean también en casos de diversos trastornos cerebrovasculares, como el vasoespasmio cerebral secundario a una hemorragia subaracnoidea y el ictus agudo isquémico, así como en la profilaxis y el tratamiento de la migraña. De manera adicional, los bloqueadores de canales de Ca^{2+} producen un efecto espasmolítico generalizado en el músculo liso de tracto gastrointestinal, bronquial, uretral, y uterino, por lo que también se emplean para tratar los espasmos esofágicos e intestinales, la incontinencia urinaria, la enuresis nocturna, la vejiga irritable y las dismenorreas. En las mujeres embarazadas, estos fármacos reducen la presión intrauterina y atenúan las contracciones uterinas espontáneas o inducidas por prostaglandinas y oxitocina, por lo que pueden ser útiles para prevenir o retrasar el parto prematuro (Gilman *et al.*, 1992).

Bloqueadores de canales de Ca^{2+} aislados a partir de especies vegetales

Los bloqueadores de canales de Ca^{2+} de origen natural mejor caracterizados son los alcaloides benciltetrahydroisoquinolínicos y bis-benciltetrahydroisoquinolínicos aislados de diversas fuentes vegetales (Cuadro 8).

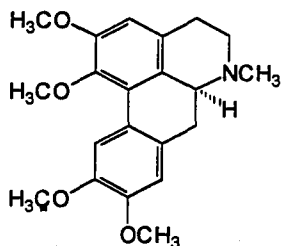
Mediante el empleo de técnicas de afinidad, utilizando ligandos radiactivos, se ha demostrado que, tanto los alcaloides benciltetrahydroisoquinolínicos como los bis-benciltetrahydroisoquinolínicos, se unen a la subunidad α_1 del canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L en el mismo sitio en el que se unen los bloqueadores de tipo benzotiazepina, modulando alostéricamente las propiedades del canal (King *et al.*, 1988, Triggle *et al.*, 1989; Ivorra *et al.*, 1993; Chuliá *et al.*, 1994).

Los resultados de los estudios realizados, parecen indicar que las características estructurales de los alcaloides bencilisoquinolínicos que definen una actividad relajante muscular específica, mediante el bloqueo de canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L, están relacionadas con la geometría de las

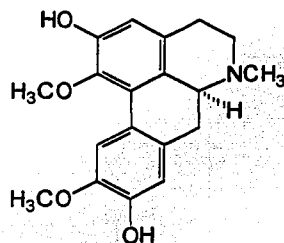
moléculas, la cual está definida por la presencia de un átomo de nitrógeno con hibridación sp^3 , un centro quiral y un anillo tetrahidroisoquinolínico parcialmente flexible (Chuliá *et al.*, 1994).

Cuadro 8. Ejemplos de alcaloides benciltetrahidroisoquinolínicos y bis-benciltetrahidroisoquinolínicos bloqueadores de canales de calcio.

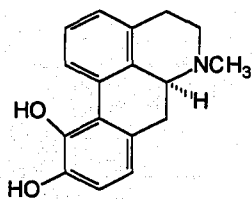
1. Alcaloides benciltetrahidroisoquinolínicos



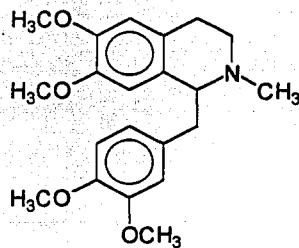
69, S-Glaucina



70, S-Boldina

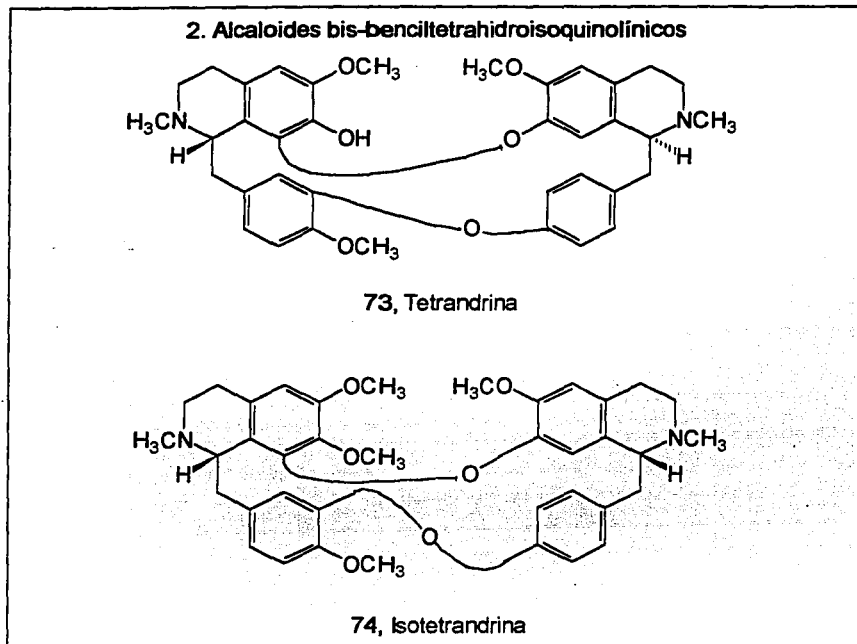


71, R-Apomorfina



72, Laudanosina

Continuación del cuadro 8

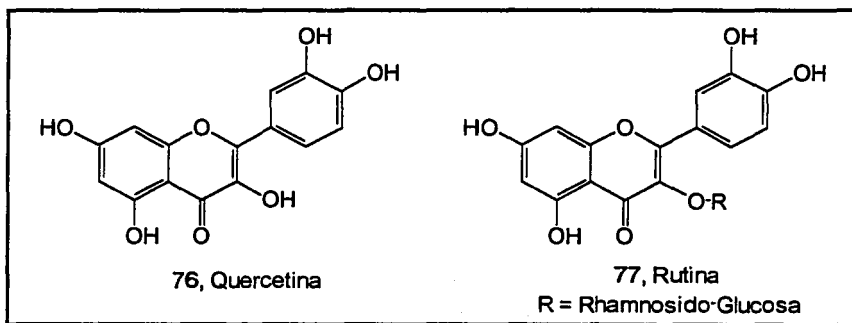


Más aún, en la serie de alcaloides bisbenciltetrahidroisoquinolínicos, la configuración absoluta del carbono quiral, contribuye también a la especificidad de la interacción con el canal de Ca^{2+} . Se observa, por ejemplo, que los alcaloides con una configuración absoluta $1S,1'S$, como en el caso de la tetrandrina **73**, producen un bloqueo más específico del canal de Ca^{2+} , que los correspondientes alcaloides con una configuración $1R,1'S$, como en el caso de la isotetrandrina **74** (Anselmi *et al.*, 1994).

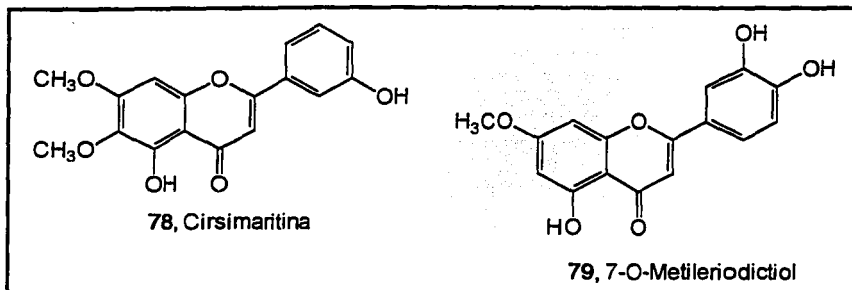
Los flavonoles y algunas flavonas constituyen otro grupo de metabolitos secundarios a los que se les ha demostrado una actividad relajante de la musculatura lisa, asociada con un bloqueo de canales de Ca^{2+} . Entre los

flavonoides cuya actividad antiespasmódica se ha comprobado, se encuentran: la quercetina **76**, el kaempferol, la rutina **77**, la 3,3'-di-O-metilquercetina, la apigenina y la cirsimaritina **78**, entre otros (cuadro 9) (Morales y Lozoya, 1993; Abdalla *et al.*, 1989; Abdalla y Abu Zarga, 1986; Bergendorff y Sterner, 1995). La mayoría de estos compuestos, se han aislado a partir plantas con reputación como agentes espasmolíticos en la medicina popular y constituyen los principios activos de las mismas. Así por ejemplo, la quercetina, la apigenina, la luteolina y la patuletina, constituyen los principios relajantes de la musculatura lisa de la *Matricaria chamomilla*, especie utilizada a nivel mundial para el tratamiento de cólicos del tracto gastrointestinal (Achtterath-Tuckermann *et al.*, 1980). Otro ejemplo que recientemente ha recibido mucha atención a nivel nacional es la *Psidium guajava*, planta que se emplea en la medicina popular para el tratamiento de la diarrea. Esta especie presenta un alto contenido de quercetina, que constituye el principio activo espasmolítico (Morales y Lozoya, 1993; Lozoya *et al.*, 1994).

Cuadro 9. Ejemplos de flavonoides bloqueadores de canales de calcio.



Continuación del cuadro 9



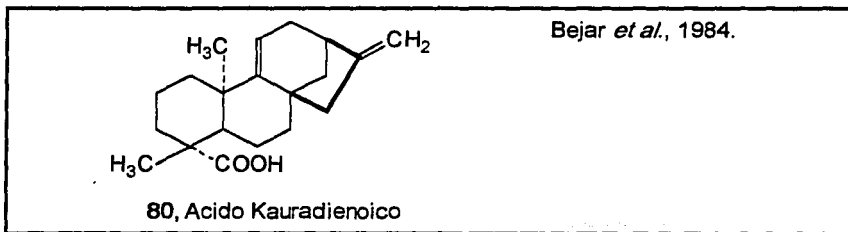
Es importante mencionar que la propuesta de que los flavonoides interfieren con el influjo de Ca^{2+} al interior de las células musculares, se ha fundamentado casi exclusivamente en resultados obtenidos a partir de estudios farmacológicos realizados *in vitro* con diferentes tejidos aislados. Estas investigaciones han permitido comprobar que estos metabolitos inhiben las contracciones del ileón de cobayo inducidas por diferentes espasmógenos con diferentes mecanismos de acción (Ach, prostaglandina E_2 , histamina, cloruro de bario, etc.), sugiriendo que los flavonoides podrían estar actuando en un paso común del mecanismo contráctil de los agonistas empleados, como podría ser la interferencia con el influjo de Ca^{2+} en los miocitos.

Indudablemente, la quercetina es el flavonoide más estudiado desde el punto de vista de su mecanismo de acción, en particular como agente bloqueador de canales de Ca^{2+} . De los diferentes estudios realizados sobre el efecto relajante muscular de la quercetina en tejidos aislados, se ha demostrado que este flavonol inhibe las contracciones evocadas por la histamina, la 5 hidroxitriptamina, la Ach, el BaCl_2 , la prostaglandina E_2 , el leucotrieno D_4 y por estimulación eléctrica en el ileón de cobayo (Capasso *et al.*, 1991; Capasso *et al.*, 1991). También se ha descrito que la quercetina produce un desplazamiento a la derecha de las curvas de Ca^{2+} en tejidos aislados de ileón y de aorta despolarizados con altas concentraciones de K^+ , sugiriendo una inhibición no competitiva de la entrada de Ca^{2+} mediante el bloqueo que canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L (Morales *et al.*, 1994;

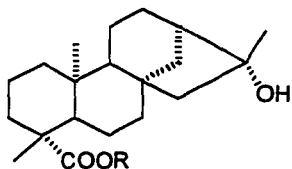
Morales y Lozoya, 1994). En tejido de aorta, la quercetina no inhibe las contracciones inducidas por cafeína, agonista que promueve la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplásmico, razón por la cual se propone que este compuesto no modifica la extrusión de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Morales y Lozoya, 1994).

Existen otras clases de metabolitos secundarios relajantes de la musculatura lisa a los cuales, con base exclusivamente en estudios farmacológicos realizados *in vitro* con diferentes tejidos aislados, se les atribuye la propiedad de bloquear canales de Ca^{2+} . Entre estos compuestos se encuentran algunos monoterpenoides simples tales como el timol y el carvacrol (Van Den Broucke y Lemli, 1982; Van Den Broucke y Lemli, 1982) y monoterpenoides de tipo iridoide como la aucubina y el catalpol (Ortiz de Urbina *et al.*, 1993); diterpenoides de tipo kaureno, como el ácido kauradienoico **80**, el ácido 16 α -hidroxi-ent-kauran-19-oico **81** y su ester metílico (Bejar *et al.*, 1984; Ponce-Monter *et al.*, 1988); el alcaloide tipo acridona, citracridona **82** (Yang *et al.*, 1986); la cumarina, ostrutol **83** (Rauwald *et al.*, 1994) y la cromona, visnadina (Rauwald *et al.*, 1994) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Ejemplos de metabolitos secundarios bloqueadores de canales de calcio.



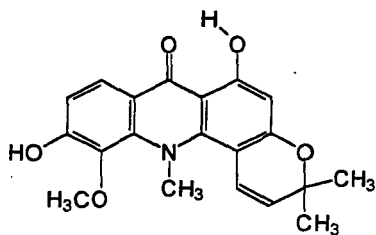
Continuación del cuadro 10



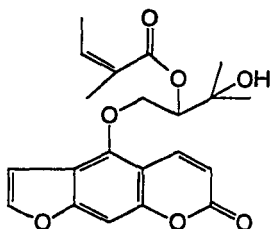
R = H

81, Acido 16 α -hidroxi-ent- kauran-19-oico

Ponce-Monter, 1988.



82, Citracridona-1

Yang *et al.*, 1986.

83, Ostrutol

Rauwald *et al.*, 1994.

La capacidad de estos compuestos para bloquear las contracciones inducidas por Ca^{2+} en diferentes tejidos aislados (útero, íleo o aorta) despolarizados con altas concentraciones de K^+ , permitió caracterizarlos como posibles bloqueadores de canales de Ca^{2+} . Cabe mencionar que la despolarización con K^+ abre canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L y las contracciones musculares evocadas por concentraciones aditivas de Ca^{2+}

dependen exclusivamente del influjo de Ca^{2+} al interior de la célula muscular (Granger *et al.*, 1986; Varagic *et al.*, 1984).

INHIBIDORES DE LA ADENOSIN 3'5'-MONOFOSFATO CICLICO (AMPc) FOSFODIESTERASA

El compuesto más importante de este grupo de antiespasmódicos de origen vegetal es la papaverina, la cual se considera como el prototipo de los denominados relajantes musculares inespecíficos, ya que no interactúa con ningún tipo de receptor membranal (Bolton, 1979).

La papaverina (Figura 5) es uno de los alcaloides bencilisoquinolínicos del opio; a diferencia de la morfina y la codeína, no interacciona con los receptores a péptidos opiodes y por lo tanto carece de las acciones narcóticas y analgésicas de aquellos.

Se ha demostrado que la relajación de la musculatura lisa inducida por la papaverina se debe a la inhibición de la adenosin 3',5'- monofosfato cíclico (AMPc) fosfodiesterasa con la subsecuente acumulación de adenosin-3',5'- monofosfato cíclico (AMPc) en la célula muscular (Demesy y Stoclet, 1972; Lugnier *et al.*, 1972; Triner *et al.*, 1970). Asimismo, existen evidencias de que la papaverina, también interfiere de manera inespecífica con la entrada de calcio en las células musculares (Schneider *et al.*, 1975; Reinhardt *et al.*, 1977).

La acumulación de AMPc en la célula muscular produce una disminución de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma. Esta disminución de los niveles de Ca^{2+} se realiza mediante los siguientes procesos: a) un aumento de la captura de Ca^{2+} en los depósitos intracelulares; b) un incremento del eflujo de Ca^{2+} mediante la activación de la actividad de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ dependiente de AMPc, lo que ocasiona la extrusión de Ca^{2+} por el mecanismo de intercambio $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ y c) la activación de una proteína cinasa dependiente de AMPc que, al fosforilar la cinasa de la cadena ligera P de miosina, la inactiva inhibiendo el proceso de fosforilación de la miosina, que es necesario para activar la actividad ATPasa del complejo miosina-actina indispensable para la contracción muscular (Cumiskey y Feigenson, 1983).

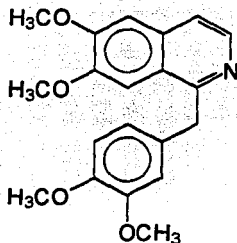


Figura 5. Estructura química de la papaverina

ACTIVADORES DE LA ADENILATO CICLASA

El producto natural más importante de este grupo es la forskolina (Figura 6), diterpeno aislado a partir de las raíces de *Coleus forskohli*. Esta sustancia produce relajación de la musculatura lisa mediante la activación de la adenilato ciclasa, posiblemente estimulando directamente el componente catalítico de la enzima (Darfler *et al.*, 1982; Adnot *et al.*, 1982; Litusch *et al.*, 1982). El efecto relajante inducido por la forskolina se debe a la acumulación de AMPc en la célula muscular, la cual produce una disminución de la concentración de Ca^{2+} en el sarcoplasma, mediante los mecanismos ya descritos para explicar la acción de la papaverina. Se ha propuesto también que la forskolina estimula directamente una Ca^{2+} -ATPasa, cuya acción es regulada por fosforilación mediante la acción de una proteína cinasa dependiente de AMPc. La estimulación de la Ca^{2+} -ATPasa, estimula el transporte de Ca^{2+} al espacio extracelular, disminuyendo por lo tanto la concentración citoplásmica de Ca^{2+} (Den Hertog *et al.*, 1985).

El empleo terapéutico de la forskolina como relajante muscular está restringido debido a que sus efectos son de corta duración y a su falta de selectividad. Sin embargo, este diterpeno constituye una herramienta importante de investigación farmacológica (Den Hertog *et al.*, 1985).

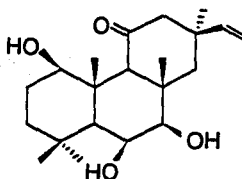
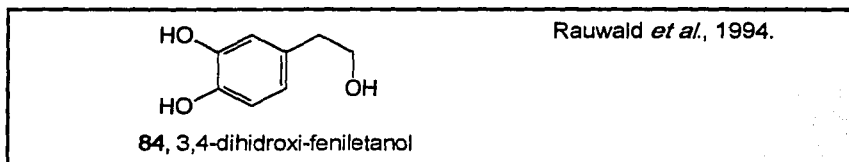


Figura 6. Estructura química de la forskolina

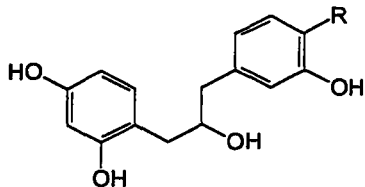
RELAJANTES MUSCULARES DE ORIGEN VEGETAL CON MECANISMO DE ACCION NO CARACTERIZADO

En el Cuadro 11 se muestran algunos ejemplos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades relajantes musculares demostradas *in vitro*, cuyo mecanismo de acción no se ha caracterizado. Estos compuestos incluyen: compuestos aromáticos simples (3,4-dihidroxiifeniletanol **84**, derivados de 1,3-diarilpropan-2-ol **85**, **86**) (Rauwald *et al.*, 1993; Hagos *et al.*, 1986); cumarinas (umbeliferona, herniarina, clausmarina A) (Achterrath-Tuckermann *et al.*, 1980; Patnaik y Dhawan, 1981); monoterpenoides (valtrato, acevaltrato, didrovaltrato, algunos derivados del eugenol **87**, **88**, **89**) (Wagner y Jurcic, 1979, Wagner *et al.*, 1979); diterpenoides (viguiepinol, sandaracopimaradien-7 α ,18 diol **90**) (Hernández-Falcón *et al.* 1991; Puyvelde *et al.*, 1987) y un sesquiterpenoide (capsidiol **91**) (Nasiri *et al.*, 1992).

Cuadro 11. Ejemplos de metabolitos secundarios relajantes de la musculatura lisa con mecanismo de acción indeterminado.

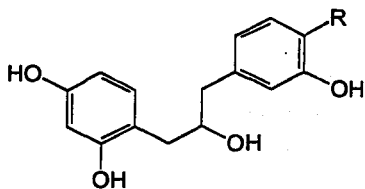


Continuación del cuadro 11



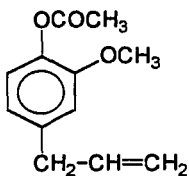
85, Quracol A
R = H

Hagos *et al.*, 1986.



