



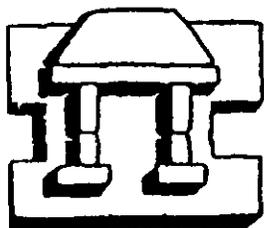
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

Actividad anticoagulante de la 4'-Hidroxide-  
hidrokavaina aislada de *Brongniartia*  
*intermedia* (Leguminosae), de la 4'-O-acetil-  
dehidrokavaina y de los extractos de *B.*  
*intermedia* y *Piper methysticum* (Piperaceae)

297374

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
JUAN MANUEL FABILA VELAZQUEZ



IZTACALA

Director: Dr. Ricardo Reyes Chilpa  
Coodirector: Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero

Los Reyes Iztacala, Estado de México

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mi mamá la Señora:  
**Maura Velázquez Villanueva** por todo cuanto me has dado.

A mis Hermanos:

**Virginia y Jaime Cervantes Velázquez, Francisco Fabila y Ricardo Favila Velázquez.**

A mis sobrinos:

**Dolores, Armando, Noel y Josel Resendiz Cervantes; Mariana Cervantes Castillo y Rebeca Fabila Vázquez.**

A quienes dirigieron esta tesis:

**Dr. Ricardo Reyes Chiupa**

**Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero**

**M. en C. Aurora De la Peña**

**Dr. Manuel Jiménez Estrada**

A los sinodales por sus sugerencias

**M. en C. Guillermo Ávila**

**Biol. Josefina Vázquez**

**M. en C. Tzasna Hernández**

**M. en C. Ma. del Rocío Vargas**

A mis Amigos: Ana Tovar, Verónica Vega, Lizbeth Basave, Rolando Tirado, Alex Arias y Roberto.

A mis compañeros del 6:

**Lizbeth Basave** (Nanys), **Nancy Cruz**, **Manuel García** (Tepojaco Show), **Jesús Ramírez** (Gallo # 1), **Rosario Castro**, **Soledad Hernández** (Chole), **Yanira Jiménez**, **Ma. de Jesús Melchor**, **Marcelino Jiménez** (Cateto), **Paul De la Cruz Manjarrez**, **Gabino Correa** (Inutil), **Nancy Montiel**, **Alejandro** (Mil Chistes) **José** (Yusepe), **Blanca Ramírez**, **Alberto Rodríguez de la Concha** (Don Beto), **Hector Benites** (Tetos), **Edgar**, **Eduardo** y **Elvira** (Eduguigis), **Jonathan**.

A: **Magdalena Chálico** †, **Magdalena** (Macarena), **Luis Opengo** (Zopenco), **Laura Santillan**, **Roberto Rojas** (Chibebo), **Verónica Coria**, **Mínerva Farfán**, **Laura Guzmán** (Rana # 1), **Olga Váldez** (Rana # 2), **Alejandro Tinoco** (Jahaciel # 2), **Miriam Quiroz**, **Lucero Paniagua**, **Yareli Barcenas**, **Carolina Palacios**, **Gerardo Quiroz**, **Patricia Chaires**, **Pilar Silva** y **Guadalupe**.

A mis compañeros del 1:

**Lizbeth Basave**, **Nancy Cruz**, **Alejandro** (Gallo # 2), **José** (Gallo # 3), **Jesús Ramírez** (Gallo # 1), **Ana Tovar**, **Veronica Vega** (Cuartito), **Jahaciel Espinosa**, **Luz Hernández** (Jefa), **Arturo Alba**, **Eloy Marquez** (Cheloy), **Isabel Mayen**, **Liliana Urban**, **Nora Vega** (Sora Noraya), **Alejandro Silva** (Perro), **Gabriela Dávila** (Colora), **Juan Gómez**, **Antalia González**, **Antonio Herrera**, **Rolando Tirado** (Puerquito), **Leobardo Sánchez** (Pollo Colunga), **Omar Ramos**, **Tanya Garfias** (¿una pregunta?), **Oralia Castillo**, **Angélica**

## AGRADECIMIENTOS

Moreno (Lyoba), David Gudiño (Zorro), Israel Añorve (Guera), Yairi, Xochitl, Evangelina Castillo y Luz María.

A los del Anexo y Laboratorio 2-10:

**Lizbeth Basave, Maira Huerta, Carlos Torres, Valentina Carrasco, Gabriela Sánchez, Pilar Mendoza,, Elizabeth Estrada, Rafael Flores, Dagoberto Alavez, Juana Cortes, Alicia Rangel y Miguel Benitez.**

A: Erik Olafson, Hassan Lakhdar, Magdalena Goranova, Elmer Aquino y Jeffrey Pestka.

A TODOS GRACIAS

## ÍNDICE

	Pag
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
·Hemostasis Primaria.	4
·Hemostasis Secundaria.	6
·Fármacos Anticoagulantes.	9
·Heparina	9
·Warfarina	10
·Fármacos Antiplaquetarios.	12
·Ácido acetilsalicílico.	12
·Ticlopidina.	12
·Dipiridamol.	13
· <i>Brongruaria intermedia</i> (Leguminosae).	14
·Descripción botánica.	14
·Etnobotánica.	15
·Química.	15
· <i>Piper methysticum</i> (Piperaceae).	16
·Etnobotánica.	16
·Química.	17
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
V HIPÓTESIS	20
VI OBJETIVOS	21
·General.	21
·Particulares.	21
VII MATERIAL Y METODOS	22
·Estudio Químico:	22
·Recolección de <i>Brongruaria intermedia</i> .	22
·Extracto metanólico. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de <i>B. intermedia</i> .	22
·Acetilación de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina.	24
·Obtención del extracto de <i>Piper methysticum</i> .	25

	·Estudio Farmacológico:	26
	·Determinación del tiempo de coagulación en sangre derivada.	26
	·Determinación del porcentaje de agregación plaquetaria	27
	·Análisis estadístico.	29
VIII	RESULTADOS	30
	·Metabolitos secundarios aislados de <i>B. intermedia</i> :	30
	· $\beta$ -Sitosterol.	30
	·(-)-Maackian.	31
	·4'-Hidroxi-dehidrokavaina.	32
	·4'-O-acetil-dehidrokavaina.	33
	·Neorautanano.	34
	·3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo.	35
	·Efecto de dosis crecientes de diferentes tratamientos sobre el tiempo de coagulación	38
	·Efecto de diferentes tratamientos sobre el tiempo de coagulación registrado a los 15 minutos, 24 y 48 horas.	41
	·Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y la 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la agregación plaquetaria.	50
	·Inducida con ADP.	50
	·Inducida con Epinefrina.	51
	·Inducida con Colágena.	52
IX	DISCUSIÓN	55
X	CONCLUSIONES	58
XI	REFERENCIAS	59
XII	ANEXO	63

## RESUMEN

El género *Brongniartia* (Leguminosae) consta de 65 especies que se distribuyen en México. Varias de ellas se han empleado en la medicina tradicional en el tratamiento de mordeduras de serpientes, para combatir insectos, ácaros, parásitos de la piel y como venenos para pescar.

*Brongniartia intermedia* es un arbusto endémico de México. Del extracto metanólico de las raíces, se aislaron cinco compuestos, entre ellos la estirilpirona 4'-Hidroxi-dehidrokavaina (HK), la cual esta estructuralmente relacionada con la estirilpirona (+)-Kavaina presente en *Piper methysticum* (Piperaceae), de la cual se reporta actividad antitrombotica (Gleitz, 1997). En el presente trabajo se estudió la actividad anticoagulante en sangre total de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina, de su derivado 4'-O-acetil-dehidrokavaina (AK), de los extractos metanólico de las raíces de *B. intermedia* y de *P. methysticum* (CO<sub>2</sub> supercrítico). También se evaluó la actividad antiagregante plaquetaria (inducida con epinefrina, ADP y colágena) de la HK y de su derivado AK. Tanto la AK, como el extracto de *P. methysticum* (100 mg/kg), presentaron actividad anticoagulante significativa 15 minutos después de administrar el tratamiento; a la misma dosis HK exhibió el mismo efecto después de 24 horas. La HK y la AK (100 µM) tuvieron un efecto antiagregante plaquetario significativo con una (P<0.05).

Estos resultados sugieren que tanto la HK como la AK producen efectos en la hemostasis primaria, de forma similar al extracto de *P. methysticum*, y que la acción antitrombotica puede estar relacionada con la inhibición de ciclooxigenasa.