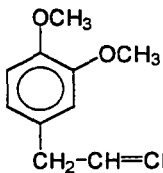
86, Quracol B
R = OH

Hagos *et al.*, 1986



87, Acetato de eugenol

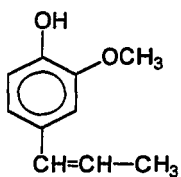
Patnaik y Dhawan, 1982.



88, Eter metílico del eugenol

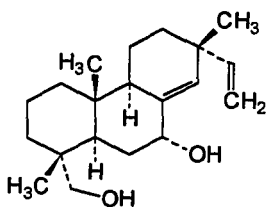
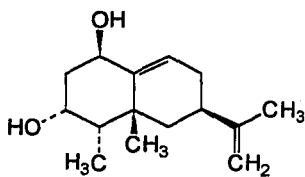
Wagner y Jurcic, 1979.

Continuación del cuadro 11



89, Isoeugenol

Wagner y Jurcic, 1979.

90, 8 (14),15-sandaracopimaradieno-
7 α ,18-diolVan Puyvelde *et al.*, 1987.

91, Capsidiol

Nasiri *et al.*, 1992.

3. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Las enfermedades gastrointestinales comprenden dos grupos generales de padecimientos. El primer grupo incluye las diarreas, de diversa etiología, que invariablemente van acompañadas de una disfunción del peristaltismo. En el segundo, se encuentran los trastornos que alteran la motilidad de la musculatura lisa gastrointestinal, entre los que se pueden mencionar: los cólicos intestinales, la emésis, el ileón adinámico y la constipación, entre otros (Gilman *et al.*, 1992). Estas enfermedades constituyen uno de los principales padecimientos de la población mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo donde las afecciones diarreicas son la causa más importante de mortalidad (Cáceres *et al.*, 1992).

En el caso particular de México, las diarreas representan el principal problema de salud pública. Según los datos estadísticos proporcionados por la Dirección General de Epidemiología de la SSA, el número de casos acumulados de enfermedades diarreicas en México durante 1994 asciende a 1 195, 579 casos. La morbilidad por esos padecimientos incluye casos de diarreas originadas por amibiasis, shigellosis, fiebre tifoidea, salmonelosis, intoxicación alimentaria bacteriana y trastornos gastrointestinales de etiología indeterminada. De estos últimos se describieron 797,680 casos; le siguen las amibiasis con 351,780 casos; salmonelosis con 26,784; intoxicación alimentaria bacteriana con 11,470; shigellosis con 5,008 y fiebre tifoidea con 2,857 casos (Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA, 1994).

Es importante destacar que las plantas medicinales constituyen el principal recurso terapéutico empleado por la población mexicana para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales. De hecho, en las prácticas médicas tradicionales de México, se estima que aproximadamente el 38% del total de plantas utilizadas en la herbolaria medicinal mexicana, se emplean para tratar disentería, cólicos intestinales dolores abdominales y otros síntomas

relacionados con el aparato digestivo. (Aguilar y Camacho, 1984; Lozoya *et al.*, 1987). Un ejemplo representativo de esta situación, se refleja en los resultados obtenidos en un estudio epidemiológico realizado entre 1982 y 1989 en 14 comunidades mayas de los altos de Chiapas. En estas comunidades indígenas, las enfermedades gastrointestinales representan el principal problema de salud, con una morbilidad del 90%. Se describe que de las 1650 especies vegetales que son empleadas con fines medicinales, 125 se utilizan para el tratamiento de diversos trastornos gastrointestinales. Más aún, en estudios recientes se ha demostrado que el 47% de estas plantas tienen actividad espasmolítica (Berlin y Berlin, 1994). Resultados similares se han encontrado en investigaciones realizadas en las comunidades de los indios Mixe de Oaxaca (Heinrich, 1992).

Desafortunadamente, a nivel nacional, la gran mayoría de estas plantas no ha sido objeto de estudios sistemáticos interdisciplinarios que permitan la validación farmacológica de su uso en la terapéutica tradicional y la caracterización de sus principios activos.

El otro recurso terapéutico empleado por una minoría de la población para tratar los trastornos gastrointestinales, incluye a los medicamentos alopáticos. Estos medicamentos comprenden dos tipos de fármacos: los que combaten a los agentes etiológicos y los que relajan o activan, según sea el caso, la musculatura lisa gastrointestinal (Gilman *et al.*, 1992). La mayoría de estos fármacos presentan una serie de desventajas, entre las que destacan: problemas de toxicidad aguda y crónica, reacciones de hipersensibilidad, gastroenteritis, reacciones del sistema nervioso, trastornos del tracto urinario y del sistema inmune, entre otros. De manera adicional, algunos de los organismos causales de enfermedades gastrointestinales han desarrollado resistencia a los antibióticos o agentes antiparasitarios de uso común (Gilman *et al.*, 1992).

Con base en estas consideraciones, resulta evidente la conveniencia de comprobar científicamente el efecto farmacológico que se les atribuye a cientos de plantas medicinales para la cura de trastornos gastrointestinales, debido a que estas especies podrían significar una vía alterna en la resolución de un problema de salud pública de nuestro país, mediante el aprovechamiento racional de los recursos naturales nacionales. Por otra parte, se requiere encontrar nuevas alternativas para la obtención de moléculas novedosas, naturales o sintéticas, que constituyan prototipos estructurales para el desarrollo de fármacos útiles, de menor toxicidad, para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales. En este sentido, la flora medicinal representa una fuente potencial valiosa de nuevos principios activos que aún no han sido explorada.

En este contexto, la presente disertación doctoral plantea un proyecto de investigación interdisciplinario con los siguientes objetivos fundamentales: 1) demostrar científicamente, mediante el empleo de los ensayos farmacológicos adecuados, el efecto antiespasmódico que se les atribuye a algunas especies selectas de la flora medicinal mexicana con la finalidad de encontrar nuevas opciones para el tratamiento de las enfermedades gastrointestinales y 2) obtener principios activos relajantes de la musculatura lisa que constituyan la base para el desarrollo de nuevos agentes antiespasmódicos con posible aplicación terapéutica.

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.1.1. Evaluar el efecto relajante de la musculatura lisa intestinal de los extractos metanólicos de ocho especies vegetales de amplio uso como agentes antiespasmódicos, mediante la determinación de su acción sobre las contracciones espontáneas del ileón aislado de rata. Las especies seleccionadas fueron: *Conyza filaginoides* (D.C) Hieron (Asteraceae), *Croton*

fragilis HBK (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* D.C. var. *stramonium* (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae) y *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae).

3.1.2. Determinar la potencia relajante de los extractos activos, mediante la comparación de sus respectivas CI_{50} , con la finalidad de seleccionar el candidato más idóneo para la obtención de principios activos portenciales con propiedades espasmolíticas.

3.1.3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas sobre 10 cepas de enterobacterias patógenas, aisladas a partir de muestras clínicas, con el objeto de comprobar si estas especies tenían un efecto antibiótico adicional a su efecto relajante. Las bacterias de prueba incluyeron: *Aeromona hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*.

3.1.4. Comprobar el efecto relajante de la musculatura lisa del extracto metanólico de la especie más potente sobre la contractilidad espontánea del íleon aislado de cobayo. Este tejido constituye un modelo farmacológico más apropiado para la evaluación de la actividad antiespasmódica en la búsqueda de nuevos agentes con propiedades espasmolíticas.

3.1.5. Obtener los principios activos antiespasmódicos de la especie más potente, mediante la realización de un estudio fitoquímico biodirigido utilizando

como ensayo de monitoreo farmacológico la evaluación del efecto sobre la contractilidad espontánea del ileón aislado de cobayo.

3.1.6 . Determinar la estructura molecular de los principios activos mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.

3.1.7. Efectuar la caracterización farmacológica preliminar de los principios activos con la finalidad de proponer su posible mecanismo de acción relajante de la musculatura lisa. Para ello se contempló la evaluación del efecto de los constituyentes activos sobre las contracciones del ileón de cobayo inducidas eléctricamente y por diversos espasmógenos (Ach, histamina y cloruro de bario).

4. RESULTADOS

Los resultados de la presente disertación se dividen en dos partes. La primera, se describe en el artículo de investigación titulado "SPASMOLYTIC POTENTIAL OF SOME PLANTS USED IN MEXICAN TRADITIONAL MEDICINE FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISORDERS" (Artículo 1), el cual fué publicado recientemente en la revista *Phytomedicine* Vol. 2 (1), pp. 51-55, 1995. En este artículo, se presentan los resultados derivados del rastreo farmacológico preliminar de las ocho especies vegetales seleccionadas para su estudio. El bioensayo empleado para la evaluación farmacológica, implicó la determinación del efecto de los extractos metanólicos de las plantas sobre la contractilidad espontánea del ileón de rata. Los resultados de estas evaluaciones demostraron el potencial antiespasmódico de las plantas y permitieron seleccionar a la *D. viscosa* como el candidato más idóneo para la obtención de principios activos con posible actividad espasmolítica. En esta publicación, también se describen los resultados derivados de la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las especies seleccionadas sobre 10 cepas de enterobacterias patógenas causales de diarrea o disentería, aisladas a partir de muestras clínicas.

La segunda parte de los resultados comprende el fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico-metanólico de *D. viscosa* con la subsecuente obtención de los principios activos antiespasmódicos. Esta parte incluye también la caracterización farmacológica preliminar del mecanismo de acción relajante de los principios activos aislados. Los resultados de esta investigación y las implicaciones de los mismos, se describen en el artículo titulado "SMOOTH MUSCLE RELAXING COMPOUNDS FROM DODONAEA VISCOSA" (Artículo 2). El artículo fué aceptado para su publicación, a reserva de realizar algunas correcciones menores, en la revista *Planta Medica*.

ARTICULO 1

**SPASMOLYTIC POTENTIAL OF SOME PLANTS USED IN MEXICAN
TRADITIONAL MEDICINE FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL
DISORDERS**

Rojas Alejandra, Cruz Silvia, Rauch Vladimir, Bye Robert, Linares Edelmira y
Mata Rachel.

PHYTOMEDICINE Vol. 2 (1), pp. 51-55, 1995

Ver original en el Apéndice I

**SPASMOLYTIC POTENTIAL OF SOME PLANTS USED IN MEXICAN
TRADITIONAL MEDICINE FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL
DISORDERS***

ROJAS ALEJANDRA^{1,2}, CRUZ SILVIA³, RAUCH VLADIMIR⁴, BYE ROBERT⁵,
LINARES EDELMIRA⁵ AND MATA RACHEL¹

1. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México.
2. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 76010, Querétaro, México.
3. Departamento de Farmacología, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV, IPN, 14000, México D.F., México.
4. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 76010, Querétaro, México.
5. Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México.

* Taken in part from the Ph.D. Thesis of A. Rojas.

ABSTRACT

The present investigation describes the effect on the isolated rat ileum of the methanolic extracts derived from *Conyza filaginoides* (D.C) Hieron (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK. (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* DC. var. *stramonium* (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H.Gross (Polygonaceae), *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae) and *Datura lanosa* Barclay ex Bye (Solanaceae). In all the cases the extracts inhibited, in a concentration-dependent manner, the spontaneous contraction of the intestinal smooth muscle. The most active extract was that of *D. viscosa*. These findings tend to support the ethnomedical uses of the selected species as spasmolytic agents in Mexican traditional medicine. Additionally, the potential antimicrobial activity of the extracts against pathogenic enterobacteria was investigated. Seven of the nine plants evaluated displayed antibacterial effects.

Keywords: *Conyza filaginoides*; *Croton fragilis*; *Dodonaea viscosa*; *Gymnosperma glutinosum*; *Parthenium tomentosum*; *Potentilla thurberi*; *Pterogonum atrorubens*; *Zornia venosa*; *Datura lanosa*; *isolated rat ileum*; *spasmolytic effect*; *smooth muscle relaxation*; *antimicrobial effect*.

INTRODUCTION

Mexican herbolaria literature refers the use of several plants for the treatment of stomachaches (with or without diarrhoea), pains of hepatic or splenic origin, uterine cholics and other disorders involving smooth muscles. However, most of these species have not yet been investigated from a pharmacological or a phytochemical point of view. Therefore, we have initiated a screening program to evaluate the spasmolytic activity of some of these species and to isolate the active constituent(s) for therapeutic exploitation.

Among the most commonly prescribed herbs to treat stomachaches, the following species were selected for their pharmacological evaluation: ***Conyza filaginoides*** (DC.) Hieron. (Asteraceae), ***Croton fragilis*** HBK. (Euphorbiaceae), ***Dodonaea viscosa*** Jacq. (Sapindaceae), ***Gymnosperma glutinosum*** (Spreng.) Less. (Asteraceae), ***Parthenium tomentosum*** DC. var. stramonium (Greene) Rollins (Asteraceae), ***Potentilla thurberi*** A. Gray (Rosaceae), ***Pterogonum atrorubens*** (Englem.) H. Gross (Polygonaceae), ***Zornia venosa*** Mohlenbr. (Fabaceae) and ***Datura lanosa*** Barclay ex Bye (Solanaceae)

Studies concerning the chemical composition of some of these species have been previously described; however neither the plants extracts nor their constituents have been studied pharmacologically. Phytochemical investigations of ***D. viscosa*** have allowed the isolation of different types of secondary metabolites including several flavonoids (Sastry and Nayudamma, 1966; Sachdev and Kulshreshtha, 1983; Mata *et al.*, 1991), some diterpenoids (Hsu *et al.*, 1971; Sachdev and Kulshreshtha, 1983; Mata *et al.*, 1991), condensed tannins (Sastry and Nayudamma, 1986), triterpenoids and two

biologically active saponins (Wagner *et al.*, 1987). Phytochemical analyses of *P. tomentosum* have revealed the presence in the plant of a number of compounds including several guaianolide type of sesquiterpene lactones (Maldonado *et al.*, 1985), a flavone (Rodríguez *et al.*, 1972) and some monoterpenoids (Kumamoto *et al.*, 1985). From *G. glutinosum* there have been isolated two flavones, three monoterpenes (Dominguez, 1974) and one diterpene (Mikayado *et al.*, 1974). α -Spinasterol and β -Amyrin were isolated from *C. filaginoides* (Dominguez, 1972) and *D. lanosa* was found to contain several tropane alkaloids including scopolamine and atropine, two well known antispasmodic agents (Bye *et al.*, 1991).

The present study was undertaken in order to confirm the spasmolytic action suggested by the traditional use of the selected species by investigating the effect of their methanolic extracts on the spontaneous contractions of the isolated rat ileum. In addition, the potential antimicrobial activity of the extracts against pathogenic enterobacteria was investigated.

MATERIALS AND METHODS.

Plant material

The plant materials used in the present study were collected in different parts of Mexico: *Conyza filaginoides* from Juchitepec, State of Mexico; *Dodonaea viscosa* from Oaxaca; *Gymnosperma glutinosum* from Santa Catarina State of Mexico; *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Parthenium tomentosum* var. stramonium, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens* and *Zornia venosa* from Chihuahua. Authenticated Voucher specimens (Bye and Linares 17983, Cisneros 368, Bye and Linares 17985, Bye 18019, Bye

15622, Bye 18014, Bye 18057, Bye 18037 and Bye 18069, respectively) are deposited in the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium (MEXU) located in the Botanical Garden of the Institute of Biology, U.N.A.M, Mexico City.

Extraction

Pharmacological and microbiological studies were performed with the extracts of the dried plants prepared as follows: 20 g of the dried plant material finely ground were **Soxhlet** extracted with 100 ml of methanol at 70° C or 100 ml of chloroform at 50° C for 6 hours. The extracts were evaporated under vacuum to a thick residue which was stored at room temperature for later use.

For pharmacological bioassay, all extracts were dissolved in dimethylsulfoxide. The final concentration of the solvent in the isolated organ bath chamber was 0.2 % v/v.

Isolated rat ileum test

Sprague-Dawley male rats (200-250 g) were killed by cervical dislocation. After discarding the 10 cm nearest the ileocaecal junction, the terminal ileum was removed and placed in a Krebs-Henseleit solution (at 37°C and pH 7.4) of the following composition (mM): NaHCO₃ 20, NaCl 119, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5 and glucose 11.4, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. The intestinal content was removed by washing with the Krebs-Henseleit solution and the mesenteric residues were eliminated.

The ileum was cut into 1-cm long segments. Each segment was placed vertically in a 10 ml tissue chamber and bathed with the Krebs-Henseleit

solution. An initial tension of 1 g was applied to the ilea and a 30 min period of stabilization was allowed, afterwards spontaneous activity was measured using force transducers (Grass FT03) connected to a polygraph (Grass 7D).

Following the stabilization time, a 10-min control period was recorded. Afterwards, each methanolic plant extract was added to the bath chamber in a volume of 20 μ l at different non-cumulative concentrations (only one concentration was used for each ileum segment). The concentrations used were from 0.5 to 5000 μ g/ml. When required, intermediate doses were tested. The methanolic extract of *D. lanosa* (from 0.5 to 500 μ g/ml) was used as a positive control due to its high content of scopolamine and atropine. All the responses were recorded during 10 min.

Pharmacological data analysis

The effect of the extracts was determined by comparing the areas under the curve inscribed by the frequency and the amplitude of the ileum contraction, before and after the application of the extracts. Areas were calculated from the polygraph tracings, using an analogical-digital tablet (CPLAB-10) and a specially designed software. The values were expressed as percentages of inhibition of contractile response calculated from six data \pm S.E. The differences between the means of two groups were estimated using the Student's t test for unpaired data.

The concentration-response curves for the extracts were plotted and the experimental data from the CRC were adjusted by the nonlinear, least squares, curve fitting program (PC NONLIN), using the following equation: $E = (E_{max} C^{\gamma}) / (C^{\gamma} + IC_{50}^{\gamma})$ where E_{max} is the maximum inhibitory effect, C is the concentration of the extract, IC_{50} is the concentration at which 50% of the maximum inhibition

of ileum spontaneous contraction was achieved; γ (gamma) is a number expressing the sigmoidity or the concentration-effect relationship. When γ is less than 1, the curve flattens, while when it is greater than 1, the curve becomes stepper (Schwinghammer and Kroboth, 1988). Parameters derived from this adjustment were compared by means of their 95% confidence intervals. The initial values for nonlinear adjustment were obtained after the logit transformation of experimental data.

Screening for antimicrobial activity

The enteropathogenic bacteria used in the present study were isolated from human clinical samples. They include: *Aeromona hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* and *Yersinia enterocolitica*. All microorganisms are deposited in the stock culture of the Faculty of Chemistry, University of Querétaro.

The methanolic and the chloroformic extracts were evaluated for qualitative antimicrobial activity using the agar plate diffusion assay (Hufford *et al.*, 1975; Ríos *et al.*, 1988). Agar plates containing 1 ml (10^6 bacteria/ml) of an overnight broth culture were prepared. Filter paper discs ($\phi = 6$ mm) (Schleicher and Schuell) were drenched with 100 and 50 μ l of the crude extracts at a concentration of 10 mg/ml and dried in the open air. The discs were placed on the inoculated medium and the plates were then incubated at 37°C for 24 h. Appropriate antibiotics were used as positive controls, depending on the susceptibility of the tested bacteria (gentamicine: *P. mirabilis*, *S. flexneri* and *Y.*

enterocolitica; sulphametoxazole: *A. hydrophila*; ampiciline: *E. coli*; gentamicine: *P. mirabilis*; carbeniciline: *P. aeruginosa*; amikacine: *S. typhi*; cephalotine: *S. aureus* and tetraciline: *V. cholerae* and *V. parahemolyticus*). In all the cases, the diameters of the resultant inhibition zones were measured.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was accomplished by the serial dilution technique (Hufford *et al.*, 1975). For the quantitative antimicrobial assays, each extract was dissolved in MeOH-H₂O 1:1 (20 mg/ml); 0.5 ml of this solution was then added to 4.5 ml of nutrient broth. Doubling serial dilutions were aseptically prepared from this broth with concentrations ranging from 2000-4 µg/ml. Each dilution was inoculated with 10 µl of bacteria to a final concentration of 10⁶/ml. After overnight incubation the MIC was determined.

RESULTS

Intestinal smooth muscle relaxant activity.

The methanolic extracts of all the species tested showed a concentration-dependent inhibition of the tone and the amplitude of the spontaneous contraction on the rat ileum. Figure 1 shows the concentration-response curves for the nine extracts.

It is worth noting that all the extracts displayed a similar efficacy in inhibiting the spontaneous activity. No statistically significant differences in the 95% confidence intervals were observed between the E_{max} of the extracts. The main difference between the groups was related to their inhibitory potency (see Table 1). *D. viscosa* showed the highest potency compared to the extract of *D. lanosa* (positive control).

Antibacterial activity

The potential antimicrobial activity against some enteropathogenic bacteria of the methanolic and chloroformic extracts of the selected species are presented in Table 2. The results are expressed as minimal inhibitory concentrations (MIC). As shown, only five of the ten microorganisms employed were susceptible to the tested extracts. The most active extract was that of *D. lanosa*, which exhibited antimicrobial activity against *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica* with MICs of 625, 858, 950, 875 and 1961 µg/ml respectively.

DISCUSSION

The results obtained in the present investigation indicate that the methanolic extracts of the nine plants evaluated have a spasmodic activity to a varying degree on the isolated rat ileum preparation. The demonstrated activity may account for the use of these species as antispasmodic agents in Mexican traditional medicine.

As previously mentioned, the potency of the extracts was calculated by comparing their relaxant effects with that of the methanolic extract of *D. lanosa*, which contains the spasmodic alkaloids atropine and scopolamine. Both compounds possess anticholinergic activity. The most active extract was that of *D. viscosa*, which exhibited almost the same potency as *D. lanosa*. The methanolic extracts of *G. glutinosum*, *P. thurberi*, *Z. venosa* and *C. filaginoides*, displayed antispasmodic activities corresponding to 32%, 31%, 23% and 22% of the positive control respectively. The less active extracts were those of *P. tomentosum* and *C. fragilis*, while the extract of *P. atrorubens*

produced only moderate relaxation of the spontaneous contractions of the rat ileum.

It has been reported that some flavonoids produce inhibition of induced or spontaneous contractions of guinea pig ileum (Capasso *et al.*, 1991; Fanning *et al.*, 1983; Havsteen, 1983; Macander, 1986). Therefore, the presence of this type of secondary metabolites could be related to the intestinal relaxant effect demonstrated by the methanolic extracts of *D. viscosa* and *G. glutinosum*. Since the spontaneous movements of the intestine are Ca^{2+} dependent, it is probable that the inhibitory effect induced by the extracts of these species, might be due to interference with Ca^{2+} influx and/or Ca^{2+} release from an intracellular store, as it has been suggested to interpret the inhibitory effects of some flavonoids on guinea-pig (Capasso *et al.*, 1991; Fanning *et al.*, 1983; Havsteen, 1983).

The data obtained from the present pharmacological evaluation are not sufficient to propose a possible mechanism of action involved in the antispasmodic activity of the species. Therefore, further pharmacological and phytochemical studies must be undertaken in order to clarify the mode of action of the active principles obtained from those plants.

Regarding the investigation of the plant extracts for a possible antimicrobial activity, the only susceptible enterobacteria were *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica*. Seven of the nine plants evaluated displayed antibacterial effect against one or more of the susceptible microorganisms. However, the grade of antibiotic potency obtained for the active extracts tend to be low compared with that of the positive controls.

The most remarkable activity was that produced by the chloroformic extract of *C. filaginoides* and the methanolic extracts of *G. glutinosum* and *Z. venosa* against *S. aureus* with minimal inhibitory concentrations less than 400 µg/ml. On the other hand, the methanolic extract of *D. lanosa* showed the widest spectrum of activity; the extract significantly inhibited the bacterial growth of *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica* with minimal inhibitory concentrations ranging from 600 to 1200 µg/ml.

CONCLUSIONS

The antispasmodic activity demonstrated by the methanolic extracts of the species evaluated in the present study, could provide the pharmacological basis for the traditional uses of these plants as spasmolytic agents in Mexican traditional medicine. Furthermore, the moderate antibacterial activity exerted by the extracts against some pathogenic enterobacteria may be of additional benefit in the case of stomachaches associated with infective diarrhoea.

The presence of flavonoid type of compounds in *D. viscosa* and *G. glutinosum* could be related with the displayed spasmolytic activity.

Acknowledgements:

The technical assistance of Héctor Peláez, Manuel Espinosa and Patricia Méndez, (University of Querétaro) is acknowledged. Thanks are also due to Q.F.B Sergio Pacheco (University of Querétaro), who isolated the enterobacteria employed in the present investigation. The authors thank Ing. Adriana Rojas for programming the software employed in the capture and processing of the pharmacological data obtained from the isolated rat ileum

test. Field assistance was provided by J. Aguilar, F. Basurto, E. Herrera, D. Martínez, N. Meraz, L. Nava and T.P. Ramamoorthy; M. Trejo assisted in the lab preparation of the plant specimens. Field work was partially funded by the Jardín Botánico, Instituto de Biología (UNAM), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and U.S. Agency for International Development. Collaboration from the Tarahumara Indians and the Centro de Estudios Agrícolas de la Tarahumara, A.C., is gratefully acknowledged. Partial financial support through project PADEP 5329 (Coordinación de Proyectos de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado, U.N.A.M.) and project DGAPA IN203494 (Dirección General de Asuntos Académicos del Posgrado, U.N.A.M) is also acknowledged.

REFERENCES

- Bye, R., Mata, R., Pimentel, J. (1991) Botany, ethnobotany and chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in Mexico. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* **61**, 21-42.
- Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F. (1991). Reduction of Agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother.Res.* **5**, 85-87.
- Domínguez, X.A. (1974). Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochem.* **13**, 1626-1628.
- Domínguez, X.A. (1972). Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochem.* **11**, 1855-1856.
- Fanning, M.J., Macander, P., Drzewiecki, G., Middleton, E. (1983). Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunot.* **71**, 371-373.
- Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141-1148.
- Hsu, Y., Chen, Y.P., Kakisawa, H. (1971). Structure of hauriwaic acid. *Phytochem.* **10**, 2813-2814.
- Hufford, C.D., Funderburk, M.J., Robertson, L.W. (1975). Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liliodendron tilipifera* L. *J. of Pharm. Sci.* **64**, 789-792.
- Kumamoto, J.; Scora, W., Clerx W. (1985). Terpenes of leaves of *Parthenium tomentosum*. *J. Agric. Food. Chem.* **33**, 650-652.
- Macander, P.J. (1986). In: *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity relationships*. V. Cody, E. Middleton, Jr., and J.B. Harborne eds. pp. 411-424. Alan R. Liss., New York.

Maldonado, E., Mendoza, G., Cárdenas, J., Ortega, A., (1985). Sesquiterpene lactones from *Parthenium tomentosum*. *Phytochem.* **24**, 2981-2985.

Mata, R., Contreras, J.L., Crisanto, D., Pereda-Miranda, R., Castañeda, P., del Río, F. (1991). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*. *J. of Natural Products.* **54**, 913-917.

Mikayado, M., Ohno, N., Yoshioka, H., Mabry, T., Whiffin, T. (1974). Gymnospermin. New labdantriol from *Gymnosperma glutinosum* *Phytochem.* **13**, 189-190.

Ríos, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. of Ethnopharm.* **23**, 127-149.

Rodríguez, E., Carman, N., Chávez, P. (1972). Quercetagenin 3,3'-dimethyl ether, a new flavonoid from *Parthenium tomentosum*. *Phytochem.* **11**, 1507-1508.

Sachdev, L., Kulshreshtha, D.K. (1983). Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* **25**, 1253-1256

Sastry, K.N.S., Nayudamma, Y. (1966). Leucocyanidin from *Dodonaea viscosa* bark. *Leather Sciences.* **13**, 174-176.

Schwinghammer, T.L., Kroboth, P.D. (1988). Basic concepts in pharmacodynamic modeling. *J. Clin. Pharmacol.* **28**, 388-394.

Wagner, H., Ludwig, C., Grotjahn, L., Khan, M.S.Y. (1987). Biologically active saponins from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* **26**, 697-701.

Table 1. Inhibition of the spontaneous contraction of isolated rat ileum induced by the methanolic extracts of the plants.

EXTRACT	Emax	IC ₅₀ (µg/ml)	γ	POTENCY
<i>D. lanosa</i>	86.98 ± 4.07 (81.84 - 95.12)	9.65 ± 1.16 (7.33 - 11.97)	1.89 ± 0.46	1
<i>C. filaginoides</i>	109.55 ± 6.75 (95 - 123)	43.87 ± 15 (13.87 - 73.87)	0.53 ± 0.06	0.22
<i>C. fragilis</i>	94.75 ± 7.68 (79.6 - 110.1)	146.53 ± 24.83 (96.8 - 196.1)	0.57 ± 0.10	0.06
<i>G. glutinosum</i>	93.29 ± 3.76 (85.77 - 100.8)	29.57 ± 6.29 (23.3 - 42.15)	0.91 ± 0.17	0.32
<i>D. viscosa</i>	90.58 ± 8.91 (72.8 - 108.4)	11.91 ± 3.18 (5.55 - 18.27)	1.27 ± 0.55	0.81
<i>P. tomentosum</i>	95.81 ± 4.04 (87.73 - 103.9)	145 ± 22.93 (99.14 - 190.9)	1.35 ± 0.30	0.06
<i>P. thurberi</i>	103.4 ± 5.29 (92.82 - 113.9)	30.58 ± 14.98 (0.62-60.54)	0.38 ± 0.05	0.31
<i>P. atrorubens</i>	88.65 ± 3.58 (81.49 - 95.81)	57.80 ± 14.92 (27.9 - 87.64)	0.59 ± 0.08	0.16
<i>Z. venosa</i>	102.75 ± 5.34 (92.07 - 113.4)	41.32 ± 17.95 (5.42 - 77.22)	0.39 ± 0.05	0.23

Values are means ± S. E.; n=6 (95% confidence intervals)

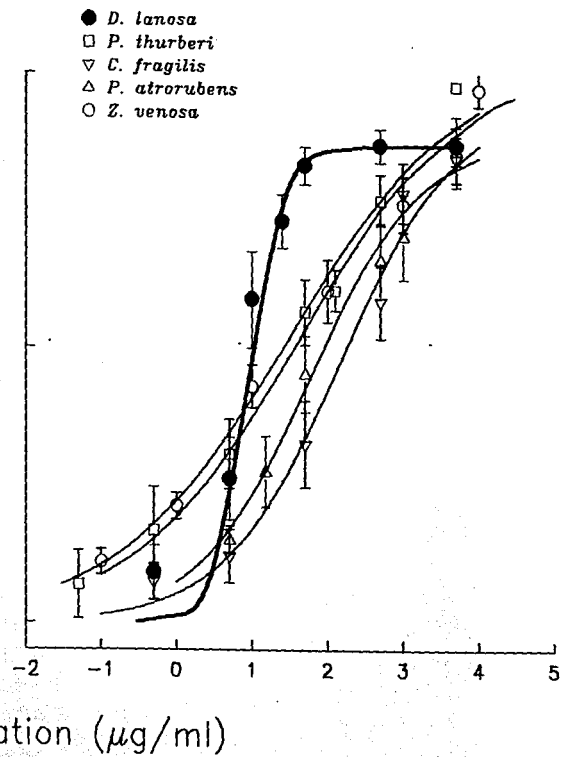
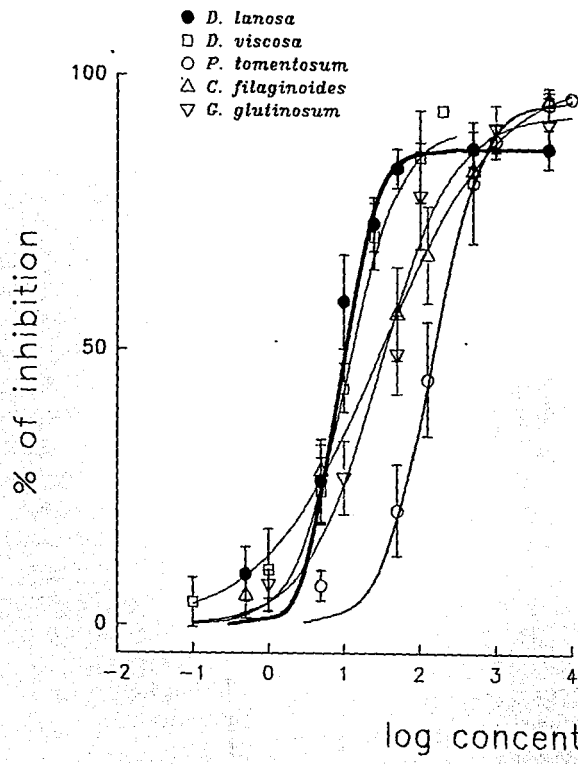
Potency was obtained by the formula: EC₅₀ *Datura lanosa*/EC₅₀ plant extract, assuming a value of 1.00 for *Datura lanosa*.

Table 2. Antimicrobial activity of the methanolic and the chloroformic extracts of the plants against tested microorganisms.

MICROORGANISM	EXTRACT	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Shigella flexneri</i>	<i>D. lanosa</i> (methanolic)	625
	<i>P. thurberi</i> (chloroformic)	1250
	<i>P. thurberi</i> (methanolic)	821
	Sulphametoxazole *	2.76
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>C. filaginoides</i> (chloroformic)	293
	<i>C. fragilis</i> (chloroformic)	879
	<i>D. lanosa</i> (methanolic)	858
	<i>G. glutinosum</i> (methanolic)	380
	<i>P. atrorubens</i> (methanolic)	1900
	<i>Z. venosa</i> (methanolic)	378
	Ampiciline *	2.71
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>D. lanosa</i> (methanolic)	950
	<i>P. thurberi</i> (methanolic)	1083
	<i>P. atrorubens</i> (methanolic)	833
	Tetraciclina *	2.16
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	<i>D. lanosa</i> (methanolic)	875
	Tetraciclina	2.16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>C. filaginoides</i> (chloroformic)	1785
	<i>C. fragilis</i> (chloroformic)	1964
	<i>D. lanosa</i> (methanolic)	1961
	Gentamicine *	2.43

* Positive control

Figure 1. Concentration-response curves for the methanolic extracts of *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Dodonaea viscosa*, *Gymnosperma glutinosum*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens*, *Zornia venosa* and *Datura lanosa* on the spontaneous contraction of isolated rat ileum.



ARTICULO 2**SMOOTH MUSCLE RELAXING COMPOUNDS FROM DODONAEA VISCOSA**

A. Rojas, S. Cruz, H. Ponce-Monter y R. Mata

PLANTA MEDICA

SMOOTH MUSCLE RELAXING COMPOUNDS FROM DODONAEA VISCOSA

A. ROJAS^{1, 2, 5, 6}, S. CRUZ³, H. PONCE-MONTER⁴ AND R. MATA^{1, 6}.

1. Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad Conjunta de Plantas Medicinales, Instituto de Química y Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México.

2. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 76010, Querétaro, México.

3. Departamento de Farmacología, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV, IPN, 1400, México D.F., México.

4. Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S. 03020, México, D.F., México

5. Partly taken from the PhD thesis of A. Rojas.

6. Address for correspondence

ABSTRACT

Bioassay directed fractionation of the chloroform-methanol (1:1) extract of *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq. (Sapindaceae) resulted in the isolation of four active spasmolytic principles: sakuranetin **1**, 6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether **2**, hautriwaic acid **3** and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol **4**. All the isolated compounds elicited a concentration-dependent inhibition of the spontaneous and electrically induced contractions of guinea-pig ileum

Sakuranetin and the *ent*-labdane inhibited the ileum contractions evoked by acetylcholine (ACh), histamine and barium chloride. In addition, both substances were capable of relaxing contractions of rat uterus induced by Ca²⁺ in K⁺-depolarizing solution, displacing to the right the concentration-response curves to Ca²⁺. These results suggest that sakuranetin and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol produce an interference with calcium metabolism in smooth muscle cells.

The spasmolytic activity exhibited by the active principles from *D. viscosa*, provides the pharmacological basis for the traditional use of the plant as an antispasmodic agent.

Keywords: *Dodonaea viscosa*, Sapindaceae, sakuranetin, 6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether, hautriwaic acid, *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol, smooth muscle relaxation, spasmolytic effect, calcium blocker, isolated guinea pig-ileum, rat uterus.

INTRODUCTION

Dodonaea viscosa (L.) Jacq. (Sapindaceae) is widely distributed in Mexico and reputed to possess several medicinal properties. The leaves are used against several kinds of aches, rheumatism, skin infections, fevers, swellings and "gastrointestinal disorders" including diarrhea (1).

Previous chemical studies on this species resulted in the isolation and characterization of several flavonoids (2-4), three diterpenoids (3-5), condensed tannins (2), some triterpenoids (6), one p-coumaric acid ester of 1-L-*myo*-inositol (4) and two saponins with antiexudative, phagocytosis enhancing and molluscicidal activities (6, 7).

Recently, as a part of a screening program established to evaluate the spasmolytic activity of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of stomach aches and other disorders involving smooth muscles, it was demonstrated that the chloroform-methanol (1:1) extract of *D. viscosa* displayed a significant concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the isolated rat ileum (8).

The present paper describes the isolation of the major spasmolytic principles from the CHCl_3 -MeOH (1:1) extract of *D. viscosa* aerial parts, which initially displayed a relaxing activity on the spontaneous and electrically induced contractions of isolated guinea pig-ileum. In addition, the effects of the isolated compounds on the electrically, acetylcholine (Ach), histamine and barium chloride induced contractions of the guinea-pig ileum were evaluated. Finally, in order to extend the pharmacological characterization with respect to the interaction with contractile mechanisms, the ability of two of the active principles

to inhibit responses of rat uterus to added Ca^{2+} was examined in a K^{+} -depolarizing medium.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The plant material (aerial parts) was collected by Biologist Alejandro Cisneros in Oaxaca, on the route to Jayacatlán (17 Km), in March 1989. A reference sample has been deposited at the Herbarium of the Department of Botany, School of Chemistry, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México (voucher no. Cisneros 368).

Isolation of the active principles from *D. viscosa*

The air-dried shredded plant material (1.9 Kg) was macerated three times with a mixture of CHCl_3 -MeOH (1:1) at room temperature for 1 week. The extract was evaporated to dryness to yield 363 g of a dark residue, which was column chromatographed on silica gel (Merck 60, 30-70 mesh, 3 Kg); elution was accomplished with a solvent gradient of increasing polarity [hexane- CHCl_3 1:1 (6 l); CHCl_3 (17 l); CHCl_3 -MeOH 95:5 (7 l); CHCl_3 -MeOH 9:1 (8 l); CHCl_3 -MeOH 8:2 (13 l); MeOH (10 l)]. Fractions (1 l each) were collected and pooled based on their TLC profiles to yield ten major fractions (F1-F10). Pharmacological testing showed five active fractions (F1-F5).

F1 (35.77 g, eluted with hexane- CHCl_3 1:1, CHCl_3 and CHCl_3 -MeOH 95:5) was further chromatographed on a silica gel column (500 g) using hexane with increasing amounts of CHCl_3 and CHCl_3 gradually enriched with MeOH.

From fractions 150-160 (eluted with hexane:CHCl₃ 4:6) crystallized 240 mg of **1**.

F2 (34 g, eluted with CHCl₃-MeOH 95:5) was subjected to column chromatography on silica gel (388 g) eluting with hexane-EtOAc 7:3 to yield impure **4** which was further purified by preparative TLC (Hexane-EtOAc 1:1, 3 developments) to afford pure **4** (284 mg).

F3 (40 g, eluted also with CHCl₃-MeOH 95:5) was rechromatographed on a silica gel column (800 g) and eluted with CHCl₃ with increasing amounts of MeOH to yield 13 g of **2**.

From fractions F4 and F5 (2.5 g, eluted with CHCl₃-MeOH 9:1) crystallized 480 mg of **3**.

The spectral properties of the isolated compounds were identical to those of reference compounds (**4**).

The methanol extract of *D. lanosa* was prepared as previously described (**9**).