## INTRODUCCIÓN

El proceso de la coagulación sanguínea es un fenómeno dinámico y complejo. La fluidez, y en ciertas situaciones la coagulación, se mantienen por la participación de numerosos factores que son activados o inactivados en respuesta a diversos estímulos. En la práctica médica, la manipulación farmacológica de este proceso, ha contribuido en la prevención y tratamiento de enfermedades vasculares (Aronow, 1999) y tromboembólicas (Homma *et al*, 1999). La warfarina, heparina, ácido acetilsalicílico y estreptocinasa son los fármacos de origen natural que por su actividad anticoagulante, antitrombótica o fibrinolítica, respectivamente, representan hasta el momento, los medicamentos más empleados para los trastornos de coagulación sanguínea. Sin embargo, cuando se establece el índice terapéutico, siendo el efecto benéfico la actividad anticoagulante y el efecto adverso la hemorragia, estas sustancias tienen un estrecho margen de seguridad. Aunado a lo anterior, el inadecuado manejo clínico ha incrementado la incidencia de efectos tóxicos (Bhat *et al*, 2000) y desafortunadamente ha cuestionado el uso de estos medicamentos en enfermedades donde la eficacia ha sido plenamente demostrada. La necesidad de contar en la clínica con fármacos seguros, motiva a la búsqueda de principios activos con mejores propiedades ya sean farmacocinéticas y/o farmacodinámicas. En este sentido, la investigación básica y aplicada tiene en la naturaleza, particularmente en las plantas superiores, una importante fuente de sustancias potencialmente más efectivas.

Esta tesis es un estudio preclínico en el que se evalúa la actividad de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina (HK) y de su derivado 4'-O-acetil-dehidrokavaina (AK), sobre el tiempo de coagulación sanguínea del ratón y la tasa de agregación de plaquetas humanas. En ella

se describen los efectos producidos con diferentes dosis de HK o de AK, y se establecen las comparaciones pertinentes con fármacos de reconocido efecto anticoagulante (heparina y warfarina). Debido a la similitud estructural de la HK aislada de *Brownia intermedia* (Leguminosae), con la (+)-Kavaina aislada de *Piper methysticum* (Piperaceae), en la presente investigación se estudió la actividad anticoagulante a diferentes dosis del extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* y del extracto de *P. methysticum* obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. Además, se analizó la actividad anticoagulante de HK, AK y de los extractos antes mencionados a los 15 minutos, 24 y 48 horas posteriores a su administración.

El estudio de la actividad antiagregante plaquetaria con diferentes concentraciones de HK y AK se evaluó utilizando Epinefrina, ADP y Colágena como agentes inductores de la agregación plaquetaria. Se considera que el presente trabajo aporta evidencias científicas para continuar la investigación sistemática de las estilipironas como posibles medicamentos antitrombóticos.

## ANTECEDENTES

### HEMOSTASIS PRIMARIA

La hemostasis es la detención espontánea del sangrado proveniente de un vaso sanguíneo dañado. Este proceso se inicia con una lesión vascular e inmediatamente ocurre una constricción para disminuir el flujo distal de la sangre a la herida. Simultáneamente, las plaquetas se unen a la colágena de la pared vascular lesionada y son activadas por la protombina, sustancia formada por la cascada de coagulación o por ADP liberado de otras plaquetas activadas. El cambio de la morfología plaquetaria, y la presencia de fibrinógeno, desencadenan la agregación y formación del tapón plaquetario. A este fenómeno hemostático que aparece tempranamente, se le llama hemostasis primaria y depende exclusivamente de la capacidad funcional de las plaquetas (Orten, 1990).

Las plaquetas son estimuladas por diversas sustancias endógenas (trombina, colágena, ADP, adrenalina, serotonina, vasopresina) y exógenas (cationes divalentes, ésteres del forbol) y responden con cambios de forma, agregación de tres diferentes procesos secretorios y liberación de ácido araquidónico el cual es rápidamente convertido a prostaglandinas, tromboxanos y lipoxigenasa. La superficie plaquetaria contiene un gran número de receptores los cuales ligan específicamente agonistas que estimulan la respuesta plaquetaria fisiológica ejemplos ADP, adrenalina, colagena, trombina, vasopresina, serotonina, factor activador plaquetario. Otros receptores median la activación (PGE, PGD2 OGI) o inhibición (ADP y adrenalina de adenilato ciclasa) en plaquetas (Houssay, 1999). El incremento del AMPc causa fuerte inhibición de la activación plaquetaria y producción de eicosanoides (ver figura 1).

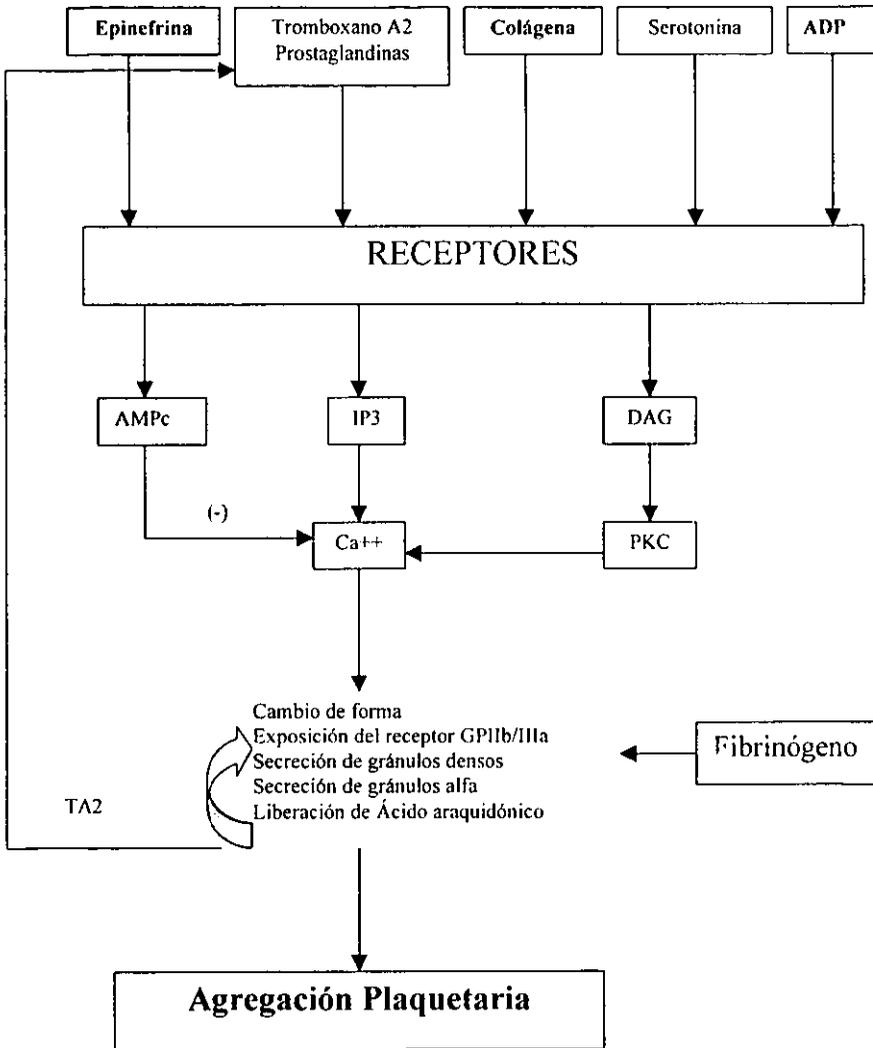


Figura 1. Representación esquemática de la agregación plaquetaria producida por varios agonistas.

## HEMOSTASIS SECUNDARIA

En esta etapa ocurre la formación de una malla de fibrina o coágulo que atrapa al tapón de plaquetas (trombo blanco) y/o al tapón de eritrocitos (trombo rojo) dándole una mayor estabilidad al coágulo. Este proceso también incluye la disolución parcial o completa del coágulo ya formado (Murray *et al*, 1994).

La formación de fibrina se origina de reacciones proteolíticas en cascada, en respuesta a una pared vascular anormal (vía intrínseca) y/o en respuesta a una lesión tisular (vía extrínseca). En la vía intrínseca participan los factores (XII, XI, IX, VIII, precalicreína y cininógeno de alto peso molecular) y en la vía extrínseca el factor VII. Ambas vías coinciden, en la activación del factor X (Stuart-Prower) que cataliza la conversión de protombina a trombina en presencia del ion  $Ca^{++}$ , del factor lábil (proacelerina) y de fosfolípidos, la cual induce la conversión del fibrinógeno a monomero de fibrina, que polimeriza en presencia del factor XII activado (estabilizador de la fibrina) para formar el coágulo (Voet *et al*, 1992). En la Tabla I se da la Nomenclatura Internacional de los Factores de la Coagulación Sanguínea, y la figura 2 resume las vías de coagulación (Stryer, 1993).