Pharmacological evaluations

Pharmacological tests employing the guinea-pig ileum model were performed using two different types of experiments. In the first one, the crude extract, primary fractions and isolated compounds were evaluated for their ability to relax the spontaneous ileum contractions. In the second, the effect of pure compounds on the contractions of the ileum induced by electrical stimulation, Ach, histamine and barium chloride was investigated.

Isolated guinea-pig ileum test

Ileum segments (2 cm each) were isolated from male guinea-pigs (600-800 g) and prepared for recording of isometric contractions using force

transducers (Grass FT03) connected to a polygraph (Grass 7D) as previously described (8).

After a stabilization time of 30 min, a 10 min control period was recorded. The test substances (extract, chromatographic fractions and compounds) dissolved in dimethylsulfoxide were added to the bath in a volume of 50 μ l at different concentrations (one concentration was used per ileum segment). All the responses were recorded during 10 min.

In a parallel experimental set, the ileum segments were electrically stimulated with supramaximal rectangular pulses (20 V) with a 0.5 msec duration at 0.1 Hz. The effect of different non-cumulative concentrations of the extract, pure compounds and atropine (positive control) was evaluated following the same procedures as described above.

The effect of the extract, fractions and isolated compounds was determined by comparing the areas under the curve (AUC) inscribed by the frequency and the amplitude of the ileum contractions before and after the application of the test materials. Areas were calculated from the polygraph tracings, using an analogical-digital tablet (CPLAB-10) and a specially designed software.

In another set of experiments, the action of the pure compounds on contractions induced by Ach, histamine and barium chloride was studied. In these evaluations, the ileum was electrically stimulated during 10 min. Then, in the case of the tests with BaCl_2 , the substances were added to the bath at their IC_{50} for the inhibition of spontaneous contraction of the ileum (see Data analysis), while in the case of the experiments with Ach and histamine, the compounds were tested at the IC_{50} for the inhibition of the electrically induced

contractions. The substances were allowed to act on the ileum for 10 min and afterwards, the agonists were administered at the following concentrations: Ach $1 \times 10^{-5}M$, histamine $1 \times 10^{-5}M$ and $BaCl_2$ $1 \times 10^{-2}M$. The response of the compounds on the contractions elicited by the three agonists was recorded during 10 min and the corresponding effect was determined by comparing the average amplitude of the ileum contractions with the amplitude of the contractions obtained when the agonists alone were added to the bath.

Based on the experimental findings obtained in the ileum assay, it was decided to further analyze the mechanism of action of sakuranetin and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16),14-diene-3 β ,8 α diol by studying their effect on the contractile responses of rat uterus.

Rat uterus test

Uteri were obtained from adult female Wistar rats (150-220 g) that were treated with estradiol benzoate (mg/kg) 24 hr before the experiments and killed by a blow to the head. Uterine strips, free from adhering tissue, were suspended in 10-ml organ baths containing Ringer-Krebs solution (31°C) of the following composition (mM): NaCl 120, NaHCO₃ 20, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5 and glucose 11.5, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. Tissues were bathed for 60 min in the Ringer-Krebs solution with a resting tension of 1g and then exposed to a high K⁺ (30 mM)-Ca²⁺-free depolarizing solution. Cumulative amounts of CaCl₂ (0.32, 0.58, 1.0, 1.8, 3.0, 5.6 mM) were added in order to make cumulative concentration-response control curves to CaCl₂. Additionally, concentration response curves (CRC) in the presence of different concentrations of sakuranetin (1, 3, 5.8 μM) and the *ent*-labdane (3, 10, 18 μM) were made. Each preparation was exposed to only one

concentration of the test compounds. Parallel experiments were performed with nifedipine 10nM (10).

The effects of the compounds were determined by comparing the AUC of the tracings corresponding to the control responses, with the areas of the tracings obtained after the addition of the test substances.

Data and Statistical analysis

All the results are expressed as the mean of 6 experiments \pm SE.

CRC for the extract and pure compounds were plotted and the experimental data from the CRC were adjusted by the nonlinear, least squares, curve fitting program (PC NONLIN), using the following equation: $E = (E_{max} C^\gamma) / (C^\gamma + IC_{50}^\gamma)$ where E_{max} is the maximum effect, C is the concentration of the test substance, IC_{50} is the concentration at which 50% of the maximum effect was achieved and γ (gamma) is a number expressing the sigmoidity of the concentration-effect relationship (11). The initial values for nonlinear adjustment were obtained after the logit transformation of experimental data.

The statistical significance ($P < 0.05$) of differences between means was assessed by an Analysis of Variance (ANOVA) followed by a Tukey's test (12).

RESULTS AND DISCUSSION

The chloroform-methanol (1:1) extract of *Dodonaea viscosa* showed a concentration-dependent inhibition of the tone and the amplitude of the spontaneous contraction of the guinea-pig ileum. The extract of *D. viscosa* ($IC_{50} = 79.5 \mu\text{g/ml}$) resulted to be 20 times less potent than the methanolic extract of *Datura lanosa* ($IC_{50} = 4.4 \mu\text{g/ml}$), which was used as a positive control because of its high content of scopolamine and atropine (see Table 1). These

results confirm the spasmolytic activity previously demonstrated for the chloroform-methanol (1:1) extract of *D. viscosa*, employing an isolated rat ileum model (8).

Column chromatography fractionation of the *D. viscosa* extract yielded ten primary fractions. Five of these fractions (F1-F5) decreased the spontaneous contractions of isolated guinea-pig ileum when tested at the IC_{50} of the original extract. The results of this testing are shown in Figure 1.

Antispasmodic active fractions F1 to F5 were exhaustively chromatographed by CC and TLC to yield four active compounds, which had been previously described in the plant (4): sakuranetin **1**, 6-hydroxy-kaempferyl-3,7-dimethyl ether **2**, hautriwaic acid **3** and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16),14-diene-3 β ,8 α -diol **4** (see Figure 2).

The isolated compounds also induced a concentration-dependent inhibition of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum. Figure 3 shows the CRC for the active principles and Table 1 indicates their respective IC_{50} and E_{max} values. It is important to point out that all metabolites were more potent than the original extract, but less potent than the extract of *D. lanosa*. These results did not provide any information on the mechanism of action of the compounds, since they could be acting on many different sites and levels in the enteric system (13). Therefore, we decided to investigate the antispasmodic action of the four compounds by studying their influence on the contractions of the guinea pig isolated ileum induced by electrical stimulation, Ach, histamine and barium chloride.

Although it is well established that several mediators are involved in the contraction of ileum muscles evoked by electrical stimulation, i.e. 5-

hydroxytryptamine (14), histamine (15) and certain prostaglandins (16), this test is commonly employed to preliminary detect anticholinergic drugs (17). The four active principles from *D. viscosa* produced a concentration-dependent inhibition of the twitch contractions (see Figure 4). In these experiments, the *ent*-labdane and the two flavonoids were more potent than the original extract, while hautriwaic acid was less potent. In fact, sakuranetin elicited the highest spasmolytic activity with an $IC_{50} = 4.7 \mu\text{g/ml}$. However, the potency of all compounds turned out to be much lower than that exhibited by atropine ($IC_{50} = 0.0053 \mu\text{g/ml}$). Table 2 shows the IC_{50} and E_{max} values for the evaluated substances.

Sakuranetine and the *ent*-labdane significantly inhibited the contractions provoked by Ach, histamine and BaCl_2 (see Figure 5). Since these spasmogens have different modes of action, the antagonism elicited by the flavanone and the diterpene indicated that they might be acting at a common step in the contraction mechanism elicited by these agonists.

Based on the results previously described and considering that reports dealing with the pharmacological effects of flavanones and diterpenes on smooth muscles are scarce, we examined the mechanism of smooth muscle relaxation induced by sakuranetin and the *ent*-labdane in rat uterus.

When the uterus is exposed to a high concentration of KCl (a depolarizing medium), contractions are the result of an increased Ca^{2+} -influx through voltage-stimulated type-L Ca^{2+} channels. If under this conditions the tissue is bathed in a Ca^{2+} -free solution, the uterus relaxes. Subsequent addition of cumulative concentrations of Ca^{2+} , causes a gradual increase in tonic contraction, which is dependent of extracellular Ca^{2+} influx. These tonic

contractions are inhibited by Ca^{2+} entry blockers like nifedipine, diltiazem and gallopamil (10, 18, 19).

In the present study, we designed a series of experiments in order to evaluate the effect of single concentrations of sakuranetin and the *ent*-labdane on the Ca^{2+} concentration-response curves. Sakuranetin at concentrations of 1, 3 and 5.8 μM and the *ent*-labdane at concentrations of 3, 10 and 18 μM , produced a rightward shift of the Ca^{2+} -effect control curves (Figure 6) and a reduction in the maximum effect, without significantly affecting the EC_{50} values (Table 3). The same trend of effects was observed with the positive control nifedipine (10nM). The shift to the right of calcium-contraction curves produced by sakuranetin and the *ent*-labdane suggests that both compounds might be inhibiting Ca^{2+} influx into the smooth muscle cells. However this behavior does not rule out the possibility that these metabolites compete with Ca^{2+} for Ca^{2+} binding proteins such as calmodulin.

6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether inhibited the contractions evoked by histamine and barium chloride (Figure 5). However, this compound did not affect the response to Ach. This lack of antagonism of the response to Ach is not in agreement with the results previously found for other flavonols since this type of compounds usually inhibits Ach induced contractions of guinea pig ileum (20, 21, 22, 23). Moreover, it has been reported that quercetin behaves as a calcium-antagonist, avoiding the utilization of external calcium in aortic smooth muscle (24) and in guinea pig ileum (25). Further work is in progress in order to explore in detail the pharmacological mode of action of 6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether.

Hautriwaic acid produced an inhibition of the histamine-induced contractions and an increase of the contractions evoked by barium chloride, without modifying the Ach-induced contractions (Figure 5). It is difficult to explain the variable behavior exhibited by hautriwaic acid on the basis of a simple mechanism of action and obviously more detailed pharmacological investigation is necessary to characterize the mode of action of this diterpene.

The results obtained in the present investigation provide pharmacological support for the traditional use of *D. viscosa* as an antispasmodic agent in Mexican traditional medicine. Pharmacological characterization of sakuranetin and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol suggests that their mechanism of action might be due to an interference with calcium metabolism in smooth muscle cells.

Acknowledgments

The authors thank Abraham Contreras and Teodoro Villanueva for their technical assistance. This work was partially supported by grant IN-203494 DGAPA-UNAM. A. Rojas acknowledges the fellowship awarded by INTERCAMBIO ACADEMICO, U.N.A.M. to carry out her PhD thesis.

REFERENCES

- 1.- Martínez, M. (1989) in: Las plantas medicinales de México, p. 105, Ediciones Bota, México.
- 2.- Sastry, L.N.S. Nayudamma, Y. (1966) *Leather Sci.* **13**, 174-176.
- 3.- Sachdev, L., Kulshreshtha, D.K. (1983) *Phytochemistry* **25**, 1967-1969.
- 4.- Mata, R., Contreras, J.L., Crisanto, D., Pereda-Miranda, R., Castañeda, P., del Río, F. (1991) *J. Nat. Prod.* **54**, 913-917.
- 5.- Hsu, U., Chen, Y.P., Kakisawa, H. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2813-2814.
- 6.- Dimbi, M.Z., Kapundu, M., Darimont, E., Warin, R., Delaude, C., Huls, R. (1985) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **94**, 141-148.
- 7.- Wagner, H., Ludwig, C., Grotjahn, L., Khan, M.S.Y. (1987) *Phytochemistry* **26**, 697-701.
- 8.- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1995) *Phytomedicine, in press.*
- 9.- Bye, R., Mata, R., Pimentel, J. (1991) *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* **61**, 21-42.
- 10.- Granger, S., Hollingsworth, M., Weston, A.H. (1986) *Br. J. Pharmacol.* **87**, 147-156.
- 11.- Schwinghammer, T.L., Kroboth, P.D. (1988) *J. Clin. Pharmacol.* **28**, 388-394.
- 12.- Daniel, W.W. (1987) in: *Bioestadística*, pp. 306-309, Limusa, México.
- 13.- Samuelsson, G. (1991) in: *Methods in Plant Biochemistry Vol. 6*, pp. 261-279, Academic Press Limited, New York.
- 14.- Takaki, M., Brancheck, T., Tamir, H., Gershan, M.D. (1985) *J. of Neuroscience.* **5**, 1769-1780.

- 15.- Yamanaka, K., Kitamura, K. (1987) *Eur. J. Pharmacol.* **144**, 29-37.
- 16.- Yagasaki, O., Funaki, H., Yanagiya, I. (1984) *Eur. J. Pharmacol.* **103**, 1-8.
- 17.- Ennis, C. Haroun, F., Lattimer, N. (1985) *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 24-27.
- 18.- Varagic, V.M., Milovanovic, S.R., Srkalovic, G. (1984) *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* **270**, 79-87.
- 19.- Nayler, W.G., Horowitz, J.D. (1983) *Pharmac. Ther.* **20**, 203-262.
- 20.- Fanning, M.J., Macander, P., Drzewiecki, G., Middleton, E. (1983) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunot.* **71**, 371-373.
- 21.- Capasso, F., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., Franco, F.P. (1988) *Pharmacol. Res. Commun.* **20** (Suppl. 1) 201-202.
- 22.- Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F. (1991) *Phytother. Res.* **5**, 85-87.
- 23.- Havsteen, B. (1983) *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141-1148.
- 24.- Morales, M.A., Lozoya, X. (1994) *Planta Med.* **60**, 313-317.
- 25.- Morales, M.A., Tortoriello, J., Meckes, M., Paz, D., Lozoya, X. (1994) *Arch. Invest. Med. (Mex.)* **21**, 155-162.

Table 1. Inhibition of the spontaneous contractions of isolated guinea-pig ileum induced by the extract and isolated compounds from *D. viscosa*.

SUBSTANCE	E _{max} *	IC ₅₀ (µg/ml)	γ
<i>D. lanosa</i> extract	91.08 ± 1.13	4.45 ± 0.53	0.58 ± 0.03
<i>D. viscosa</i> extract	87.09 ± 2.63	79.51 ± 17.11	0.60 ± 0.06
Sakuranetin	84.74 ± 0.82	15.98 ± 0.82	1.07 ± 0.05
6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether	93.67 ± 1.19	15.89 ± 1.58	0.68 ± 0.04
Ent-15,16-epoxy-9αH-labda-13(16)14-diene-3β,8αH-diol	92.17 ± 1.47	6.17 ± 0.57	0.78 ± 0.06
Hautriwaic acid	82.95 ± 2.86	8.59 ± 2.33	0.63 ± 0.08

Values are means ± S.E.; n=6

* E_{max} indicates the percentage of maximum inhibition

Table 2. Inhibition of the electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum produced by the extract and isolated compounds from *D. viscosa*.

SUBSTANCE	E _{max} *	IC ₅₀ (µg/ml)	γ
Atropine	89.37 ± 3.22	0.0053 ± 0.0008	1.16 ± 0.17
<i>D. viscosa</i> extract	105.92 ± 8.07	106.19 ± 15.00	1.90 ± 0.40
Sakuranetin	104.47 ± 3.20	4.69 ± 0.29	1.70 ± 0.15
6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether	101.87 ± 1.19	37.87 ± 0.89	2.35 ± 0.11
Ent-15,16-epoxy-9αH-labda-13(16)14-diene-3β,8αH-diol	100.16 ± 2.06	19.37 ± 0.83	2.44 ± 0.23
Hautriwaic acid	98.2 ± 1.2**	148.48 ± 6.4***	---

Values are means ± S.E.; n=6

* E_{max} indicates the percentage of maximum inhibition

** Experimental value; *** Value obtained by linear regression

Table 3. Effect of Sakuranetin and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol on the Ca²⁺-induced contractions of rat uterus

SUBSTANCE	E _{max} *	EC ₅₀ (mM)**	γ
Ca ²⁺	103.04 \pm 4.86	1.14 \pm 0.16	1.97 \pm 0.36
Nifedipine 10nM	69.43 \pm 7.62	1.61 \pm 0.09	3.32 \pm 0.80
Sakuranetin:			
1 μ M	101.78 \pm 17.08	1.57 \pm 0.43	1.51 \pm 0.26
3 μ M	43.14 \pm 3.68	1.87 \pm 0.20	2.37 \pm 0.39
5.8 μ M	21.97 \pm 4.79	1.47 \pm 0.33	2.04 \pm 0.44
<i>Ent</i>-15,16-epoxy-9αH-labda-13(16)14-diene-3β,8α-diol			
3 μ M	81.75 \pm 6.93	1.33 \pm 0.16	1.66 \pm 0.37
10 μ M	63.41 \pm 6.07	2.70 \pm 0.41	1.78 \pm 0.40
18 μ M	30.40 \pm 2.52	1.20 \pm 0.24	2.42 \pm 0.49

Values are means \pm S.E.; n=6

* E_{max} indicates the percentage of maximum inhibition

** Concentration of Ca²⁺ at which 50% of the maximum response to Ca²⁺ is achieved.

Figure 1. Effect of the chromatographic fractions from the chloroform-methanol (1:1) extract of *Dodonaea viscosa* on the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile response obtained at the IC₅₀ of the original extract calculated as the mean from six data ± S.E.

*E: *D. viscosa* CHCl₃-MeOH (1:1) extract.

Figure 2. Smooth muscle relaxing compounds isolated from *Dodonaea viscosa*.

Figure 3. Concentration-response curves for the inhibitory effect of the extract and isolated compounds from *Dodonaea viscosa* on the spontaneous contractions of isolated guinea-pig ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile response calculated as the mean from six data ± S.E.

**ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol;

**6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether.

Figure 4. Concentration-response curves for the inhibitory effect of the extract and isolated compounds from *Dodonaea viscosa* on the electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum. Values are expressed as the percentages of inhibition of contractile response calculated as the mean from six data ± S.E.

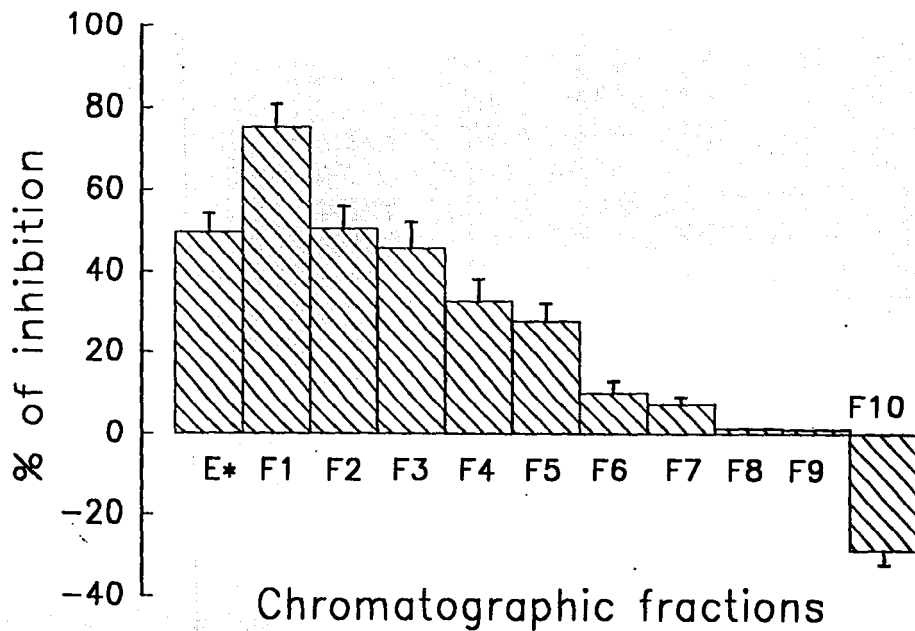
**ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol;

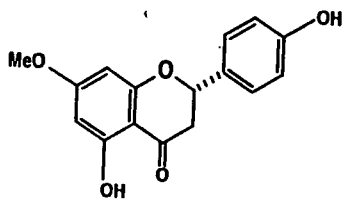
**6-hydroxykaempferyl-3,7-dimethyl ether.

Figure 5. Effect of the isolated compounds from *Dodonaea viscosa* on the contractions induced by Ach, Histamine and Barium chloride on the guinea-pig ileum. In the tests with BaCl₂, substances were tested at their IC₅₀ for the inhibition of spontaneous contraction of the ileum. In the experiments with Ach and histamine, the compounds were tested at the IC₅₀ for the inhibition of the electrically induced contractions. Values are expressed as percentages of the mean responses when the agonists alone were added to the bath calculated as the mean from six data ± S.E.

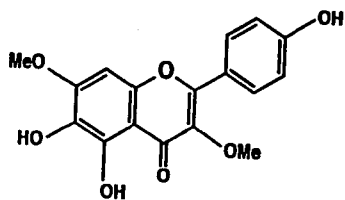
1: *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol; 2: Sakuranetin; 3: 6-hydroxy-kaempferyl-3,7-dimethyl ether; 4: Hautriwaic acid.

Figure 6. Calcium concentration-response curves of rat uterus in the presence of nifedipine (10nM), sakuranetin (1, 3 and 5,8 μ M) and *ent*-15,16-epoxy-9 α H-labda-13(16)14-diene-3 β ,8 α -diol (3, 10 and 18 μ M). Values are expressed as percentages of the maximum response to Ca²⁺ calculated as the mean from six data ± S.E.

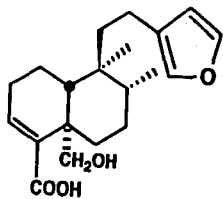




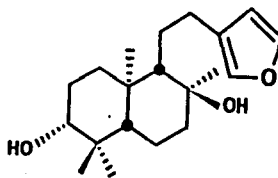
1



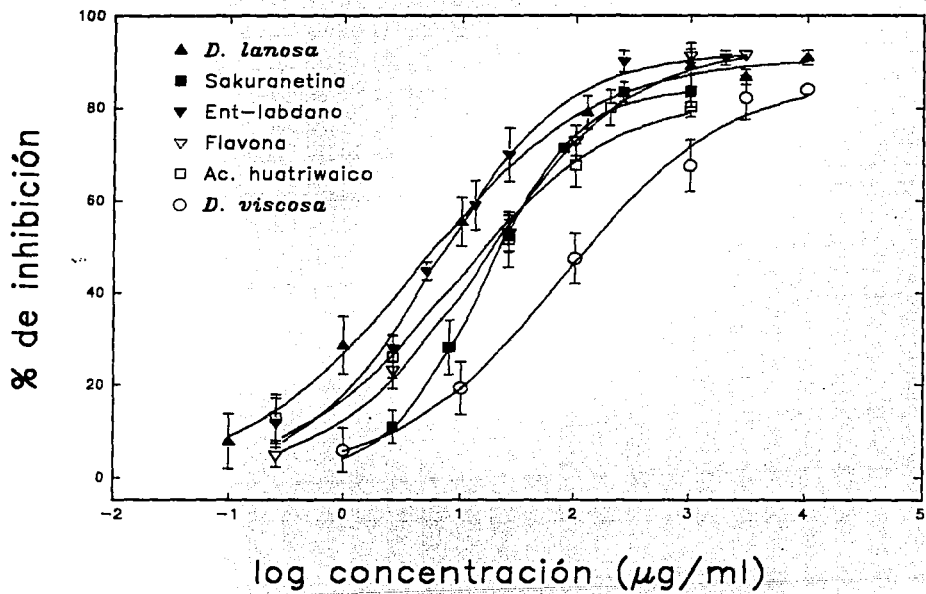
2

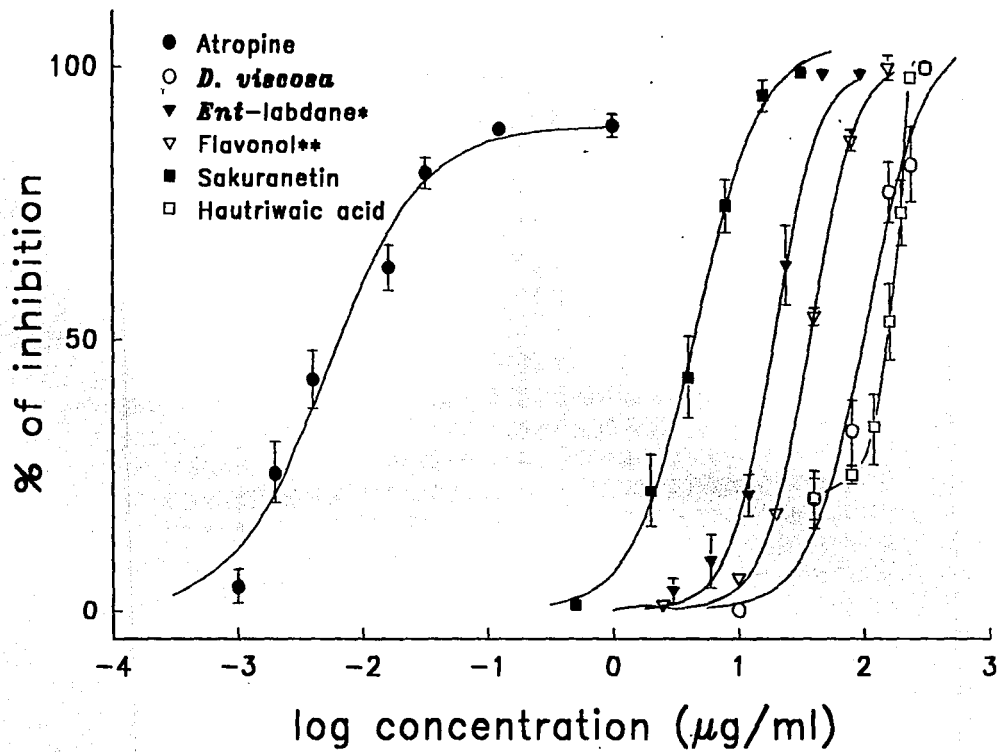


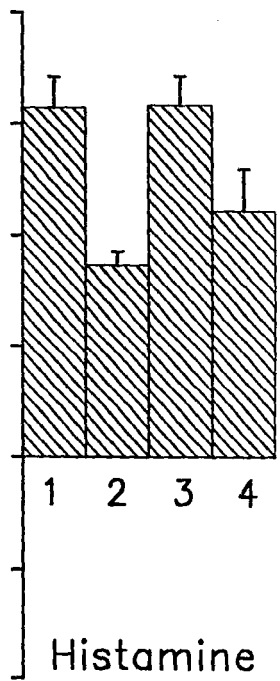
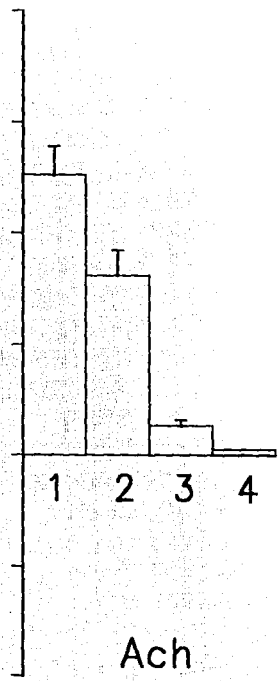
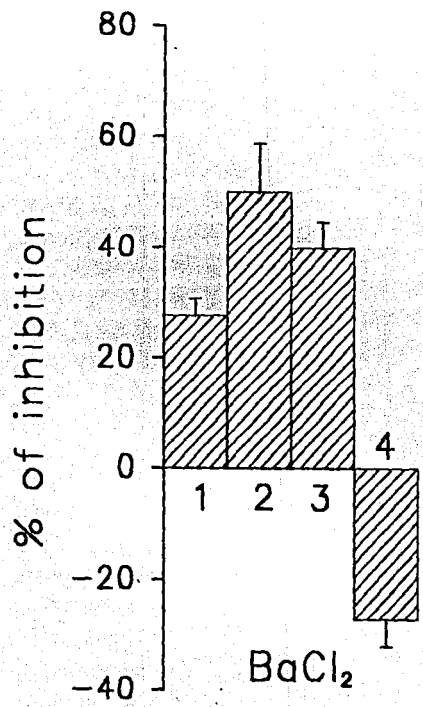
3

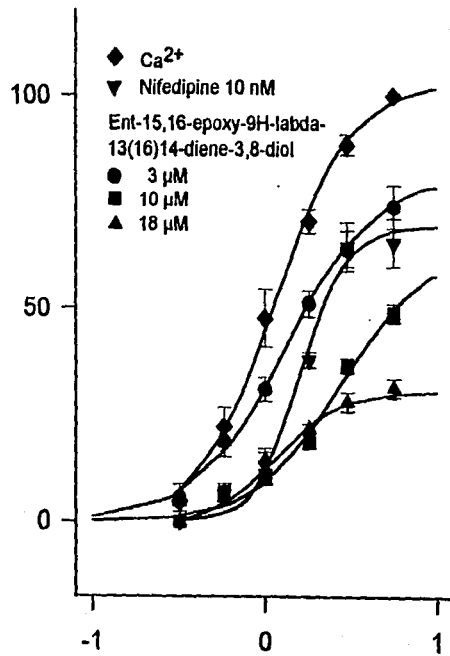
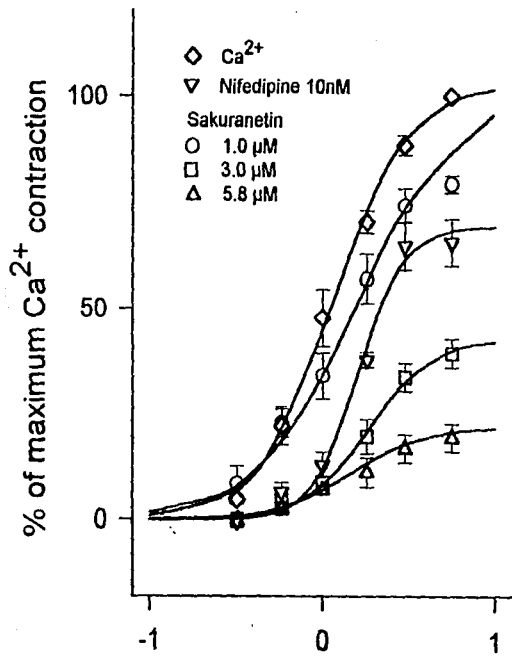


4









log Ca^{2+} [mM]

5. DISCUSION GENERAL DE LOS RESULTADOS

5.1 POTENCIAL ESPASMOLITICO DE ALGUNAS PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA PARA EL TRATAMIENTO DE DESORDENES GASTROINTESTINALES

Uno de los objetivos fundamentales planteados en la presente disertación era la demostración farmacológica de las propiedades antiespasmódicas que se les atribuyen a ocho especies vegetales de amplio uso en la medicina popular de México.

Las especies se seleccionaron con base en un criterio etnobotánico, el cual ha demostrado, en numerosas ocasiones, ser un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos productos naturales con propiedades biológicas interesantes (Cordell *et al.*, 1991; Hamburger y Hostettmann, 1991; Mata, 1993; Vlietinck y Van den Berghe, 1991; *inter alia*).

Con base en los antecedentes etnobotánicos de las plantas para el tratamiento de diversos padecimientos gastrointestinales, el estudio farmacognóstico de las mismas podía abordarse desde dos puntos de vista diferentes. El primero de ellos tendría por objeto establecer si estas especies tienen un efecto directo sobre los agentes etiológicos de las enfermedades de origen infeccioso o parasitario. El segundo enfoque, se avocaría a determinar si las plantas tienen alguna acción que contribuye al alivio de los síntomas de las enfermedades, como por ejemplo, reduciendo la motilidad de la musculatura lisa intestinal.

En el caso particular del presente trabajo, tomando en cuenta la facilidad de implementación de los ensayos microbiológicos, se decidió hacer una evaluación preliminar del efecto antimicrobiano de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas sobre 10 cepas de enterobacterias patógenas. Los microorganismos evaluados incluyeron: *Aeromona hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*,

Staphylococcus aureus, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*. Estas bacterias se seleccionaron considerando la frecuencia de su aislamiento a partir de heces diarreicas provenientes de pacientes infectados (Koneman *et al.*, 1992). Cabe mencionar que en estos ensayos se decidió utilizar cepas patógenas aisladas directamente de muestras clínicas, considerando que los resultados obtenidos a partir de las evaluaciones, estarían más directamente relacionados con una efectividad "real" de las plantas para el tratamiento de las infecciones bacterianas que ocasionan diarrea.

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo en dos fases. En la primera fase se determinó cualitativamente las propiedades antibióticas de los extractos vegetales en estudio (Hufford *et al.*, 1975; Ríos *et al.*, 1988). En la segunda, los extractos que resultaron activos en la determinación cualitativa, se evaluaron mediante un método de dilución en caldo a fin de cuantificar su potencia antimicrobiana y compararla con la de los controles positivos adecuados (Hufford *et al.*, 1975).

Los resultados de la evaluación microbiológica se muestran en el Cuadro 2 (Artículo 1). Se observa que las únicas enterobacterias susceptibles al efecto de los extractos fueron *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* y *Y. enterocolitica*.

Todas las plantas evaluadas mostraron un efecto antibacteriano contra uno o más de los microorganismos susceptibles. Sin embargo, de manera general, el grado de potencia antibiótica obtenido para los extractos activos, tiende a ser baja comparada con la de los controles positivos.

La actividad antimicrobiana más notable fué la que presentaron los extractos metanólicos de *G. glutinosum* y *Z. venosa* sobre la cepa enteropatógena de *S. aureus*, los cuales mostraron concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) menores de 400 µg/ml. De manera adicional, vale la pena destacar que el extracto metanólico de *D. lanosa* mostró el más amplio

espectro de actividad inhibiendo el crecimiento de *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* y *Y. enterocolitica*, con un rango de CMI entre 600 y 2000 µg/ml.

Los resultados derivados a partir de la evaluación microbiológica, permiten concluir que la moderada actividad antibacteriana que presentaron algunos de los extractos de las plantas, puede ser de beneficio para el tratamiento de las diarreas infecciosas. Sin embargo, no justifica por sí sola el uso tradicional de esas especies para tratar los desórdenes gastrointestinales de etiología bacteriana.

Recientemente, Calzada y colaboradores demostraron, en pruebas realizadas *in vitro*, que los extractos derivados de todas estas especies vegetales carecen de efecto amebicida y giardicida (Calzada *et al.*, 1995). Estos resultados, aunados con el pobre efecto antibacteriano demostrado en el presente trabajo, apoyan las observaciones etnomédicas acerca del uso primario de estas plantas agentes antiespasmódicos.

Con base en estas observaciones, se decidió conducir la investigación hacia la demostración del efecto espasmolítico de las especies seleccionadas. La detección del efecto relajante de la musculatura lisa intestinal se realizó mediante un ensayo farmacológico *in vitro*, que consistió en la evaluación del efecto de los extractos metanólicos de las plantas sobre la contractilidad espontánea del íleon aislado de rata.

Antes de continuar con la discusión de los resultados, en este punto resulta conveniente hacer algunas consideraciones generales con relación a la preparación del íleon aislado y su aplicación como herramienta farmacológica para la detección de fármacos con efecto sobre el Sistema Nervioso y/o la musculatura lisa.

Es un hecho bien establecido que el tracto gastrointestinal está inervado por lo que se considera la tercera división del sistema nervioso autónomo (SNA), conocida como sistema nervioso entérico (SNE). Conjuntamente con el

SNE, las otras divisiones del SNA (simpático y parasimpático), son los responsables del control de las secreciones y motilidad del tracto gastrointestinal (Gershon, 1981).

Se han encontrado evidencias que indican la presencia en el SNE de numerosos neurotransmisores que incluyen: la Ach, la noradrenalina, la serotonina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), el trifosfato de adenosina (ATP), péptidos endógenos (encefalinas, dinorfinas y endorfinas), la sustancia P y el polipéptido vasoactivo intestinal (Furnes, 1982). La presencia de sustancias neurotransmisoras adicionales a la Ach y a la noradrenalina, indica una semejanza entre el SNE y el SNC (Gershon, 1981). De tal forma que la musculatura lisa gastrointestinal constituye un tejido adecuado para la caracterización de compuestos con actividad farmacológica.

La presencia en el SNE de diversas terminales nerviosas, con diferentes neurotransmisores y varios tipos de receptores, le proporciona una gran versatilidad a la preparación de iléon aislado. Además, la relativa facilidad del bioensayo y el requerimiento de pequeñas cantidades de sustancia para inducir un efecto en el ileón, hacen que este modelo sea muy apropiado para la evaluación preliminar de los efectos farmacológicos de los extractos de plantas y para el monitoreo de la actividad biológica durante el proceso de aislamiento de los principios activos (Samuelsson, 1991).

En el caso de la presente investigación, se evaluó el efecto de los extractos metanólicos de las plantas objeto de estudio sobre las contracciones espontáneas del iléon aislado de rata. Esta evaluación demostró que los extractos metanólicos de las ocho plantas evaluadas inducen una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones espontáneas del ileón, de una manera dependiente de la concentración. La Figura 1 del Artículo 1 muestra las respectivas curvas concentración-respuesta obtenidas para el efecto inhibitor de los ocho extractos. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores del

efecto máximo (Emax) y la concentración inhibidora media (CI₅₀), mismos que se indican en el Cuadro 1 del Artículo 1.

Los valores de potencia se calcularon utilizando como comparación el efecto inhibitor inducido por el extracto metanólico de *Datura lanosa* (CI₅₀= 11.91 µg/ml), el cual tiene un alto contenido de los alcaloides espasmolíticos atropina y escopolamina (Bye *et al.*, 1991). Se demostró que el extracto metanólico de *D. viscosa* (CI₅₀= 9.65 µg/ml) es el más potente, con una potencia casi comparable a la del extracto de *D. lanosa*.

Los resultados derivados de esta evaluación farmacológica preliminar permitieron corroborar el efecto antiespasmódico que se les atribuye a las ocho especies objeto de estudio en la medicina popular mexicana. De manera adicional, indicaron que la especie *Dodoanea viscosa* era el candidato más idóneo para la obtención de principios activos potenciales con propiedades antiespasmódicas.

5.2 COMPUESTOS RELAJANTES DE LA MUSCULATURA LISA DE DODONAEA VISCOSA

Con la finalidad de obtener los principios activos espasmolíticos de la *Dodoanea viscosa*, se decidió realizar un estudio fitoquímico biodirigido, utilizando para el monitoreo de la actividad biológica la determinación del efecto inhibitor del extracto, fracciones y compuestos puros sobre las contracciones espontáneas del ileón aislado de cobayo. La razón por la cual se decidió cambiar el modelo farmacológico, se basó en la consideración de que el ileón de cobayo es un tejido de uso más difundido en los estudios farmacológicos (Wagner *et al.*, 1979; Achterrath-Tuckermann *et al.*, 1980; Hagos *et al.*, 1986; Abdalla *et al.*, 1989; Capasso *et al.*, 1990; Capasso *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 1994; Lozoya *et al.*, 1994; Samuelson, 1991; *inter alia*). Esta circunstancia permitiría comparar más fácilmente los resultados obtenidos

en la presente investigación con los resultados de trabajos publicados por otros investigadores.

En una serie de experimentos posteriores a la realización del rastreo farmacológico preliminar, se demostró que el extracto CHCl_3 -MeOH (1:1) de *D. viscosa* era tan activo como el extracto metanólico en el ileón de cobayo. En la Figura 3 del Artículo 2 se indica la curva concentración-respuesta correspondiente al extracto CHCl_3 -MeOH (1:1), el valor de Cl_{50} calculado a partir de esta curva fué de 79.5 $\mu\text{g/ml}$. Con base en estos resultados, se decidió utilizar la mezcla CHCl_3 -MeOH (1:1) como disolvente de extracción para la realización del estudio fitoquímico biodirigido.

En este estudio, 1.9 Kg de la planta seca y molida, se extrajeron con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). El extracto activo se fraccionó vía una cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyentes mezclas de hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo con cantidades crecientes de metanol. Como resultado de este proceso se obtuvieron 10 fracciones cromatográficas primarias. Todas las fracciones fueron evaluadas sobre la contractilidad espontánea del ileón de cobayo a la Cl_{50} del extracto original. Estas evaluaciones demostraron que las cinco fracciones menos polares tenían un efecto relajante y que la mayor actividad se concentraba en la Fracción 1. Las fracciones restantes no mostraron ningún efecto relajante significativo e incluso la fracción 10 inducía contracciones en el ileón (Figura 1 del Artículo 2).