Tabla I. Nomenclatura Internacional de los Factores de la Coagulación Sanguínea.

Factor	Nombre	Sinónimo
I	Fibrinógeno	
II	Protombina	
III	Tromboplastina	Tromboquinasa
IV	Calcio	
V	Proacelerina	Factor lábil, globulina aceleradora (Ac-G)
VI	Igual que el factor V (este término se utiliza generalmente)	
VII	Proconvertina	Factor estable, acelerador de la conversión de la protombina del suero (SPCA)
VIII	Globulina antihemofílica (AHG)	Factor antihemolítico A
IX	Componente de la tromboplastina del plasma (PTC)	Factor Christmas, factor antihemolítico B
X	Factor Stuart-Prower	Autoprotombina C
XI	Antecedente de la tromboplastina del plasma (PTA)	Factor antihemofílico C
XII	Factor Hageman	Factor contacto, factor cristal (glass factor)
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	Fibrinasa, factor Laki-Lorand
Precalicroína	Factor de Fletcher	
Cinonógeno de alto peso molecular	Factor de Fitzgerald-Williams-Flaujeac	

## ACTIVACIÓN INTRÍNSECA

## ACTIVACIÓN EXTRÍNSECA

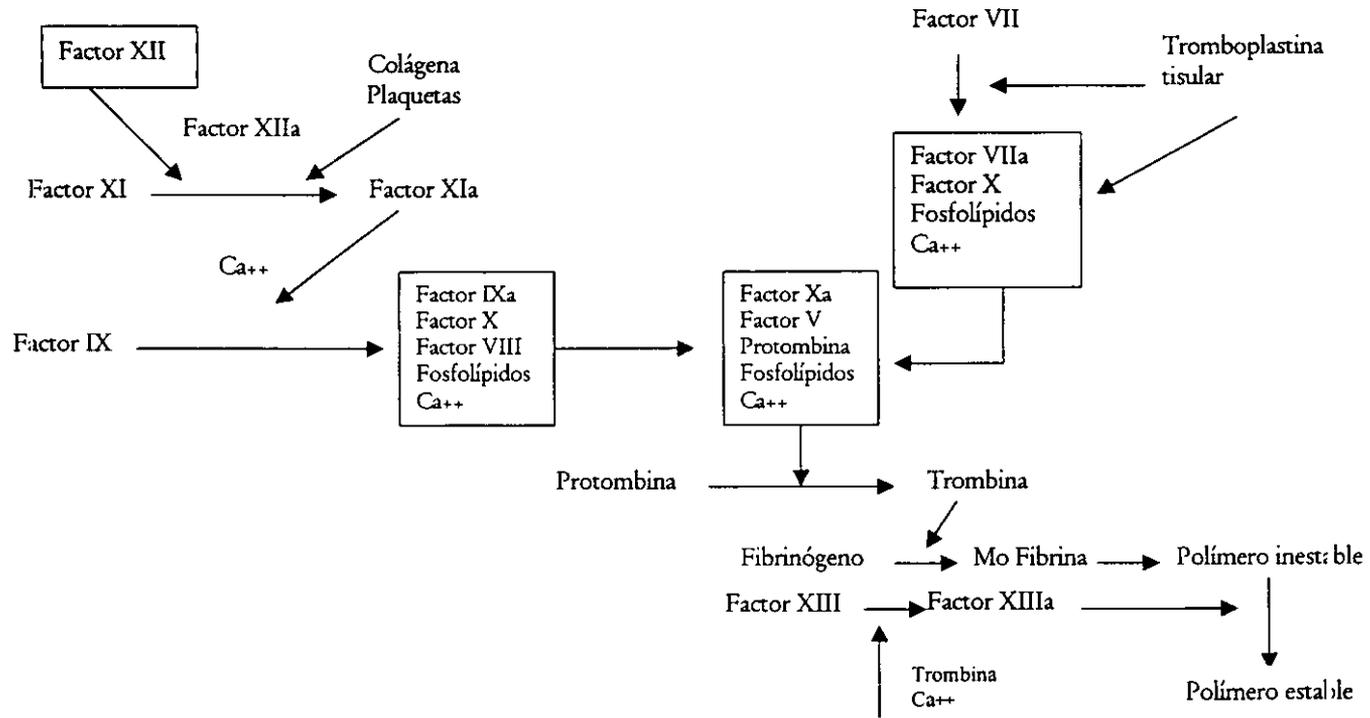


Figura 2. Diagrama de la cascada de la Coagulación Sanguínea. Hemostasis secundaria (Orten, 1990).

## FARMACOS ANTICOAGULANTES

### Heparina

La heparina es un glicosaminoglicano constituido por cadenas de restos alternantes de D-glucosamina y un ácido urónico. La heparina estándar es una preparación heterogénea con pesos moleculares que oscilan desde 5,000 a 30,000 kD, siendo las especies con pesos moleculares más bajos las más activas contra el factor Xa que contra la trombina (Newsholme *et al.*, 1990).

La heparina ejerce principalmente su efecto anticoagulante por medio de la unión ATIII, alterando considerablemente por ello la conformación de la ATIII y acelerando su inhibición por la trombina, el factor Xa y el IXa. La ATIII es una  $\alpha$ -globulina que inhibe las serinas proteasas, que incluyen varios factores de la coagulación, mediante la unión en proporción 1:1 al resto de serina situado en el centro de reacción de los factores coagulantes, lo que lleva a la inactivación de esos factores. La heparina participa en esas reacciones como agente catalítico, catalizando la inactivación de la trombina por la ATIII, actuando como molde al cual se unen la ATIII y la trombina para formar un complejo ternario (Page *et al.*, 2001).

La heparina se absorbe poco tras la administración oral, y por ello es administrada por vía subcutánea o por vía intravenosa, en este caso se administra en forma de dosis única de carga para lograr una anticoagulación rápida y mantenerse después con una infusión continua. La heparina se fija a varias proteínas plasmáticas, como el factor 4 de las plaquetas, la fibronectina y el factor de Von-Willebrand. Esta propiedad contribuye a su reducida biodisponibilidad a concentraciones bajas.

consecuencia de la desaparición de los factores de la coagulación  $\gamma$ -carboxilados (Page *et al*, 2001 y Stryer, 1995).

Se absorbe por vía oral y tiene una biodisponibilidad excelente. Se une a las proteínas plasmáticas y se acumula en el hígado.

La warfarina es eficaz para:

- La profilaxis y el tratamiento del tromboembolismo venoso.
- La profilaxis de ictus trombóticos o embólicos y de la recurrencia de infarto en pacientes con infarto agudo de miocardio.

## FARMACOS ANTIPLAQUETARIOS

Hay muchos activadores fisiológicos de las plaquetas, entre ellos trombina, adenosin difosfato (ADP), epinefrina, colágena, ácido araquidónico y tromboxano A<sub>2</sub>, los cuales promueven la agregación plaquetaria. Hay también inhibidores fisiológicos de las plaquetas como la prostaciclina y el óxido nítrico ([www.lafacu.com](http://www.lafacu.com)).

### Ácido acetilsalicílico

Este bloquea la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> procedente del ácido araquidónico en las plaquetas mediante la inhibición por acetilación irreversible de la ciclooxigenasa, una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas. El ácido acetilsalicílico bloquea también la síntesis del inhibidor de plaquetas prostaciclina en células endoteliales. Sin embargo este efecto es efímero comparado con el que ejerce sobre la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> en las plaquetas, porque las células endoteliales pueden resintetizar la ciclooxigenasa (Newsholme *et al*, 1990).

El ácido acetilsalicílico se absorbe con rapidez desde el tracto gastrointestinal, es hidrolizado en parte a salicilato en su primer paso a través del hígado y se distribuye intensamente en la mayoría de los tejidos corporales.

### Ticlopidina

Interfiere con la unión del fibrinógeno, inducido por el ADP, a los receptores de la membrana plaquetaria. La adhesión y la agregación plaquetarias son por tanto inhibidas, y los efectos inhibitorios sobre la agregación plaquetaria son irreversibles.

La ticlopidina se absorbe bien y con rapidez a través del tracto gastrointestinal, esta se metaboliza en gran proporción y se excreta principalmente por el riñón

### **Dipiridamol**

Por sí solo no llega a inhibir la agregación plaquetaria, pero cuando se emplea unido al tratamiento con warfarina, se ha descrito que prolonga la supervivencia de las plaquetas en pacientes con enfermedad cardíaca valvular y que mantiene los recuentos de plaquetas en los pacientes sometidos a cirugía abierta (Page *et al*, 2001).