Con base en estos resultados, se procedió a realizar el aislamiento de los principios activos mediante sucesivas recromatografías en columna y en capa fina. Estos procesos de separación permitieron el aislamiento de cuatro principios espasmolíticos. Estos compuestos se caracterizaron, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos como: la sakuranetina, la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona el ácido huatriwaico y el *ent*-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16)14-dien-3 β -8 α -diol (Figura 2 del Artículo 2). Las constantes físicas

y espectroscópicas derivadas de cada uno de los compuestos aislados fueron comparables a las descritas previamente (Mata *et al.*, 1991).

Los cuatro compuestos aislados también inducían una inhibición de las contracciones espontáneas del ileón de cobayo, de una manera dependiente de la concentración (Figura 3 del Artículo 2). Todos los compuestos resultaron ser más potentes que el extracto original, pero menos potentes que el extracto metanólico de *D. lanosa* (Cuadro 1 del Artículo 2).

El efecto inhibitorio de las contracciones espontáneas del ileón de cobayo inducido por los cuatro principios activos, no proporcionaba ninguna información con relación al mecanismo de acción de los mismos. La disminución de la contractilidad originada por los metabolitos de *D. viscosa* en el ileón de cobayo, podría ser el resultado de una interferencia con la síntesis, liberación o degradación de neurotransmisores en el SNE. Pero también podría ser una consecuencia de la interacción directa de los principios activos con los receptores para neurotransmisores, hormonas o autacoides. Asimismo, los compuestos podrían estar interfiriendo con el metabolismo de segundos mensajeros, que influyen en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , el cual es importante para la contracción. De manera adicional, también existía la posibilidad de un efecto directo sobre los algunos de los componentes involucrados en la contracción del músculo liso (Samuelsson, 1991).

Con la finalidad de iniciar la caracterización farmacológica del mecanismo de acción de los principios activos, se decidió investigar su efecto sobre las contracciones del ileón de cobayo inducidas por estimulación eléctrica y por diferentes agentes espasmógenos (Ach, histamina y cloruro de bario).

En primer lugar, con el objeto de detectar si la actividad relajante de los principios activos involucraba un componente anticolinérgico, se determinó la influencia de los cuatro compuestos sobre las contracciones inducidas eléctricamente y por la Ach. El primer modelo se seleccionó considerando que

la Ach es el principal neurotransmisor liberado del plexo mientérico del ileón de cobayo estimulado eléctricamente (Ennis *et al.*, 1985; Samuelsson, 1991).

El conjunto de experimentos diseñados para determinar el efecto de los compuestos sobre el ileón precontraído eléctricamente, demostró que los cuatro principios activos producían una inhibición de las contracciones, de una manera dependiente de la concentración (Figura 4 del Artículo 2). En estas evaluaciones el *ent*-labdano y los dos flavonoides fueron más potentes que el extracto original, en tanto que el ácido hauriwaico fué menos activo. Sin embargo, todos los compuestos fueron considerablemente menos potentes que la atropina (Cuadro 2 del Artículo 2).

En el caso de los experimentos en presencia de Ach, los principios activos se evaluaron a la CI_{50} requerida por el extracto original para inhibir las contracciones del ileón evocadas eléctricamente (106.19 $\mu\text{g/ml}$). Estas pruebas demostraron que el *ent*-labdano, la sakuranetina y el ácido huatriwaico inhibieron las contracciones inducidas por la Ach, siendo los más potentes el *ent*-labdano y la flavanona.

Por otra parte, con relación al flavonol, estudios previos han demostrado que los flavonoles 5,7 disustituídos generalmente relajan el ileón de cobayo precontraído con Ach a concentraciones menores de 106.19 $\mu\text{g/ml}$ (Fanning *et al.*, 1983; Capasso *et al.*, 1988; Capasso *et al.*, 1991; Havsteen, 1983). Sin embargo, la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona, no modificó la respuesta del ileón precontraído con Ach a la concentración de 106.19 $\mu\text{g/m}$ (Figura 5 del Artículo 2). Existe la posibilidad de que este compuesto, que tiene un patrón de sustitución diferente al de los flavonoles previamente evaluados, sea menos potente. En tal caso, sería necesario evaluar concentraciones mayores para definir inequívocamente si la acción de la flavona no involucra ningún componente anticolinérgico.

A partir de los resultados derivados de los dos modelos experimentales antes mencionados (Figuras 4 y 5 del Artículo 2) se puede inferir que la sakuranetina, el *ent-l*abdano y el ácido huatriwaico no bloqueaban directamente los receptores colinérgicos muscarínicos como en el caso de la atropina. Sin embargo, no descartan la posibilidad de que estos metabolitos interfieren en alguno de los pasos involucrados en la neurotransmisión colinérgica o en los mecanismos de transducción mediados por la Ach en el proceso de la contracción muscular.

En otra serie de pruebas, se evaluó el efecto de los principios activos sobre el ileón de cobayo precontraído con histamina, utilizando un diseño experimental semejante al empleado en los ensayos con Ach. El empleo de histamina como espasmógeno de prueba se consideró conveniente dada la alta población de receptores histaminérgicos en el ileón de cobayo y la importancia de este neurotransmisor en la regulación de los movimientos del músculo liso gastrointestinal (Samuelsson, 1991).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5 del Artículo 2. Como se puede observar, los cuatro compuestos inhibieron, de una manera significativa, las contracciones del ileón evocadas por la histamina. Estas observaciones sugerían que los principios activos podrían estar interfiriendo en alguno de los pasos de la neurotransmisión histaminérgica y/o en los mecanismos de transducción de señales activados por la histamina.

La siguiente evaluación en la secuencia metodológica planteada para la caracterización farmacológica preliminar de los principios activos, fué la determinación del efecto de los compuestos sobre las contracciones del ileón de cobayo generadas por el BaCl_2 . En esta ocasión la concentración de prueba empleada para evaluar la acción de las sustancias fué la Cl_{50} del extracto original requerida para inhibir las contracciones espontáneas del ileón (79.51 $\mu\text{g/ml}$).

Estos experimentos se realizaron con el objeto de evaluar una posible interferencia de los principios activos en el transporte y/o el metabolismo del Ca^{2+} en la célula muscular. Se ha determinado, que el bario, de manera semejante al calcio, activa las proteínas contráctiles de músculo. Asimismo, se sabe que el cloruro de bario ocasiona una despolarización en la membrana muscular, originando la activación de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes con el subsecuente aumento en la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. De manera adicional, este aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} provoca un incremento en la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo sarcoplásmico. En resumen, la activación de las contracciones musculares provocada por el BaCl_2 , es una consecuencia del aumento de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} y de la activación directa de las proteínas contráctiles (Antonio *et al.*, 1973; Van Den Broucke y Lemli, 1982; Capasso *et al.*, 1991; *inter alia*).

En la Figura 5 del Artículo 2, se presentan los resultados derivados a partir de la evaluación de los compuestos sobre las contracciones del ileón inducidas por el BaCl_2 . Estas observaciones parecen indicar que la sakuranetina, el *ent*-labdano y la flavona, interfieren de alguna manera con el transporte del Ca^{2+} y/o con los procesos metabólicos mediados por este catión en las células del músculo liso. Por otra parte, el ácido huatriwaico indujo un efecto excitatorio de las contracciones del ileón, el cual resulta muy difícil de explicar con base exclusivamente en los hallazgos obtenidos a partir de este diseño experimental.

Los resultados de las evaluaciones descritas hasta este punto, con relación al comportamiento de la sakuranetina y el *ent*-labdano, indicaron que ambos compuestos bloqueaban las contracciones inducidas por estimulación eléctrica, Ach, histamina y BaCl_2 . Todas estas observaciones conducían a pensar que el mecanismo de acción relajante de los dos metabolitos, no

involucraba la interacción con algún receptor membranal en especial y más bién, sugerían que estos compuestos podrían estar actuando en un paso común en el mecanismo de contracción mediado por los espasmógenos de prueba. Más aún, el bloqueo de las contracciones inducidas por el BaCl_2 indicaban una probable interferencia con el transporte de Ca^{2+} y/o con los procesos metabólicos mediados por el Ca^{2+} .

Con base en las razones anteriormente expuestas y considerando que las investigaciones relacionadas con los efectos espasmolíticos de las flavanonas y diterpenoides son muy escasos. Se decidió examinar el efecto de la sakuranetina y el *ent-labdan* en las contracciones inducidas por el Ca^{2+} en tejido de útero, previamente despolarizado con altas concentraciones de K^+ . En estas condiciones, el útero se contrae como consecuencia del influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L (Bolton, 1979; Granger *et al.*, 1986; Godfraind *et al.*, 1986). En un medio libre de Ca^{2+} , el útero se relaja, de tal forma que la subsecuente adición de concentraciones acumulativas de Ca^{2+} , ocasiona un aumento gradual de las contracciones tónicas del útero que depende exclusivamente del influjo de Ca^{2+} extracelular (Granger *et al.*, 1986).

En el caso del presente estudio, se diseñaron una serie de experimentos en los que se evaluó el efecto de concentraciones únicas de la sakuranetina (1, 3 y 5.8 μM) y del *ent-labdan* (3, 10 y 18 μM) sobre las curvas concentración de Ca^{2+} -respuesta contráctil. En estas evaluaciones, ambos compuestos produjeron un desplazamiento hacia la derecha de las curvas control de Ca^{2+} (Figura 6 del Artículo 2) y una reducción en el efecto máximo, sin afectar significativamente los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) (Cuadro 3 del Artículo 2). Por lo tanto, asumiendo que las contracciones evocadas por el Ca^{2+} en el tejido de útero despolarizado están directamente relacionadas con el influjo de Ca^{2+} al interior de la célula, se puede proponer

que la sakuranetina y el *ent*-labdano actúan como bloqueadores no competitivos de la entrada de Ca^{2+} . Sin embargo, con base exclusivamente en estos resultados, no se puede descartar la posibilidad de que estos compuestos interfieran en alguno de los procesos metabólicos mediados por el Ca^{2+} en el proceso de contracción muscular. Más aún, existe la posibilidad de que el efecto relajante de la musculatura lisa que presenta la flavanona y el diterpeno, se deba a la acción sinérgica de diferentes mecanismos de acción que involucren no solamente la interacción con algún receptor membranal, sino también la interferencia con algún proceso metabólico en el mecanismo de la contracción muscular (Bolton, 1979).

Por otra parte, los resultados de este trabajo sugieren que el mecanismo de acción relajante de la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona no involucra la interacción con algún receptor membranal específico. De hecho, el efecto inhibitorio sobre las contracciones inducidas por BaCl_2 indican que posiblemente este flavonol interfiere con el transporte de Ca^{2+} y/o con su metabolismo. La validez de esta hipótesis dependerá en parte, de los resultados que deriven de los estudios sobre el efecto de este compuesto a concentraciones mayores de $79.5 \mu\text{g/ml}$ sobre el ileón de cobayo precontraído con Ach y de los resultados de estudios en útero de rata despolarizado con altas concentraciones de K^+ .

Finalmente, las observaciones derivadas de los experimentos efectuados con el ácido huatriwaico resultan insuficientes para la proposición de un mecanismo de acción específico. Sin embargo, la significativa respuesta inhibitoria de las contracciones inducidas por histamina y el débil efecto obtenido en el caso de los experimentos de estimulación eléctrica y con Ach, sugieren *a priori* que este compuesto tiene un importante componente antihistaminérgico en su mecanismo de acción relajante.

6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo, se comprobó el uso etnomédico como agentes antiespasmódicos de las especies vegetales *Conyza filaginoides* (D.C) Hieron (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* D.C. var. stramonium (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae) y *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae), mediante la demostración *in vitro* del efecto relajante de la musculatura lisa intestinal de los extractos metanólicos, empleando el modelo de iléon aislado de rata. La especie más potente fué la *D. viscosa*.

2. El fraccionamiento biodirigido del extracto CHCl₃-MeOH (1:1) permitió el aislamiento de cuatro principios espasmolíticos. Estos compuestos se caracterizaron como: la sakuranetina, la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona, el ácido huatriwaico y el *ent*-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16)14-dien-3 β -8 α -diol.

3. La caracterización farmacológica preliminar de la sakuranetina y el *ent*-labdano, indicó que el mecanismo de acción antiespasmódica de estos compuestos involucra un bloqueo de la entrada del Ca²⁺ al interior de la célula muscular y/o una interferencia con alguno de los procesos metabólicos mediados por el Ca²⁺ en el proceso de contracción muscular.

4. Los resultados obtenidos en la presente investigación, sugieren que la relajación de la musculatura lisa inducida por la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona, se debe a una interferencia con el transporte de Ca²⁺ y/o con el metabolismo de este catión en la célula muscular.

5. Las observaciones derivadas de la caracterización farmacológica del ácido huatriwaico, resultan insuficientes para proponer un mecanismo de acción específico. Sin embargo, sugieren que la relajación muscular inducida por este diterpenoide, involucra un componente antihistaminérgico.

6. El diterpeno *ent*-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16)14-dien-3 β -8 α -diol, constituye una nueva clase de metabolitos secundarios que interfieren con el transporte y/o con el metabolismo del Ca²⁺ en las células del músculo liso. En consecuencia, los diterpenoides de tipo *ent*-labdano representan un nuevo prototipo estructural de fármacos, para el desarrollo de agentes medicinales novedosos con posible utilidad en la terapéutica de los trastornos cardiovasculares.

7. Como lo demuestra el presente trabajo, es indudable que el empleo de una estrategia de investigación interdisciplinaria permite por una parte, corroborar las propiedades farmacológicas de plantas medicinales de reconocido uso etnomédico, que podrían constituir nuevas alternativas para la resolución de problemas primarios de salud pública. Y por otra, obtener nuevos prototipos estructurales de productos naturales útiles para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

7. PERSPECTIVAS

1. Culminar la caracterización farmacológica preliminar de la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona, mediante la determinación de su efecto, a concentraciones mayores de 106.19 $\mu\text{g/ml}$, sobre las contracciones del ileón aislado de cobayo precontraído con Ach y el análisis de su acción en el modelo de útero de rata despolarizado con altas concentraciones de K^+ .
2. Confirmar, de manera inequívoca, si la relajación de la musculatura lisa producida por la sakuranetina, el *ent*-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16)14-dien-3 β -8 α -diol y la 3,7-dimetoxi-5,6,4'-dihidroxi-flavona involucra un bloqueo de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L. Par tal fin, se propone el empleo de métodos electrofisiológicos más específicos, como por ejemplo las técnicas de patch clamp y voltage clamp. En este sentido, ya se han establecido los contactos pertinentes con investigadores del Departamento de Neurobiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, con quienes se realizará un trabajo de colaboración para analizar el efecto de los principios activos de *D. viscosa* sobre canales iónicos membranales, mediante la técnica de voltage-clamp en ovocito de *Xenopus laevis*.
3. Realizar los estudios correspondientes para la determinación de la toxicidad de los principios activos de *D. viscosa*.
4. Explorar nuevas fuentes naturales de diterpenoides de tipo labdano, con la finalidad de obtener moléculas novedosas que permitan la realización de estudios de relación estructura química-actividad biológica, a fin de encontrar candidatos potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antiespasmódicos con posible aplicación terapéutica.

BIBLIOGRAFIA

Abdalla, S. y Zarga, M. A. (1987). Effects of cirsimaritin, a flavone isolated from *Artemisia judaica*, on isolated guinea pig ileum. *Planta Med.* **53**, 322-324.

Abdalla, S., Zarga, M. A., Afifi, F., Al-Khalil, S., Mahasneh, A. y Sabri, S. (1989) Effects of 3, 3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J. Pharmacol.* **41**, 138.

Achterrath-Tuckerman, U., Kunde, R., Flaskamp, E., Isaac, O. y Thiemer, K. (1980). Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and kamillosan on the isolated guinea-pig ileum. *Planta Med.* **39**, 38-50.

Adelstein, R. S. y Eisenberg, E. (1980). Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 921-956.

Adnot, S., Desmier, M., Ferry, N. y Hanoune, J. (1982). Forskolín, a powerful inhibitor of human platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 4071.

Aguilar, A. y Camacho, J. R. (1984). La Herbolaria como Recurso Básico. Estadísticas Nacionales. En: *Medicina Tradicional y Herbolaria. Materiales para su estudio*. Publicación del IMSS, México, pp 88-92.

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S. Jácquez, P. y López, M. E. (1994). Información etnobotánica. En: *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Publicación del IMSS, México, pp. 10-12.

Anselmi, E., Fayos, G., Blasco, R., Cardenas, M. L., Cortes, D. y D'ocon, M. P. (1992). Selective inhibition of calcium entry induced by benzyloquinolines in smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* **44**, 337-343.

Anselmi, E., Gómez-Lobo, M. D., Blásquez, M. A., Zafra-Polo, M. C. y D'ocon, M. P. (1994). Influence of the absolute configuration on the vascular effects of tetrandrina and isotetrandrine in rat aorta. *Pharmazie*. **49**, 440-443.

Antonio, A., Rocha e Silva, M. y Yashuda, Y. (1973). The tachyphylactic effect of barium on intestinal smooth muscle. *Arch. int. Pharmacodyn.* **204**, 260-267.

Bejar, E., Lozoya, X., Enriquez, R. y Escobar, L. (1984). Comparative effect of zoapatle (*Montanoa tomentosa*) products and of verapamil on the *in vitro* uterine contractility of rat. *Arch. Invest. Méd. (Méx)* **15**, 223.

Bergendorff, O. y Sterner, O. (1995). Spasmolytic flavonols from *Artemisia abrotanum*. *Planta Med.* **61**, 370-371.

Berlin, B. y Berlin, E. A. (1994). Antropological Issues in Medical Ethnobotany. En: *Ethnobotany and Research for new drugs*. CIBA Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, New York.

Berridge, M. J. (1988). Inositol lipids and calcium signalling. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **234**, 359-378.

Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA, semana 25 (1994) México, pp. 1.

Bolton, T. B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718.

Bonner, T. I. (1989). The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci.* 12, 148-151.

Bowman, W. C. y Rand, M. J. (1984). *Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. Segunda edición. Editorial Interamericana, México.

Bye, R., Mata, R. y Pimentel, J. (1991). Botany, ethnobotany and chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in Mexico. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 61, 21-42.

Cáceres, A., Torres, M. F., Ortiz, S., Floridalma, C. y Jauregui, E. (1992). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. IV Vibriocidal activity of five American plants used to treat infections. *J. Ethnopharmacology* 39, 73-75.

Calzada, F. (1995). Comunicación Personal.

Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G. y Franco, F. P. (1988). Effect of flavonoids on PGE₂- and LTD₄-induced contractions of the guinea pig isolated ileum. *Pharm. Res. Comm.* 20 (Suppl. 1), 201-202.

Capasso, A., Pinto, A., Sorrentino, R. y Capasso, F. (1991a). Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea pig isolated ileum. *J. Ethnopharmacology* 34, 279-281.

Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G. y Capasso, F. (1991b). Reduction of agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.* **5**, 85-87.

Chen, K. K., Harris, P. N. y Shulze, H. A. (1940a). The toxicity of lasiocarpine. *J. Pharmac. exp. Ther.* **68**, 123-129.

Chen, K. K., Harris, P. N. y Rose, C. L. (1940b). The action and toxicity of platyphylline and seneciphylline. *J. Pharmac. exp. Ther.* **68**, 130-140.

Cherubini, E. y North, R. A. (1985). μ and κ opioids inhibit transmitter release by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1860-1863.

Chuliá, S., Ivorra, M. D., Lugnier, C., Vila, E., Noguera, M. A. y D'ocon, P. (1994). Mechanism of the cardiovascular activity of laudanosine: comparison with papaverine and other benzyloisoquinolines. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 1377-1385.

Cordell, G. A., Beecher, C. y Pezzuto, J. M. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of a new anticancer drug? *J. Ethnopharmacology* **32**, 117-133.

Cortes, D., Torrero, M. Y., D'ocon, M. P., Cardenas, M. L., Cave, A. y Hadi, A. H. A. (1990). Norstephalagine et atherospermidine, deux aporphines d'*Artabotrys maingayi* relaxantes du muscle lisse. *J. Nat. Prod.* **53**, 503-508.

Coupar, I. M. (1987). Minireview. Opioid action on the intestine: the importance of the intestinal mucosa. *Life Sciences*, **41**, 917-925.

Culvenor, C. C. J., Dan, A. T. y Dick, A. T. (1962). Alkylation as the mechanism by which the hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. *Nature* **195**, 570-573.

Cumiskey, W. R. y Feigenson, M. E. (1983). Spasmolytic activity of cinnamedrina and papaverine in isolated rat uterine muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **263**, 113-119.

Darfler, F. J., Mahan, L. C., Koachman, A. M. y Insel, P. A. (1982). Stimulation by forskolin of intact S49 lymphoma cells involves the nucleotide regulatory protein of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **257**, 11901.

Demesy, F. y Stoclet, J. C. (1975). Papaverine, cyclic AMP and the dependence of the rat aorta on extracellular calcium. *Eur. J. Pharmacol.* **31**, 185-194.

Den Hertog, A., Pielkenrood, J. y Van Den Akker, J. (1985). The effect of forskolin on smooth muscle cells of guinea-pig *Taenia caeci*. *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 181-184.

Dimbi, M., Delaude, C. y Kapundo, M. (1985). Triterpenoids of *Dodonaea viscosa*. *Bull. Soc. Chem. Belq.* **42**, 141-148.

D'ocon, M. P., Blasco, R., Cardenas, M. L., Ivorra, M. D., López, S., Villaverde, C., Castedo, L. y Cortes, D. (1991). Inhibition of calcium entry induced by cularines and isocrasifoline in uterine smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **196**, 183-187.

Domínguez, X. A. (1972). Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochem.* **11**, 1855-1856.

Domínguez, X. A. (1974). Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochem.* **13**, 1626-1628.

Dominguez, X. A. y Franco, R. (1980). Aislamiento de 3, 6, 4'-trimetoxi-5, 7-dioxiflavona en el Capuliztle (*Dodonaea viscosa*). *Rev. Latinoam. Quim. II.* **11**, 150-151.

Dreyer, L. D. (1978). Kaempferol methyl ethers from leaves of *Dodonaea viscosa*. *Rev. Latinoam. Quim.* **9**, 97-98.

Ennis, C., Haroun, F. y Lattimer, N. (1985). Can the effects of meptazinol on the guinea pig isolated ileum be explained by inhibition of acetylcholinesterase. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 24-27.

Fanning, M. J., Macander, P., Drzewiecki, G. y Middleton, E. (1983). Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea pig ileum smooth muscle. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **71**, 371-373.

Foye, W. O., Lemke, T. L. y Williams, D. A. (1995). Principles of Medicinal Chemistry. Fourth Edition. Editorial Williams and Wilkins, U. S. A.

Furnes, J. B. y Costa, M. (1982). In: Mediators and drugs in gastrointestinal motility I. G. Bertaccini, Ed. Springer Verlag, Berlin, pp. 383-460.

Gershon, M. D. (1981). In "*Smooth Muscle: an Assessment of Current Knowledge*". E. Bulbring et al., eds. E. Arnold, London, pp. 263-284.

Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615-649.

Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S. y Taylor, P. (1992). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición, Editorial Medica Panamericana, México, D. F.

Godfraind, T., Miller, R. y Wibo, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharm. Rev.* **38**, 321-415.

Granger, S. E., Hollingworth, M. y Weston, A. H. (1986). Effects of calcium antagonists on tension development and calcium influx in rat uterus. *Brit. J. Pharmacol.* **87**, 147-156.

Haga, K., Haga, T., Ichiyama, A., Katada, T., Kurose, H. y Ui, M. (1985). Functional reconstitution of purified muscarinic receptors and inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Nature* **316**, 731-733.

Haga, K., Haga, T. y Ichiyama. (1986). Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **261**, 10133-10140.

Hagiwara, W. A. y Yoshikami, S. (1981). Calcium channel. *Annu. Rev. Neurosci.* **4**, 69-125.

Hagos, M., Samuelsson, G., Kenne, L. y Modawi, B. M. (1987). Isolation of smooth muscle relaxing 1,3-diaryl-propan-2-ol derivatives from *Acacia tortilis*. *Planta Med.* **53**, 27-31.

Hamburger, M. y Hostettman, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874.

Harris, P. N., Anderson, R. C. y Chen, K. K. (1942a). The action of senecionine, integerrimine, jacobine, logilobine and spartioidine, specially on the liver. *J. Pharmac. exp. Ther.* **75**, 69-77.

Harris, P. N., Anderson, R. C. y Chen, K. K. (1942b). The action of monocrotalina and retronecine. *J. Pharmac. exp. Ther.* **75**, 78-82.

Havsteen, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **32**, 1141-1148.

Heinrich, M. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a low land Mixe community (Oaxaca, Mexico). *J. Ethnofarmacology* **36**, 63-80.

Hernández-Falcón, J., Taboada, J., Guerrero, C., Campos-Lozada, V., Fernández, D. y Fuentes-Pardo, B. (1991). Relaxant effect of viguiepinol on smooth muscle *in vitro*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **34**, 199-203.

Hofmann, F., Biel, M. y Flockerzi, V. (1994). Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 399-418.

Hsu, Y., Chen, Y. P. y Kakisawa, H. (1971). Structure of huatriwaic acid. *Phytochem.* **10**, 2813-2814.

Hufford, C. D., Funderburk, M. J. y Robertson, L. W. (1975). Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liliodendron tilipifera* L. *J. of Pharm. Sci.* **64**, 789-792.

Ivorra, M. D., Chuliá, S., Lugnier, C. y D'ocon, P. (1993). Selective action of two aporphines at α_1 -adrenoceptores and potencial-operated Ca^{2+} channels. *Eur. J. Pharmacol.* **231**, 165-174.

Kamm, K. E. y Stull, J. T. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 593-620.

King, V. F., García, M. L., Himmel, D., Reuben, J. P., Lam, Y. T., Pan, J., Han, G. y Kaczorowski, G. J. (1988). Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. *J. Biol. Chem.* **263**, 2238-2244.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommers, H. M. y Winn, W. C. (1992). *Diagnóstico Microbiológico*. Tercera edición. Editorial Panamericana, Buenos Aires.

Kruk, Z. L. y Pycock, C. J. (1991) Neurotransmitters and drugs. Third edition. Editorial Chapman and Hall, U. K.

Kumamoto, J., Scora, W. y Clerx, W. (1985) Terpenes of leaves of *Parthenium tormentosum*. *J. Agric. Food. Chem.* **33**, 650-652.

Litusch, Y., Hudson, T. H., Mills, I., Li, S. Y. y Fain, J. N. (1982). Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. *Mol. Pharmacol.* **22**, 109.

Londog, W. (1986) Present status and future perspectives of muscarinic receptor antagonists. *Scand. J. Gastroenterol.* **21**, 55-59.

Lozoya, X., Aguilar, A. y Camacho, J. R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional mexicana. *Rev. Méd. IMSS (Méx)*, Vol. 25, Núm. 4, pp. 283-291.

Lozoya, X. (1993) Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: *La investigación científica de la herbolaría medicinal mexicana*. Secretaría de Salud. México, pp. 255-270.

Lozoya, X. (1994) Two decades of Mexican ethnobotany and research in plant drugs. En: *Ethnobotany and search for new drugs*. Chichester (Ciba Foundation Symposium 185), pp. 130-152.

Lugnier, C., Bertrand, Y. y Stoclet, J. C. (1972). Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition and vascular smooth muscle relaxation. *Eur. J. Pharmacol.* 19, 134.

Maldonado, E., Mendoza, G., Cárdenas, J. y Ortega, A. (1985). Sesquiterpene lactones from *Parthenium tormentosum*. *Phytochem.* 24, 2981-2985.

Mata, R., Contreras, J. L., Crisanto, D., Pereda-Miranda, R., Castañeda, P. y del Río, F. (1991). Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. XVII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*. *J. of Natural Products* 54, 913-917.

Mata, R. (1993). Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. En: *Phytochemical Potencial of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 27, Plenum Press, New York, pp. 41-64.

Mattocks, A. R. (1986). *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Associated Press, New York, pp. 191-249.

McKenzie, J. S. (1958). Some pharmacological properties of pyrrolizidine alkaloids and their relationship to chemical structure. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **36**, 11-21.

Mikayado, M., Ohno, N., Yoshioka, H., Mabry, T. y Whiffin, T. (1974). Gymnospermin. New labdantriol from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochem.* **13**, 189-190.

Morales, M. A. y Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effects of Quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Med.* **60**, 313-317.

Morales, M. A., Tortoriello, J., Meckes, M., Paz, D. y Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajalva* L. *Arch. Med. Res.* **25**, 17-21.

Nair, A. G. y Subramanian, S. S. (1975). Isorhamnetin and quercetin glycosides from *Dodonaea viscosa* and *Sapindus emarginatus*. *Indian. J. Chem.* **13**, 639-640.

Nasiri, A., Holt, A. y Björk, L. (1992). Effects of sesquiterpene capsidiol on isolated guinea-pig ileum and trachea, and on prostaglandin Synthesis *in vitro*. *Planta Med.* **59**, 203-206.

Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312.

North, R. A. y Williams, J. T. (1985). On the potassium conductance increased by opioids in rat locus coeruleus neurines. *J. Physiol.* **364**, 265-280.

Ortiz de Urbina, A. V., Martín, M. L., Fernández, B., San Román, L. y Cubillo, L. (1994). In Vitro antispasmodic activity of peracetylated penstemonoside, Aucubin and catalpol. *Planta Med.* **60**, 512-515.

Pasternak, G. W. (1988). Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. *J. A. M. A.* **259**, 1362-1367.

Patnaik, G. K. y Dhawan, B. N. (1982). Evaluation of spasmolytic activity of clausmarin-A. A new coumarin from *Clausena pentaphylla* (roxb.)dc. *J. Ethnopharmacology* **6**, 127-137.

Pauling, P. J. y Petcher, T. J. (1970). Interaction of Atropine with the Muscarinic Receptor. *Nature* **228**, 673-674.

Pomeroy, A. R. y Raper, C. (1971). Pyrrolizidine alkaloids: actions on muscarinic receptors in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmac.* **41**, 683-690.

Ponce-Monter, H., Campos-Lara, G., Pedrón, N., De la Torre, L., Villanueva, T., Gallegos, A., Romo de Vivar, A., Azpeitia, E. y Pérez, A. (1988). The zoapatle XV. Activity of 16 α -hydroxy-ent-kauran-19-oic acid isolated from *Montanoa Hibiscifolia*, and its methyl ester on rat and guinea pig uterus. *J. Ethnopharmacology.* **24**, 127-134.

Rauwald, H. W., Odenthal, K. P. y Brehm, O. (1994). Screening of nine vasoactive medicinal plants for their possible calcium antagonistic activity.

Strategy of selection and isolation for the active principles of *Olea europaea* and *Peucedanum ostruthium*. *Phytother. Res.* **18**, 135-140.

Reinhardt, D., Roggenbach, W., Schmidt, U. y Schumann, H. J. (1977). Effects of papaverine on the frequency-force relationship in guinea-pig left atria. *Eur. J. Pharmacol.* **41**, 123-126.

Rios, J. L., Recio, M. C. y Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. of Ethnopharm.* **23**, 127-149.

Rios, E., Pizarro, G. y Stefani, E. (1992). Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 109-133.

Rodríguez, E., Carman, N. y Chávez, P. (1972). Quercetagenin 3,3'-dimethyl ether, a new flavonoid from *Parthenium tormentosum*. *Phytochem.* **11**, 1507-1508.

Sachdev, L. y Kulshreshtha, D. K. (1982). Aliarin, a new flavonoid from *Dodonaea viscosa*. *Indian. J. Chem.* **21B**, 798-799.

Sachdev, L. y Kulshreshtha, D. K. (1983). Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* **25**, 1253-1256.

Sachdev, L. y Kulshreshtha, D. K. (1986). Viscosol a C-3' prenylated flavonoid from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* **25**, 1967-1969.

Samuelsson, G. (1991). Assays for Pharmacological Activity: Non-Specific Assays. In: *Methods in plants biochemistry*. Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 261-280.

Sastry, K. N. S. y Nayudamma, Y. (1966). Leucicyanidin from *Dodonaea viscosa* bark. *Leather Sciences* 13, 174-176.

Schneider, J. A., Brooker, G. y Sperelakis, N. (1975). Papaverine blockade of an inward Ca^{2+} current in guinea-pig heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 7, 867-871.

Schoental, R. (1957). Hepatotoxic action of pyrrolizidine (senecio) alkaloids in relation to their structure. *Nature* 179, 361-363.

Triggle, D. J., Lings, D. A. y Janis, R. A. (1989). Ca-channels ligands: structure-function relationship of the 1,4-dihydropyridines. *Med. Res. Rev.* 9, 123-180.

Triner, L., Vulliemoz, Y., Schwartz, I. y Nahas, G. G. (1970). Cyclic phosphodiesterase activity and the action of papaverine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 64.

Tsien, R. W., Ellinor, P. T. y Horne, W. A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 349-354.

Tyler, V. E. (1989). *Pharmacognosy*. Octava edición. Editorial Lea and Febiger, U. S. A.

Van Den Broucke, C. O. y Lemli, J. A. (1982). Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.* 45, 188-190.

Van Puyvelde, L., Lefebvre, R., Mugabo, P., Kimpe, N. D. y Schamp, N. (1987). Active particibles of *Tetradenia riparia*, II. Antispasmodic activity of 8(14), 15-Sandaracopimaradiene-7 α , 18 diol. *Planta Med.* 53, 156-158.

Varagic, V. M., Milovanovic, S. R. y Srkalovic, G. (1984). The effect of calcium-channel-blocking agents on the various types of smooth muscle. Activation of the isolated rat uterus. *Arch. int. Pharmacodyn.* 270, 79-87.

Vlietinck, A. J. y Vanden Berghe, D. A. (1991). Can ethnopharmacology contribute to development of antiviral drugs? *J. Ethnopharmacology* 32, 141-153.

Wagner, H., Jurcic, K. y Deininger, R. (1979). Antispasmodic activity of eugenol-esters and ethers. *Planta Med.* 37, 9-14.

Wagner, H. y Jurcic, K. (1979). On the spasmolytic activity of Valeriana extracts. *Planta Med.* 37, 84-95.

Wagner, H., Ludwin, C., Grotjahn, L. y Khan, M. S. Y. (1987). Biologically active saponins from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* 26, 697-701.

Yang, M. S., Wu, T. S. y Wang, C. H. (1987). Citracridone-I: a new antispasmodic from Root Barks of *Citrus depressa*. *Planta Med.* 53, 143-147.

Zukin, R. S. y Zukin, S. R. (1981). Multiple opiate receptors: emerging concepts. *Life Sci.* 29, 2681-2690.

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy
and Phytopharmacology

VOL 2/1 1995

EDITORS IN CHIEF

N. R. Farnsworth, Ph.D.
Chicago, (U.S.A.)

H. Wagner, Ph.D.
Munich (Germany)

EDITORIAL BOARD

H. P. T. Ammon, Ph.D., M.D.
Tübingen (Germany)

Y. Asakawa, Ph.D.
Tokushima (Japan)

M. F. Balandrin, Ph.D.
Salt Lake City, UT (U.S.A.)

R. Bauer, Ph.D.
Düsseldorf (Germany)

A. S. Bingel, Ph.D.
Chicago, IL (U.S.A.)

L. Bohlin, Ph.D.
Uppsala (Sweden)

H. J. Dengler, M.D.
Bonn (Germany)

J. P. Devlin, Ph.D.
New Milford, CT (U.S.A.)

W. Dorsch, M.D.
Mainz (Germany)

E. Elisabetsky, Ph.D.
Porto Alegre (Brazil)

E. Ernst, M.D.
(Centre of Compl. Health Studies)
Exeter (U.K.)

H. J. Gabius, Ph.D.
Munich (Germany)

P. Goldman, M.D.
Boston, MA (U.S.A.)

E. G. Hahn, M.D.
(University Erlangen)
Erlangen-Nürnberg (Germany)

J. T. Hicks, M.D., FACP, FACR
Arlington, VA (U.S.A.)

K. Hostettmann, Ph.D.
Lausanne (Switzerland)

M. Iwu, Ph.D.
Nsukka (Nigeria)

D. Kanjanapothi, Ph.D.
Chiang Mai (Thailand)

J. Kleijnen, M.D., Ph.D.
Amsterdam (Netherlands)

H. Ch. Korting, M.D.
Munich (Germany)

M. A. Lacaille-Dubois, Ph.D.
Dijon (France)

D. McKenna, Ph.D.
Minneapolis, MN (U.S.A.)

D. D. McPherson, M.D., Ph.D.
Phoenix, AZ (U.S.A.)

W. H. Marks, M.D., Ph.D.
Seattle, WA (U.S.A.)

D. Melchart, M.D.
Munich (Germany)

A. Panthong, Ph.D.
Chiang Mai (Thailand)

T. Peters, M.D.
Ulm (Germany)

H. D. Reuter, Ph.D.
Cologne (Germany)

G. V. Satyavati, Ph.D.
New Delhi (India)

V. Schulz, M.D.
Berlin (Germany)

C. P. Siegers, M.D.
Lübeck (Germany)

Z.-Y. Song, Ph.D.
Beijing (China)

P. Tao, M.D.
Beijing (China)

M. Tempesta, Ph.D.
South San Francisco, CA
(U.S.A.)

K. Terasawa, M.D., Ph.D.
Toyama (Japan)

F. F. Vincieri, Ph.D.
Florence (Italy)

A. Vlietinck, Ph.D.
Antwerpen (Belgium)

H. G. Vogel, M.D., Ph.D.
Hofheim (Germany)

H. Watanabe, Ph.D.
Toyama (Japan)

P. Xiao, Ph.D.
Beijing (China)

H. Yamada, Ph.D.
Tokyo (Japan)

GUSTAV FISCHER
JENA
NEW YORK



Spasmolytic Potential of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Gastrointestinal Disorders *

A. ROJAS^{1,2*}, S. CRUZ³, V. RAUCH⁴, R. BYE⁵, E. LINARES⁵, R. MATA¹

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D. F., México

² Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 76010, Querétaro, México

³ Departamento de Farmacología, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV, IPN, 14000, México D. F., México

⁴ Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario 76010, Querétaro, México

⁵ Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D. F., México

Summary

The present investigation describes the effect on the isolated rat ileum of methanolic extracts derived from *Conyza filaginoides* (D. C.) Hieron (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK. (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* DC. var. *stramonium* (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae), *Zornia venosa* Mohlenbr. (Fabaceae) and *Datura lanosa* Barclay ex Bye (Solanaeae). In all the cases the extracts inhibited, in a concentration-dependent manner, the spontaneous contraction of the intestinal smooth muscle. The most active extract was that of *D. viscosa*. These findings tend to support the ethnomedical use of the selected species as spasmolytic agents in Mexican traditional medicine. Additionally, the potential antimicrobial activity of the extracts against pathogenic enterobacteria was investigated. Seven of the nine plants evaluated displayed antibacterial effects.

Key words: *Conyza filaginoides*; *Croton fragilis*; *Dodonaea viscosa*; *Gymnosperma glutinosum*; *Parthenium tomentosum*; *Potentilla thurberi*; *Pterogonum atrorubens*; *Zornia venosa*; *Datura lanosa*; isolated rat ileum; spasmolytic effect; smooth muscle relaxation; antimicrobial effect.

Introduction

Mexican herbaria literature refers to the use of several plants for the treatment of stomach-aches (with or without diarrhoea), pains of hepatic or splenic origin, uterine colic and other disorders involving smooth muscles. However, most of these species have not yet been investigated from a pharmacological or a phytochemical point of view. Therefore, we have initiated a screening program to evaluate the

spasmolytic activity of some of these species and to isolate the active constituent(s) for therapeutic exploitation.

Among the most commonly prescribed herbs to treat stomach-aches, the following species were selected for their pharmacological evaluation: *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron. (Asteraceae), *Croton fragilis* HBK. (Euphorbiaceae), *Dodonaea viscosa* Jacq. (Sapindaceae), *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Asteraceae), *Parthenium tomentosum* DC. var. *stramonium* (Greene) Rollins (Asteraceae), *Potentilla thurberi* A. Gray (Rosaceae), *Pterogonum atrorubens* (Englem.) H. Gross (Polygonaceae), *Zornia ve-*

* Taken in part from the Ph. D. Thesis of A. Rojas.

nosa Mohlenbr. (Fabaceae) and *Datura lanosa* Barclay ex Bye (Solanaceae).