***BRONGNIARTIA INTERMEDIA* (LEGUMINOSAE)****Descripción botánica**

El género *Brongniartia* pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoidae, tribu Brongniartiae; este género comprende aproximadamente 65 especies, casi en su mayoría endémicas de México, ya que sólo una especie se extiende hasta Texas (Sousa *et al*, 1993 citado por Reyes, 1994).

Esta especie se localiza en regiones de clima cálido-seco. En el Valle de México se encuentra entre 2300 y 2600 m de altitud, en sitios con pastizal y matorral, de Tepeapulco a Villa Nicolas Romero, Chalco, Cuajimalpa, Texcoco y Xochimilco. Fuera del Valle se extiende de San Luis Potosí a Jalisco y Oaxaca (Rzedowski *et al*, 1979).

*Brongniartia intermedia* Moric. Es una planta arbustiva de 50 cm. a 2,5 m. de altura; con tallo pubescente; estípulas ovalado-lanceoladas, pubescentes; hojas cortamente pecioladas, de 10 a 20 cm. de largo, de 11 a 37 folíolos opuestos, oblongos u ovals, de 12 a 25 mm. de largo por 6 a 10 mm. de ancho, ápice redondeado y mucronado, base redondeada, densamente sedoso-pubescentes cuando jóvenes, volviéndose glabros con la edad; flores de 1,5 a 2 cm. de largo; bracteolas foliáceas, pubescentes, tempranamente deciduas; cáliz pubescente; corola roja o morada; legumbre anchamente oblonga, de 4,5 a 7,5 cm. de largo por 2 cm. de ancho, las valvas coriáceas, lisas y glabras, de ápice mucronado; semillas globosas, de 8 a 10 mm. de diámetro, café-rojizas y lisas (Rzedowski *op cit*).

### Etnobotánica

Se indica que algunas especies de este género reciben 3 usos principales (Reyes, 1994; Reyes *et al.*, 1994)

- Como remedio para las parasitosis dérmicas causadas por insectos y ácaros.
- Como veneno para pescar (barbasco) y
- En el tratamiento de las mordeduras de serpientes. Es conocida en Sinaloa como “hierba de la víbora” (Martínez, 1987).

### Química

Corona en 1993 del extracto hexánico de las hojas de *B. intermedia* aisló  $\beta$ -Sitosterol, Estigmasterol, Taraxasterol, Lupeol y pinitol, mientras que de las raíces obtuvo: Neorautanano, Edunol, 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo, 3-Prenil-4-O,5-(2',2'-dimetil-pirano)-cinamato de metilo, Brongniol y Brongtimedol.

Años más tarde Salinas en 1998 aisló de las raíces de *B. intermedia* los siguientes compuestos: 4'-Hidroxi-dehidrokavaina, 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo, Estigmasterol y  $\beta$ -Sitosterol. El primero de ellos se aisló con anteriormente de las raíces de *B. podalyrioides* (Reyes, 1994)

### ***PIPER METHYSTICUM* (PIPERACEAE)**

*Piper methysticum* también conocido como “Kava kava”, pertenece a la familia Piperaceae, y al orden Piperales. Dicha familia incluye 5 géneros y más de 2000 especies de plantas que crecen a lo largo de los trópicos, 10 de estos miembros se han utilizado como especias o como plantas medicinales (Sing, 1992).

Kava es una planta perenne nativa de las islas tropicales del Pacífico (Melanesia, Micronesia y Polinesia), esta planta crece a altitudes que van de los 150 a los 3000 m.s.n.m. La propagación de *P. methysticum* es exclusivamente vegetativa. La primera descripción detallada del kava, normalmente se le acredita a Johann Georg Forster, botánico en el segundo viaje del Capitán James Cook's (1772-1775).

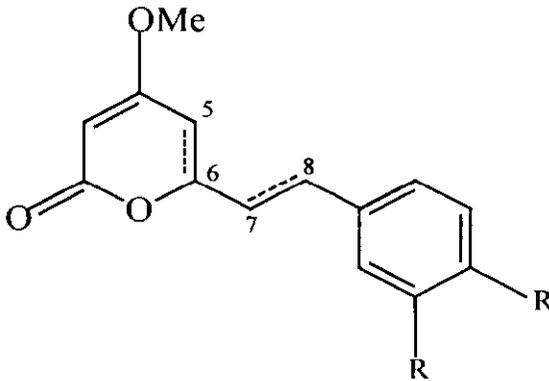
### **Etnobotánica**

Existen variedades diferentes de la planta del kava, clasificadas por las poblaciones indígenas, basadas principalmente en las características morfológicas. Se usan variedades distintas con propósitos distintos dentro de la cultura. Por ejemplo, una variedad rara se usa exclusivamente para propósitos ceremoniales, considerando que una variedad común tendría los usos más informales (Duffield *et al*, 1989).

El principal uso del kava es ceremonial, aunque también juega un papel medicinal importante en muchas culturas indígenas. Algunas de las afecciones tratadas con el kava incluyen gonorrea, problemas menstruales, problemas de lactación, dolor de cabeza, debilidad general, reuma, tuberculosis, lepra, insomnio, asma, ciertas condiciones de la piel y migraña.

**Química**

La concentración de estilipironas es generalmente más alta en las raíces y disminuye progresivamente hacia la parte aérea de la planta. Aunque el cuerpo principal de las investigaciones ha sido la resina. De esta se han aislado 15 lactonas de las cuales 9 se han identificado totalmente. De las cuales 6 se encuentran en concentración más alta en la raíz: metisticina, yangonina, dihidrometisticina, kavaina, dihidrokavaina y desmetoxy-yangonina (Smith, 1983 y Smith *et al*, 1984).



Kavapironas	R	R'	C5 — C6	C7 — C8
Dihidrokavaina	H	H	—	—
Kavaina	H	H	—	—
Desmetoxilyangonina	H	H	—	—
Tetrahydroyangonina	OMe	H	—	—
Yangonina	OMe	H	—	—
Dihidrometisticina	OCH <sub>2</sub> O		—	—
Metisticina	OCH <sub>2</sub> O		—	—

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La warfarina utilizada actualmente en seres humanos como medicamento anticoagulante, es un derivado de las cumarinas, sustancias comúnmente encontradas en la naturaleza (Turpie, 1993). A este grupo de sustancias pertenece la bishidroxycumarina, cuya presencia en el trébol dulce ocasionó por los años 20's en Dakota y Canadá, la muerte de ganado bovino debido a una enfermedad hemorrágica por deficiencia de protombina plasmática (Rang *et al*, 1999). Varios compuestos presentes en la naturaleza, poseen similitudes estructurales con las cumarinas, y algunos comparten evidencias experimentales que apoyan acciones sobre la hemostasis. Este es el caso de 4-metoxi- $\alpha$ -pirona, (+)-5,6-dehidrokavaina y (+)-dihidro-5,6-dehidrokavaina aisladas de *Alpinia speciosa* (Zingiberaceae) procedente de China y de la (+)-Kavain aislada de *Piper methysticum* (Piperaceae) procedente de Melanesia, Micronesia y Polinesia, islas tropicales del Pacífico. Estas estirilpironas, también llamadas Kavalactonas, muestran inhibición de la agregación plaquetaria inducida por ácido araquidónico (Teng *et al*, 1990 y Gleitz *et al*, 1997).

Por otra parte, de una especie nativa de México reconocida como *Bronquiaria intermedia* (Leguminosae), se identificó la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina (HK). Debido a la analogía estructural de esta sustancia, con las estirilpironas antes mencionadas, fue estudiado el efecto de la HK sobre el tiempo de coagulación de la sangre total (Salinas, 1998). Sin embargo, a pesar de haberse encontrado actividad anticoagulante, no se estableció la intensidad del efecto, como tampoco se estudió la actividad antitrombótica referida para algunas estirilpironas. Por tal motivo, la presente investigación busca establecer la eficacia anticoagulante de la HK y el efecto sobre la agregación plaquetaria

inducida por diferentes sustancias. Aun más, también trata de establecer si el derivado 4'-*O*-acetil-dehidroavaina (AA), así como el extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* y de un extracto de *P. mabuyicum* obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, comparten el efecto anticoagulante. Si bien es cierto que la presente investigación es un estudio aún incipiente, también es cierto que identificar sustancias nuevas, con ventajas sobre las ya conocidas en cuanto a eficacia, características farmacocinéticas, margen de seguridad, patrón de efectos colaterales, etc., es suficiente motivo *per se* para iniciar la búsqueda y valoración farmacológica de sustancias potencialmente útiles en el tratamiento de las enfermedades tromboembólicas.

## HIPÓTESIS

- Si la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y la 4'-O-acetil-dehidrokavaina, presentan actividad antiagregante plaquetaria, entonces es probable que retarden el tiempo de coagulación del ratón.
  