Studies concerning the chemical composition of some of these species have been previously described; however, neither the plant extracts nor their constituents have been studied pharmacologically. Phytochemical investigations of *D. viscosa* have allowed the isolation of different types of secondary metabolites including several flavonoids (Sastry and Nayudamma, 1966; Sachdev and Kulshreshtha, 1983; Mata et al., 1991), some diterpenoids (Hsu et al., 1971; Sachdev and Kulshreshtha, 1983; Mata et al., 1991), condensed tannins (Sastry and Nayudamma, 1986), triterpenoids and two biologically active saponins (Wagner et al., 1987). Phytochemical analyses of *P. tomentosum* have revealed the presence in the plant of a number of compounds, including several guaianolide type of sesquiterpene lactones (Maldonado et al., 1985), a flavone (Rodríguez et al., 1972) and some monoterpenoids (Kumamoto et al., 1985). From *G. glutinosum* there have been isolated two flavones, three monoterpenes (Dominguez, 1974) and one diterpene (Mikayado et al., 1974). α -Spinasterol and β -Amyrin were isolated from *C. filaginoides* (Dominguez, 1972) and *D. Lanosa* was found to contain several tropane alkaloids including scopolamine and atropine, two well known antispasmodic agents (Bye et al., 1991).

The present study was undertaken in order to confirm the spasmolytic action suggested by the traditional use of the selected species by investigating the effect of their methanolic extracts on spontaneous contractions of the isolated rat ileum. In addition, the potential antimicrobial activity of the extracts against pathogenic enterobacteria was investigated.

Materials and Methods

Plant material

The plant materials used in the present study were collected in different parts of Mexico: *Conyza filaginoides* from Juchitepec, State of Mexico; *Dodonaea viscosa* from Oaxaca; *Gymnosperma glutinosum* from Sana Catarina State of Mexico; *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Parthenium tomentosum* var. *stramonium*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens* and *Zornia venosa* from Chihuahua. Authenticated Voucher specimens (Bye and Linares 17983, Cisneros 368, Bye and Linares 17985, Bye 18019, Bye 15622, Bye 18014, Bye 18057, Bye 18037 and Bye 18069, respectively) are deposited in the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium (MEXU) located in the Botanical Garden of the Institute of Biology, U.N.A.M., Mexico City.

Extraction

Pharmacological and microbiological studies were performed with extracts of the dried plants prepared as follows: 20g of the finely ground dried plant material were

Soxhlet extracted with 100 ml of methanol at 70°C or 100 ml of chloroform at 50°C for 6 hours. The extracts were evaporated under vacuum to a thick residue which were stored at room temperature for later use.

For bioassays, all extracts were dissolved in dimethylsulfoxide. The final concentration of the solvent in the isolated organ bath chamber was 0.2 % v/v.

Isolated rat ileum test

Sprague-Dawley male rats (200–250g) were killed by cervical dislocation. After discarding the 10 cm nearest the ileocaecal junction, the terminal ileum was removed and placed in a Krebs-Henseleit solution (at 37°C and pH 7.4) of the following composition (mM): NaHCO₃ 20, NaCl 119, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5 and glucose 11.4, bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂. The intestinal content was removed by washing with Krebs-Henseleit solution and the mesenteric residues were eliminated.

The ileum was cut into 1 cm long segments. Each segment was placed vertically in a 10 ml tissue chamber and bathed with Krebs-Henseleit solution. An initial tension of 1 g was applied to the ilea and a 30 min period of stabilization was allowed. Spontaneous activity was measured using force transducers (Grass FT03) connected to a polygraph (Grass 7D).

Following the stabilization period, a 10 min control period was recorded. Afterward, each methanolic plant extract was added to the bath chamber in a volume of 20 μ l at different non-cumulative concentrations (only one concentration was used for each ileum segment). The concentrations used were from 0.5 to 5000 μ g/ml. When required, intermediate doses were tested. The methanol extract of *D. Lanosa* (from 0.5 to 500 μ g/ml) was used as a positive control due to its high content of scopolamine and atropine. All the responses were recorded during 10 min.

Pharmacological data analysis

The effect of the extracts was determined by comparing the areas under the curve inscribed by the frequency and amplitude of the ileum contraction, before and after the application of the extracts. Areas were calculated from the polygraph tracings, using an analogical-digital tablet (CPLAB-10) and a specially designed software. The values were expressed as percentages of inhibition of contractile response calculated from six data \pm S. E. The differences between the means of two groups were estimated using the Student's *t* test for unpaired data.

The concentration-response curves for the extracts were plotted and the experimental data from the CRC were adjusted by the nonlinear, least squares, curve fitting program (PC NONLIN), using the following equation: $E = (E_{max} C^n) / (C^n + IC_{50}^n)$ where E_{max} is the maximum inhibitory effect, C is the concentration of the extract, IC_{50} is the concentration at which 50 % of the maximum inhibition of il-

eum spontaneous contraction was achieved; γ (gamma) is a number expressing the sigmoidity or the concentration-effect relationship. When γ is less than 1, the curve flattens; when it is greater than 1, the curve becomes steeper (Schwinghammer and Kroboth, 1988). Parameters derived from this adjustment were compared by means of their 95% confidence intervals. The initial values for nonlinear adjustment were obtained after the logit transformation of experimental data.

Screening for antimicrobial activity

The enteropathogenic bacteria used in the present study were isolated from human clinical samples. They include: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Yersinia enterocolitica*. All microorganisms are deposited in the stock culture of the Faculty of Chemistry, University of Querétaro.

The methanol and the chloroform extracts were evaluated for qualitative antimicrobial activity using the agar plate diffusion assay (Hufford et al., 1975; Rios et al., 1988). Agar plates containing 1 ml (10^6 bacteria/ml) of an overnight broth culture were prepared. Filter paper discs ($\varnothing = 6$ mm) (Schleicher and Schuell) were drenched with 100 and 50 μ l of the crude extracts at a concentration of 10 mg/ml and dried in the open air. The discs were placed on the inoculated media and the plates were then incubated at 37°C for 24 h. Appropriate antibiotics were used as positive controls, depending on the susceptibility of the test bacteria (gentamicin: *P. mirabilis*, *S. flexneri* and *Y. enterocolitica*; sulphamethoxazole: *A. hydrophila*; ampicillin: *E. coli*; gentamicin: *P. mirabilis*; carbenicillin: *P. aeruginosa*; amikacin: *S. typhi*; cephalothin: *S. aureus* and tetracycline: *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*). In all the cases, the diameters of the resultant inhibition zones were measured.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was accomplished by the serial dilution technique (Hufford et al., 1975). For the quantitative antimicrobial assays, each extract was dissolved in MeOH-H₂O 1:1 (20 mg/ml); 0.5 ml of this solution was then added to 4.5 ml of nutrient broth. Doubling serial dilutions were aseptically prepared from this broth with concentrations ranging from 2000-4 μ g/ml. Each dilution was inoculated with 10 μ l of bacteria to a final concentration of 10^6 /ml. After overnight incubation the MIC was determined.

Results

Intestinal smooth muscle relaxant activity

The methanol extracts of all the species tested showed a concentration-dependent inhibition of the tone and amplitude of spontaneous contractions on the rat ileum. Fig. 1 shows the concentration-response curves for the nine extracts.

It is worth noting that all the extracts displayed a similar efficacy in inhibiting spontaneous activity. No statistically significant differences in the 95% confidence intervals were observed between the Emax of the extracts. The main difference between the groups was related to their inhibitory potency (see Table 1). *D. viscosa* showed the highest potency compared with the extract of *D. lanosa* (positive control).

Antibacterial activity

The potential antimicrobial activity against some enteropathogenic bacteria of the methanol and chloroform extracts of the selected species are presented in Table 2. The results are expressed as minimal inhibitory concentrations (MIC). As shown, only five of the ten microorganisms employed were susceptible to the test extracts. The most active extract was that of *D. lanosa*, which exhibited antimicrobi-

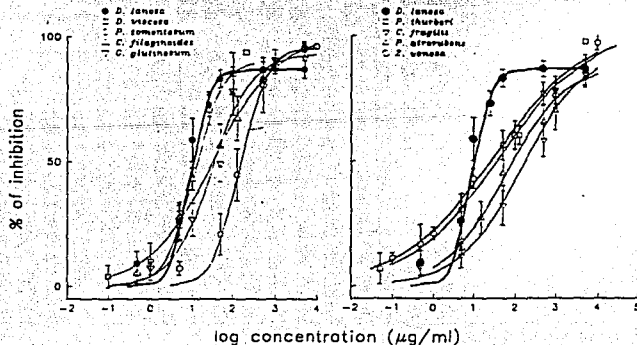


Fig. 1. Concentration-response curves for the methanolic extracts of *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Dodonaea viscosa*, *Gymnosperma glutinosum*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogorum atrorubens*, *Zornia venosa* and *Datura lanosa* on the spontaneous contraction of isolated rat ileum.

al activity against *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica* with MICs of 62.5, 858, 950, 875 and 1961 µg/ml respectively.

Discussion

The results obtained in the present investigation indicate that the methanol extracts of the nine plants evaluated have spasmolytic activities to varying degrees on the isolated rat ileum preparation. The demonstrated activity may account for the use of these species as antispasmodic agents in Mexican traditional medicine.

As previously mentioned, the potency of the extracts was calculated by comparing their relaxant effects with that of the methanol extract of *D. lanosa*, which contains the spasmolytic alkaloids atropine and scopolamine. Both compounds possess anticholinergic activity. The most active extract was that of *D. viscosa*, which exhibited almost the same potency as *D. lanosa*. The methanol extracts of *G. glutinosum*, *P. thurberi*, *Z. venosa* and *C. filaginoides*, displayed antispasmodic activities corresponding to 32%, 31%, 23% and 22% of the positive control, respectively. The less active extracts were those of *P. tomentosum* and *C. fragilis*, while the extract of *P. atrorubens* produced only moderate relaxation of the spontaneous contractions of the rat ileum.

It has been reported that some flavonoids produce inhibition of induced or spontaneous contractions of guinea pig ileum (Capasso et al., 1991; Fanning et al., 1983; Havsteen, 1983; Macander, 1986). Therefore, the presence of this type of secondary metabolite could be related to the intestinal relaxant effect demonstrated by the methanolic extracts

of *D. viscosa* and *G. glutinosum*. Since the spontaneous movements of the intestine are Ca²⁺ dependent, it is probable that the inhibitory effect induced by the extracts of these species, might be due to interference with Ca²⁺ influx and/or Ca²⁺ release from an intracellular store, as has been suggested to interpret the inhibitory effects of some flavonoids on guinea-pig (Capasso et al., 1991; Fanning et al., 1983; Havsteen, 1983).

The data obtained from the present pharmacological evaluation are not sufficient to propose a possible mechanism of action involved in the antispasmodic activity of the species. Therefore, further pharmacological and phytochemical studies must be undertaken in order to clarify the mode of action of the active principles obtained from those plants.

Regarding the investigation of the plant extracts for possible antimicrobial activity, the only susceptible enterobacteria were *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica*. Seven of the nine plants evaluated displayed antibacterial effect against one or more of the susceptible microorganisms. However, the grade of antibiotic potency obtained for the active extracts tend to be low compared with that of the positive controls.

The most remarkable activity was that produced by the chloroform extract of *C. filaginoides* and the methanol extracts of *G. glutinosum* and *Z. venosa* against *S. aureus*, with minimal inhibitory concentrations less than 400 µg/ml. On the other hand, the methanol extract of *D. lanosa* showed the widest spectrum of activity; the extract significantly inhibited the bacterial growth of *S. flexneri*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* and *Y. enterocolitica* with minimal inhibitory concentrations ranging from 600 to 1200 µg/ml.

Table 1. Inhibition of the spontaneous contraction of isolated rat ileum induced by the methanol extracts of the plants

Extract	Emax	IC ₅₀ (µg/ml)	γ	Potency
<i>D. lanosa</i>	86.98 ± 4.7 (81.84–95.12)	9.65 ± 1.16 (7.33–11.97)	1.89 ± 0.46	1
<i>C. filaginoides</i>	109.55 ± 6.75 (95–123)	43.87 ± 15 (13.87–73.87)	0.53 ± 0.06	0.22
<i>C. fragilis</i>	94.75 ± 7.68 (79.6–110.1)	146.53 ± 24.83 (96.8–196.1)	0.57 ± 0.10	0.06
<i>G. glutinosum</i>	93.29 ± 3.76 (85.77–100.8)	29.57 ± 6.29 (23.3–42.15)	0.91 ± 0.17	0.32
<i>D. viscosa</i>	90.58 ± 8.91 (72.8–108.4)	11.91 ± 3.18 (5.55–18.27)	1.27 ± 0.55	0.81
<i>P. tomentosum</i>	95.81 ± 4.04 (87.73–103.9)	145 ± 22.93 (99.14–190.9)	1.34 ± 0.30	0.06
<i>P. thurberi</i>	103.4 ± 5.29 (92.82–113.9)	30.58 ± 14.98 (0.62–60.54)	0.38 ± 0.05	0.31
<i>P. atrorubens</i>	88.65 ± 3.58 (81.49–95.81)	57.80 ± 14.92 (27.9–87.64)	0.59 ± 0.08	0.16
<i>Z. venosa</i>	102.75 ± 5.34 (92.07–113.4)	41.32 ± 17.95 (5.42–77.22)	0.39 ± 0.05	0.23

Values are means ± S. E.; n = 6 (95% confidence intervals)

Potency was obtained by the formula: EC₅₀ *Datura lanosa*/EC₅₀ plant extract, assuming a value of 1.00 for *Datura lanosa*.

Conclusions

The antispasmodic activity demonstrated by the methanol extracts of the species evaluated in the present study, could provide the pharmacological basis for the traditional uses of these plants as spasmolytic agents in Mexican traditional medicine. Furthermore, the moderate antibacterial activity exerted by the extracts against some pathogenic enterobacteria may be of additional benefit in the case of stomach-aches associated with infective diarrhoea.

Acknowledgements

The technical assistance of Héctor Peláez, Manuel Espinosa and Patricia Méndez, (University of Querétaro) is acknowledged. Thanks are also due to Q.F.B. Sergio Pacheco (University of Querétaro), who isolated the enterobacteria employed in the present investigation. The authors thank Ing. Adriana Rojas for programming the software employed in the capture and processing of the pharmacological data obtained from the isolated rat ileum test. Field assistance was provided by J. Aguilar, F. Basurto, E. Herrera, D. Martínez, N. Meraz, L. Nava and T. P. Ramamoorthy; M. Trejo assisted in the lab preparation of the plant specimens. Field work was partially funded by the Jardín Botánico, Instituto de Biología (UNAM), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and U.S. Agency for International Development. Collaboration from the Tarahumara Indians and the Centro de Estudios Agrícolas de la Tarahumara, A. C., is gratefully acknowledged. Partial financial support through project PADEP 5329 (Coordinación de Proyectos de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado, U.N.A.M.) and project DGAPA IN203494 (Dirección General de Asuntos Académicos del Posgrado, U.N.A.M.) is also acknowledged.

Table 2. Antimicrobial activity of the methanol and the chloroform extracts of the plants against tested microorganisms.

Microorganism	Extract	MIC (µg/ml)
<i>Shigella flexneri</i>	<i>D. lanosa</i> (methanol)	625
	<i>P. thurberi</i> (chloroform)	1250
	<i>P. thurbei</i> (methanol)	821
	Sulphamethoxazole *	2.76
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>C. filaginoides</i> (chloroform)	293
	<i>C. fragilis</i> (chloroform)	879
	<i>D. lanosa</i> (methanol)	858
	<i>G. glutinosum</i> (methanol)	360
	<i>P. atrorubens</i> (methanol)	1900
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Z. venosa</i> (methanol)	378
	Ampicillin *	2.71
	<i>D. lanosa</i> (methanol)	950
	<i>P. thurberi</i> (methanol)	1083
	<i>P. atrorubens</i> (methanol)	833
	Tetracycline *	2.16
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>D. lanosa</i> (methanol)	875
	Tetracycline	2.16
	<i>C. filaginoides</i> (chloroform)	1785
	<i>C. fragilis</i> (chloroform)	1964
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>D. lanosa</i> (methanol)	1961
	Gentamicin *	2.43

* Positive control

References

- Bye, R., Mata, R., Pimentel, J.: Botany, ethnobotany and chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in Mexico. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autónoma. México, Ser. Bot.* 61: 21-42, 1991.
- Capasso, A., Pinto, A., Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F.: Reduction of Agonist-induced contractions of guinea-pig isolated ileum by flavonoids. *Phytother. Res.* 5:85-87, 1991.
- Dominguez, X. A.: Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochem.* 13: 1626-1628, 1974.
- Dominguez, X. A.: Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochem.* 11: 1855-1856, 1972.
- Fanning, M. J., Macander, P., Drzewiecki, G., Middleton, E.: Quercetin inhibits anaphylactic contraction of guinea-pig ileum smooth muscle. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71: 371-373, 1983.
- Havsteen, B.: Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32: 1141-1148, 1983.
- Hsu, Y., Chen, Y. P., Kakisawa, H.: Structure of hauriwaic acid. *Phytochem.* 10: 2813-2814, 1971.
- Hufford, C. D., Funderburk, M. J., Robertson, L. W.: Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *J. of Pharm. Sci.* 64: 789-792, 1975.
- Kumamoto, J., Scora, W., Clerx, W.: Terpenes of leaves of *Parthenium tomentosum*. *J. Agric Food, Chem.* 33: 650-652, 1985.
- Macander, P. J.: In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity relationships. V. Cody, E. Middleton, Jr., and J. B. Harborne eds. pp. 411-424. Alan R. Liss., New York, 1986.
- Maldonado, E., Mendoza, G., Cárdenas, J., Ortega, A.: Sesquiterpene lactones from *Parthenium tomentosum*. *Phytochem.* 24: 2981-2985, 1985.
- Mata, R., Contreras, J. L., Crisanto, D., Pereda-Miranda, R., Castañeda, P., del Río, F.: Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. XVIII. New secondary metabolites from *Dodonaea viscosa*. *J. Nat. Prod.* 54: 913-917, 1991.
- Mikayaw, M., Ohno, N., Yoshioka, H., Mabry, T., Whiffin, T.: Gymnospermin. New labdantriol from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochem.* 13: 189-190, 1974.
- Ríos, J. L., Rocio, M. C., Villar, A.: Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23: 127-149, 1988.
- Rodríguez, E., Carman, N., Chávez, P.: Quercetagenin 3,3'-dimethyl ether, a new flavonoid from *Parthenium tomentosum*. *Phytochem.* 11: 1507-1508, 1972.
- Sachdev, L., Kulkshrestha, D. K.: Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* 25: 1253-1256, 1983.
- Sastry, K. N. S., Nayudamma, Y.: Leucocyanidin from *Dodonaea viscosa* bark. *Leather Sciences* 13: 174-176, 1966.
- Schwinghammer, T. L., Kroboth, P. D.: Basic concepts in pharmacodynamic modeling. *J. Clin. Pharmacol.* 28: 388-394, 1988.
- Wagner, H., Ludwig, C., Grotjahn, L., Khan, M. S. Y.: Biologically active saponins from *Dodonaea viscosa*. *Phytochem.* 26: 697-701, 1987.

Address

A. Rojas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510 México D. F., México



Planta Medica

Natural Products and Medicinal Plant Research

Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Prof. Dr. Adolf Nahrstedt
Institut für Pharmazeutische
Biologie und Phytochemie
der Universität Münster
Hittorfstraße 56
D-48149 Münster

Registration Number: 24/07 95

Oct 02, 1995

Dear Dr. Rojas:

Thank you for submitting the above quoted manuscript to PLANTA MEDICA. It has been received attention. The ms. is acceptable after minor corrections and improvements.

In addition, the isolation procedure needs more information as marked in the Instructions for Authors (encl.). The intern. used abbreviations of journals should be given.

Please return the enclosed pages with the hand-written remarks together with the improved set of manuscripts.

Yours sincerely

(A. Nahrstedt)

IMPORTANT: please, follow the Instructions for Revision of Manuscripts on the REVERSE.