- Como la (+)-Kavaina presente en *Piper methysticum* tiene actividad antiagregante plaquetaria, entonces es probable que el análogo estructural 4'-Hidroxi-dehidrokavaina presente dicha actividad.
  
- Como la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina se encuentra en la raíz de *Bronquiaria intermedia*, entonces es probable que el extracto metanólico de esa parte de la planta, también presente actividad antiagregante plaquetaria.
  
- Si el efecto antiagregante plaquetario de la estilipirona radicara en el anillo  $\alpha$ -lactona, entonces la acetilación del grupo hidroxilo de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina no modificará la intensidad de la actividad antiagregante observada con la molécula original.

## OBJETIVOS

### GENERAL.

- Evaluar la actividad de diferentes tratamientos sobre el tiempo de coagulación de la sangre total del ratón y la agregación plaquetaria en células humanas.

### PARTICULARES

- Realizar el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios, en especial de la estilipirona presente en *Brongniartia intermedia*.
- Preparar el derivado acetilado de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina.
- Establecer si la administración parenteral de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y de su derivado 4'-O-acetil-dehidrokavaina, modifican el tiempo de coagulación *in vivo* del ratón.
- Establecer si la administración parenteral del extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* y el extracto de *P. methysticum* obtenido con CO<sub>2</sub> es estado supercrítico, modifican el tiempo de coagulación *in vivo* del ratón.
- Establecer si la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y su derivado 4'-O-acetil-dehidrokavaina, modifican el porcentaje de agregación plaquetaria inducida por: ADP, Epinefrina y Colágena.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### ESTUDIO QUÍMICO

#### **Recolección de *Brongniartia intermedia***

*Brongniartia intermedia* fue colectada en el Cerro Tetzcutzingo ubicado en Texcoco, Estado de México. Sus raíces se dejaron secar al aire libre y a la sombra, luego fueron cortadas en trozos pequeños y se colocaron en metanol por una semana a temperatura ambiente, posteriormente el extracto se concentró en un rotavapor, eliminando el disolvente.

#### **Extracto metanólico. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de *B. intermedia***

El sólido del extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* (21.82 g) fue lavado con acetato de etilo. La parte soluble en este disolvente se filtró y se concentró en un rotavapor obteniéndose 9.14 g. Este material fue sometió a cromatografía en columna (A), utilizando como fase estacionaria 200 g. de silica-gel de malla 70-230 y como fase móvil diclorometano, acetona y mezcla de estos disolventes en orden de polaridad creciente, así como acetato de etilo y metanol.

De la columna A, se obtuvieron 381 fracciones, las primeras 304 fueron de 125 ml. y las restantes de 250 ml. Las fracciones 17-24 eluidas con diclorometano se reunieron por ser similares en cromatografía de capa fina (c.c.f.) dichas fracciones ocurrió la formación espontánea de cristales, los cuales se filtraron al vacío y se lavaron con metanol, obteniendo agujas de color blanco con p.f. de 130-134° C. factor de referencia (rf) en c.c.f. fue idéntico al comparado con una muestra auténtica de  $\beta$ -Sitosterol (I).

Las fracciones 31-47 eluidas con diclorometano, también se reunieron por ser similares en c.c.f. una vez reunidas precipitó un polvo, el cual se filtró y se lavó con hexano. El sólido obtenido tuvo un p.f. de 65-70° C y de acuerdo a sus datos espectroscópicos de IR y RMN <sup>1</sup>H se identificó como (-)-**Maackian (II)**.

Las fracciones 104-117, eluidas con diclorometano-acetona 98:2 se reunieron por ser similares y en ellas se formó una nata en el fondo del vial. Esta se filtró con vacío y se obtuvo un polvo fino de color blanco amarillento, el cual se lavó con diclorometano. A este polvo no se le pudo determinar p.f. por exceder el límite del aparato (300° C), en c.c.f. bajo luz UV se observa de color azul fluorescente. Con los datos que arrojan el espectro de RMN <sup>1</sup>H no fueron suficientes para determinar de qué compuesto se trata aunque sí se sabe que es un **Coumestano**.

Otras fracciones reunidas por ser similares fueron de la 165-174 eluidas con diclorometano-acetona 98:2. En estas fracciones ya reunidas ocurrió la formación de un precipitado de color amarillo, el cual se filtró y se lavó con metanol, obteniéndose un polvo de color amarillo con p.f. de 2565-270° C. Material semejante se obtuvo de las fracciones reunidas 143-153, 175-198, 199-219 y 220-230. Y de acuerdo con los resultados espectroscópicos de UV y comparándolos con los obtenidos por (Salinas, 1998), el compuesto es la **4'-Hidroxi-dehidrokavaina (III)**.

Las fracciones 1-6 de la columna A, eluidas con diclorometano, se juntaron y pesaron (1,1215 g) para someterlas nuevamente a cromatografía en columna (B), utilizando como fase estacionaria 11 g. de sílica-gel con malla de 70-230 y como fase

móvil hexano, diclorometano, acetona, mezclas de hexano-diclorometano y diclorometano-acetona en orden de polaridad creciente.

De la columna B se obtuvieron 65 fracciones de 125 ml c/u; en la fracción 19 eluida con hexano-diclorometano 8:2, ocurrió la formación de cristales blancos, estos se filtraron con vacío y se lavaron con metanol. Los cristales tienen un p.f. de 190-195° C, y de acuerdo a los resultados de RMN <sup>1</sup>H y comparándolos con los resultados obtenidos por (Corona, 1993), se deduce que el compuesto es Neorautanano (IV).

Las fracciones 9-18 (0,2832 g.) eluidas con hexano-diclorometano 9:1, de la columna B, se sometieron a cromatografía en columna (C), utilizando como fase estacionaria 6 g de sílica-gel con malla 230-400 y como fase móvil se utilizó hexano, diclorometano y mezclas de ambos en orden de polaridad creciente.

De la columna C, se obtuvieron 40 fracciones de 7 ml. Las fracciones 24-36 eluidas con hexano se reunieron por ser similares en c.c.f. , una vez reunidas, la fracción se enturbió al agregarle metanol, luego se separó un aceite color amarillo de un líquido blanco, el aceite de acuerdo a los resultados obtenidos de RMN <sup>1</sup>H y comparándolos con los resultados obtenidos por Salinas (1998) indican que el compuesto es 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo (V).

#### **Acetilación de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina**

Se tomaron 25 mg de 4'-Hidroxi-dehidrokavaina, los cuales se hicieron reaccionar a temperatura ambiente con anhídrido acético y piridina, al cabo de 1 hora la reacción fue total y se suspendió agregando agua corriente. El exceso de piridina se eliminó lavando

con una solución de ácido sulfúrico al 10%. Una vez que cristalizó el producto, se filtro y se lavo con metanol y se esperó a que cristalizara nuevamente. Se obtuvieron agujas largas de color amarillo claro con p.f. de 155-160° C. De acuerdo a los resultados obtenidos de RMN <sup>1</sup>H indican que efectivamente el compuesto es la 4'-O-acetil-dehidrokavaina (IIIa).

### **Obtención del extracto de *Piper methysticum***

El extracto de *Piper methysticum* (Kava-kava) preparado mediante extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico se obtuvo por donación de la Compañía Armadillo Pharmaceuticals Inc. (PO Box 333, Hakalau, HI 96710 808/963-6774) (Agradezco a Michael Z. Martin, Presidente de Armadillo Pharmaceuticals Inc. la donación del material.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Fisher Johns sin corrección; los espectros de UV se determinaron en un equipo Shimadzu U.V. 160, en solución metanólica. Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, fueron determinados en los espectrofotómetros analíticos Gemini 200 VARIAN (200 MHz) y Unity plus 500 VARIAN (500 MHz), en solución de cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>) con adición de agua deuterada (D<sub>2</sub>O), los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) tomando como referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de Masas de impacto electrónico de baja resolución se realizaron en un equipo Jeol JMS-AXSOSMA.

## ESTUDIO FARMACOLÓGICO

### Determinación del Tiempo de Coagulación en sangre de ratón

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones machos adultos cepa CD-1, con pesos entre 20-30 g. Todos los animales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de alimentación, temperatura e higiene con ciclos de luz-obscuridad controlados de 12 por 12 horas. La posible actividad de cuatro tratamientos (4'-Hidroxi-dehidrokavaina, 4'-O-acetil-dehidrokavaina, extracto metanólico de la raíz de *B. intermedia* y extracto de *P. methysticum* obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico) sobre el tiempo de coagulación, se evaluó siguiendo el micrométodo del capilar (Mandoky, 1983). En la primera serie de experimentos, cuatro dosis de cada tratamiento, con progresión media logarítmica (3.1, 10, 31 y 100 mg/kg.), se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a grupos de seis ratones por dosis. El tiempo de coagulación se registro 15 min. después de la administración de los tratamientos por vía intraperitoneal. Con la dosis que produjo el efecto máximo (100 mg/kg.), se realizó una segunda serie de experimentos para determinar el tiempo de coagulación a los 15 min., 24 y 48 horas después de haber iniciado cada tratamiento. En ambas series de experimentos, se utilizaron tres grupos de ratones que recibieron de manera independiente, heparina, warfarina (controles positivos) o una solución salina con Tween 80-05 al 2 % (grupo control). El procedimiento para determinar el tiempo de coagulación fue similar en todos los tratamientos y es el siguiente:

- Se pesaron y etiquetaron los ratones.
- Se formaron grupos de 6 ratones cada uno para los diferentes tratamientos.

- Los capilares, para la toma de la muestra sanguínea, se marcaron a partir de uno de los extremos, con 3 rayas transversales, a una distancia de 2,5, 1,5 y 0,5 cm.
- Minutos después de administrados por vía i.p. de manera independiente los tratamientos, se sumergió la cola del ratón durante 25 segundos, en un vaso de precipitado con agua a temperatura de 40° C, para dilatar la vena y así poder facilitar la fluidez de la sangre.
- La cola seca del animal, se colocó sobre una placa de vidrio y con la navaja se cortó el extremo terminal de esta.
- Inmediatamente el extremo del capilar, se puso en contacto con la parte sangrante de la cola, para tomar una muestra de sangre hasta la primera marca (2.5 cm.), lo cual permitió tomar un volumen constante de 25 µl de sangre.
- Inmediatamente lleno el capilar hasta la marca ya indicada, se activó el cronómetro, y se colocó el capilar en posición horizontal sobre el prisma de madera, de este modo se inició el giro del prisma de un lado al otro, permitiendo que el capilar quedará inclinado, formando un ángulo de 60° respecto al plano horizontal. De esta manera la sangre se mantenía dentro del capilar fluyendo constantemente por gravedad, de la marca 1 a la marca 3, hasta que coagulará, deteniéndose el flujo de la sangre, en ese momento se paraba el cronómetro.

### **Determinación del porcentaje de Agregación Plaquetaria**

Muestras de sangre de 10 ml. fueron obtenidas al azar de donadores de Sangre (hombres) del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez". La sangre anticoagulada con 600

$\mu\text{l}$  citrato de sodio al 3.8% en una porción (1:9), fue centrifugada a 2500 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante tres minutos. El sobrenadante era separado de la sangre total, obteniendo así el plasma rico en plaquetas (PRP), la pastilla roja se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 20 minutos para obtener el plasma pobre en plaquetas (PPP). Este plasma fue utilizado para calibrar el agregómetro (Lumiagregometro 560-Ca Dual). El PRP, fue sometido a conteo en un aparato CELL-DYN 300 o COUTLER ST KS, cuando el número de plaquetas excedía de 400 000 por  $\mu\text{l}$ , el PRP se diluía con el PPP.

Alicuotas de 400  $\mu\text{l}$  de PRP ó de la dilución del PRP con PPP, fueron depositadas en cada cubeta puesta en el agregómetro. A cada cubeta se le depositó 5  $\mu\text{l}$  de alguno de los siguientes tratamientos: 1, 10 o 100  $\mu\text{M}$  de HK o de AK disueltos en DMSO. A los controles se les agregó 5  $\mu\text{l}$  DMS. Inmediatamente después se les agregó 10  $\mu\text{l}$  del agente inductor de la agregación plaquetaria epinefrina, colágena o ADP. Una vez puesta las cubetas en el agregometro se espera el tiempo que fuera necesario para que la gráfica se estabilice.

La warfarin, heparina, ADP, colágena, epinefrina, dimetilsulfóxido (DMSO) y citrato de sodio se obtuvieron de Sigma Chemical Com., de San Luis Missouri U.S.A. En todos los casos, el volumen inyectado por vía i.p. a los ratones fue de 0.1 ml. por cada 10 g. de peso corporal. Para la determinación del porcentaje de agregación plaquetaria, la HK y la AK se disolvieron en DMSO.

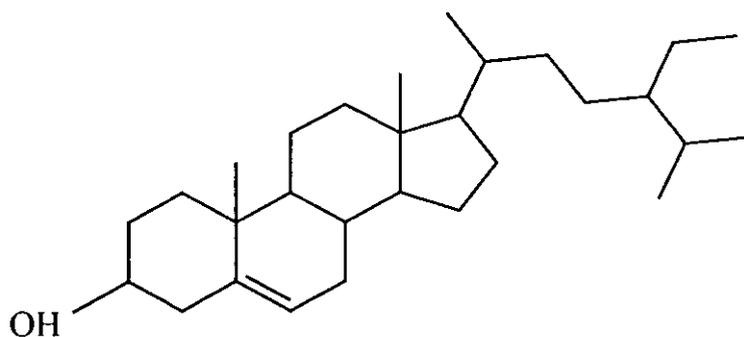
### **Análisis Estadístico**

Se compararon diferentes grupos tratados con un mismo grupo control, observando si las diferencias son o no significativas, realizando análisis de varianza de una ruta con la subsecuente aplicación de la prueba de Dunnett y Tukey para comparaciones múltiples con un control. El valor de probabilidad límite para establecer significancia estadística de las diferencias observadas es de 0.05.

## RESULTADOS

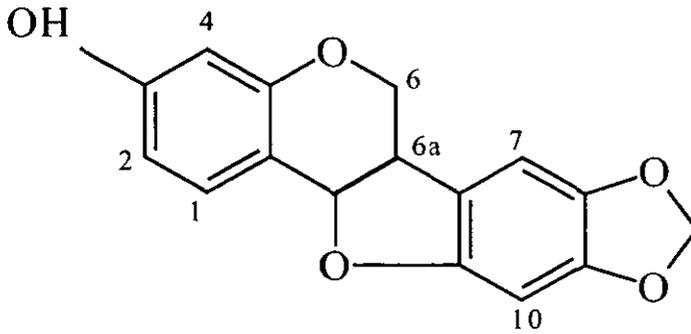
METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *BRONGNIARTIA INTERMEDIA*.

Del extracto metanólico de las raíces de *B. intermedia* se aislaron cinco compuestos químicos pertenecientes a cuatro grupos de metabolitos secundarios: una estilipirona: 4'-Hidroxidehidrokavaina; dos pterocarpanos: (-)-Maackian y Neorautanano; un triterpeno:  $\beta$ -Sitosterol; un derivado de ácido cinámico: 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo, y un cumestano no identificado (Tabla II).

 $\beta$ -Sitosterol (I)

C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O, cristales blancos, p.f. 135-139° C.

(-)-Maackian (II)

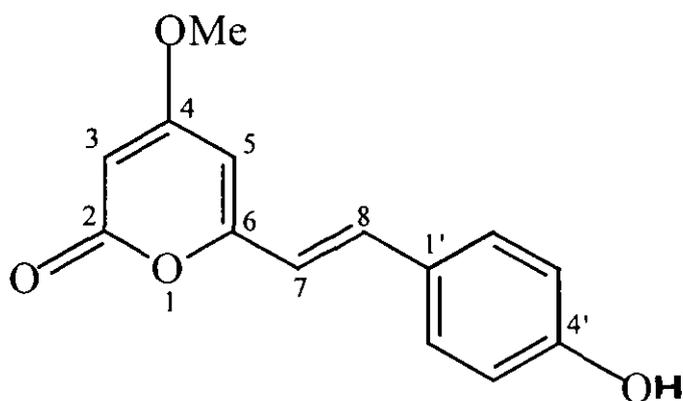


C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, material amorfo.

Datos de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
H-6a	3.47	ddd	10.3 y 4.9	1
H-6β	3.64	t	10.9	1
H-6α	4.22	dd	10.8 y 4.7	1
H-11a	5.47	d	6.6	1
OCH <sub>2</sub> O	5.91	d	5.2	2
H-4	6.42	d	2.3	2
H-10	6.44	s	-----	1
H-7	6.72	s	-----	1
H-2	6.55	dd	8.3 y 2.3	1
H-1	7.36	d	8.5	1

## 4'-Hidroxi-dehidrokavaina (III)



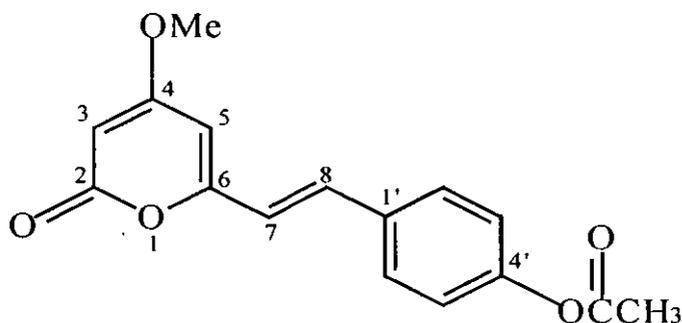
$C_{14}H_{12}O_4$ , sólido amarillo, p.f. 265-270° C.

UVλ max [MeOH] nm (ε): 218 (21472), 283 (6283), 361 (27999).

Datos de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> + DMSO).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
OMe-4	3.84	s	-----	3
H-3	5.48	d	2	1
H-5	6.05	d	2	1
H-8	6.56	d	16	1
H-11 y H-13	6.82	d	8.5	2
H-7	7.30	d	16	1
H-10 y H-14	7.38	d	8.5	2
OH-12	9.74	s	-----	1

## 4'-O-acetil-dehidrokavaina (IIIa)

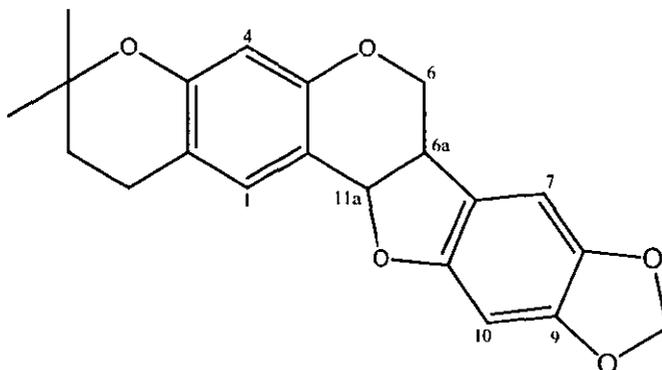


C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, agujas largas, color amarillo claro, p.f. 140-150° C.

Datos de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
OAc-12	2.31	s	-----	3
OMe4	3.83	s	-----	3
H-5	5.5	d	2.16	1
H-3	5.94	d	2.3	1
H-7	6.53	d	15.88	1
H-11 y H-13	7.11	d	8.68	2
H-8	7.48	d	15.82	1
H-10 y H-14	7.5	d	8.66	2

## Neorautanano (IV)

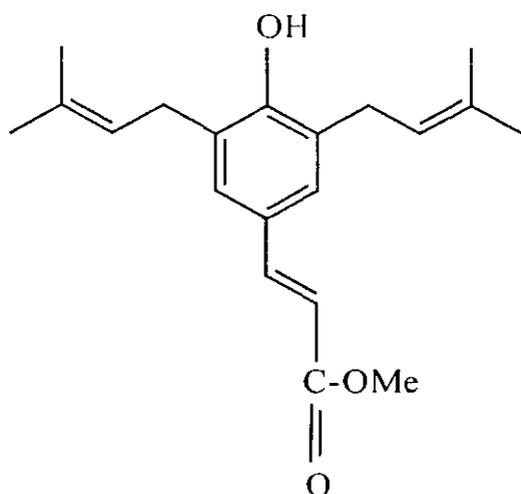


C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>, cristales blancos, p.f. de 190-195° C.

Datos de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
CH <sub>3</sub>	1.3	s	-----	3
CH <sub>3</sub>	1.34	s	-----	3
H-2'	1.79	t	6.7	2
H-1' bencílico	2.75	t	6.7	2
H-6a	3.45	ddd	10.8, 6.6, 4.4	1
H-6ax	3.6	t	10.9	1
H-6ec	4.18	dd	10.6, 4.8	1
H-11a	5.46	d	6.6	1
OCH <sub>2</sub> O	5.88	d	1.3	1
	5.91	d	1.26	1
H-10	6.37	s	-----	1
H-4	6.43	s	-----	1
H-7	6.71	s	-----	1
H-1	7.19	s	-----	1

## 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo (V)

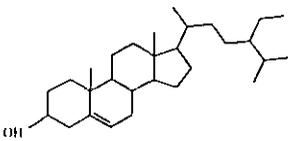
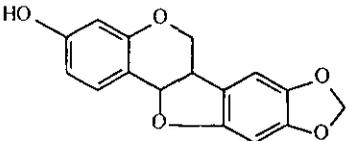
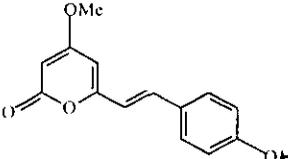
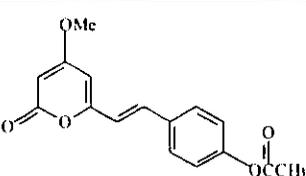
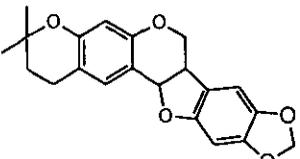


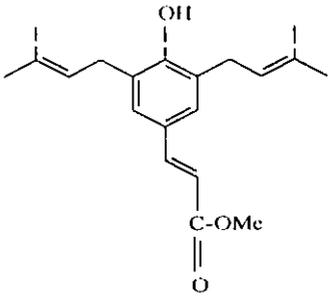
$C_{20}H_{26}O_3$ , aceite amarillo

Datos de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCl_3$ ).

Protón	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
4-CH <sub>3</sub>	1.77	s	-----	12
H-1' y 1''	3.33	d	7.16	4
OCH <sub>3</sub>	3.77	s	-----	3
H-2' y 2''	5.30	t	2.74	2
H-8	6.27	d	15.98	1
OH	7.16	s	-----	1
H-7	7.60	d	16	1

Tabla II. Metabolitos secundarios aislados del extracto metanólico de las raíces de *B. inremedia*.

Nombre	Punto de Fusión (pf)	Fórmula molecular	Estructura Molecular	Peso Molecular (pm)
$\beta$ -Sitosterol	130-134° C	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O		141
(-)-Maackian	Cera amorfa	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>		284
4'-Hidroxi-dehidrokavaina	265-270° C	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>		244
4'-O-acetil-dehidrokavaina	140-150° C	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>		286
Neorautanano	190-195° C	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>		352

3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo	Aceite viscoso amarillo	$C_{20}H_{26}O_3$		314
---	-------------------------	-------------------	---	-----

## EFFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN<sup>a</sup>

Los efectos de dosis crecientes de 4'-Hidro-dehidrokavaina (HK), 4'-O-acetil-dehidrokavaina (AK), de los extractos metanólico de *Boraginaria intemalia* y de *Piper methysticum* (CO<sub>2</sub> supercritico), sobre el tiempo de coagulación en sangre de ratón, se muestran respectivamente en las Tablas III y IV. Observe en la (Grafica 1) que las dosis crecientes AK y de *B. intemalia*, no guardan relación con la intensidad de la respuesta. Sin embargo, la HK y el extracto de *P. methysticum* incrementan el tiempo de coagulación a partir de la dosis de 10 mg/kg. hasta alcanzar el efecto máximo con la dosis de 100 mg/kg. Además, se muestra que con excepción de *B. intemalia*, las dosis de 100 mg/kg. de cada uno de los tratamientos es la que produce el efecto máximo.

Tabla III. Efectos de dosis crecientes de HK y AK sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón.

Tratamientos	n	Tiempo de Coagulación en seg.		
		X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
Solución Salina + Tween 80-05 al 2%	6	147	±	69
<b>4'-Hidroxi-dehidrokavaina<sup>c</sup></b>				
3.1 mg/kg.	6	124	±	70
10 mg/kg.	6	126	±	43
31 mg/kg.	6	136	±	53
100 mg/kg.	6	189	±	147
Solución Salina + Tween 80-05 al 2%	6	128	±	55
<b>4'-O-acetil-dehidrikavaina<sup>d</sup></b>				
3.1 mg/kg.	6	119	±	70
10 mg/kg.	6	125	±	36
31 mg/kg.	6	110	±	64
100 mg/kg.	6	229	±	48

<sup>a</sup> X representa el promedio de 6 sujetos (n) expresado en segundos ± su desviación estándar (ds).

<sup>c</sup> aislada de la raíz de *B. intemalia*. <sup>d</sup> derivado acetilado de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina.

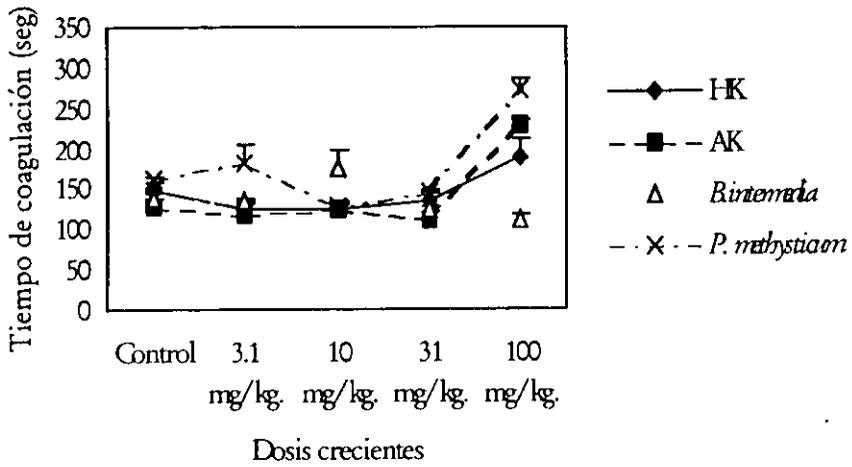
Tabla IV. Efectos de dosis crecientes de *B. intermedia* y *P. methysticum* sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón.

Tratamientos	n	Tiempo de Coagulación en seg.		
		X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
Solución Salina + Tween 80-05 al 2%	6	138	±	49
<i>Brongniartia intermedia</i> <sup>c</sup>				
3.1 mg/kg.	6	133	±	28
10 mg/kg.	6	174	±	153
31 mg/kg.	6	123	±	20
100 mg/kg.	6	111	±	42
Solución Salina + Tween 80-05 al 2%	6	162	±	16
<i>Piper methysticum</i> <sup>d</sup>				
3.1 mg/kg.	6	181	±	148
10 mg/kg.	6	128	±	37
31 mg/kg.	6	144	±	22
100 mg/kg.	6	274	±	71

<sup>a</sup>X representa el promedio de 6 sujetos (n) expresado en segundos ± su <sup>b</sup> desviación estandar (ds).

<sup>c</sup>extracto metanólico obtenido de las raíces. <sup>d</sup>extracto obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico.

Gráfica 1. Efectos de dosis crecientes de HK, AK, de los extractos de *B. intermedia* y *Piper methysticum* sobre el Tiempo de Coagulación



La gráfica 1 muestra los promedios (n=6) de las dosis crecientes de los tratamietos  $\pm$  su Error estandar.

## EFFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN REGISTRADO A LOS 15 MINUTOS, 24 Y 48 HORAS

Los efectos producidos sobre el tiempo de coagulación registrado a los 15 min., 24 y 48 horas posteriores a la administración por vía i. p. de una dosis de 100 mg/kg. de HK, AK y de los extractos de *B. intermedia* y *P. methysticum*, son resumidos de la Tabla V a la Tabla XVI, y se observan en las Gráficas de la 2 al a 5.

En la Tabla V se muestra que la administración i.p. de HK no modifica el tiempo de coagulación registrado 15 min. después de iniciado el tratamiento. En cambio, 100 U. I. de heparina, lo incrementan de manera significativa. La HK muestra efecto anticoagulante 24 horas después de su administración (Tabla VI), sin embargo este efecto, ya no se observa en el registro realizado a las 48 horas (Tabla VII).

Tabla V. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a los 15 minutos.

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	147 ± 69	
Warfarina (31 mg/kg.)	6	108 ± 21	
Heparina (100 U.I./kg.)	6	426 ± 61*	
4'-Hidroxidehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	189 ± 147	

<sup>a</sup> X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estandard (ds).

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

Tabla VI. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 24 horas.

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	86	± 12
Warfarina (31 mg/kg.)	6	157	± 153
Heparina (100 U.I./kg.)	6	209	± 150
4'-Hidroxi-dehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	318	± 146*

<sup>a</sup>X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estandard (ds).

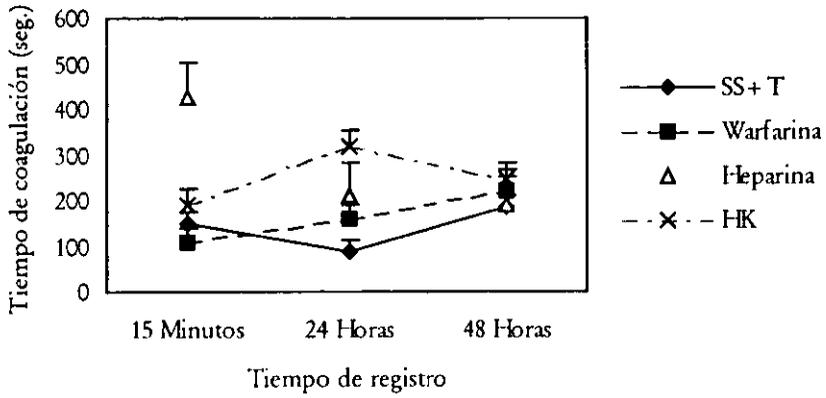
\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

Tabla VII. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 48 horas.

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	184	± 154
Warfarina (31 mg/kg.)	6	218	± 132
Heparina (100 U.I./kg.)	6	191	± 44
4'-Hidroxi-dehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	247	± 116

<sup>a</sup>X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estandard (ds).

Gráfica 2. Efectos de la 4'-Hidro-dehidrokavaina sobre el Tiempo de Coagulación, registrado a los 15 minutos, 24 y 48 horas



La gráfica 2 muestra los promedios de los tratamientos (n=6)  $\pm$  su Error estandar.

En la tabla VIII y en la Gráfica 3 se muestra el efecto anticoagulante producido con la administración de 100 mg/kg. de AK o 100 U.I. de heparina. Este efecto desaparece 24 horas después de haber administrado alguno de los dos tratamientos. En contraste, la warfarina en el mismo tiempo de registro, prolonga el tiempo de coagulación de manera significativa Tabla IX.

**Tabla VIII. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a los 15 minutos.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	128	± 55
Warfarina (31 mg/kg.)	6	120	± 45
Heparina (100 U.I./kg.)	6	311	± 132*
4'-O-acetil-dehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	229	± 48 *

\* X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su<sup>b</sup> desviación estandard (ds).

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

**Tabla IX. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 24 horas.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	148	± 93
Warfarina (31 mg/kg.)	6	332	± 22*
Heparina (100 U.I./kg.)	6	169	± 43
4'-O-acetil-dehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	142	± 54

\* X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su<sup>b</sup> desviación estandard (ds).

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

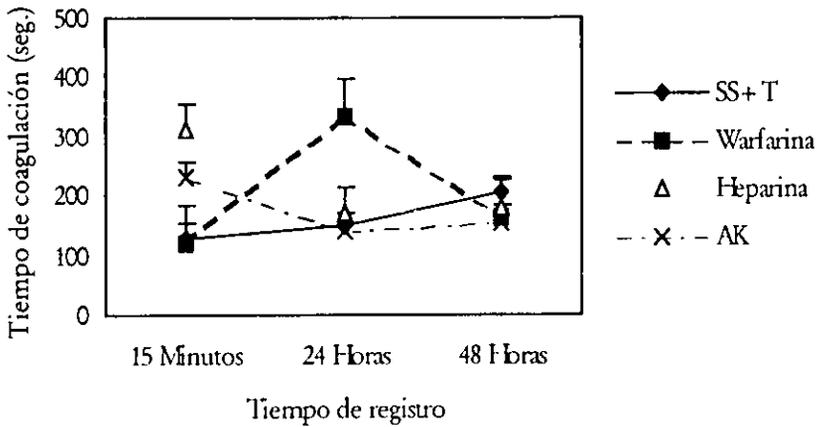
La Tabla X muestra que 48 horas después de haber administrado en forma independiente las sustancias problemas (HK, AK) y las de referencia (heparina, warfarina), no existen diferencias significativas con respecto al tiempo de coagulación obtenido en el grupo control.

Tabla X. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón. a las 48 horas

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	207	± 134
Warfarina (31 mg/kg.)	6	161	± 50
Heparina (100 U.I./kg.)	6	180	± 86
4'-O-acetil-dehidrokavaina (100 mg/kg.)	6	155	± 40

<sup>a</sup>X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estandar (ds).

Gráfica 3. Efectos de la 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre el Tiempo de Coagulación, registrado a los 15 minutos, 24 y 48 horas



La gráfica 3 muestra los promedios de los tratamientos (n=6) ± su Error estandar.

La administración i.p. de 100mg/kg del extracto metanólico obtenido de la raíz de *B. intemedia*, no modifica el tiempo de coagulación. En los registros obtenidos a los 15 min. (Tabla XI), 24 horas (Tabla XII) y 48 horas (Tabla XIII) después de dicho tratamiento, el tiempo de coagulación permaneció alrededor de los valores obtenidos en el grupo control. En contraste, la administración i.p. de 100 U.I. de heparina o 31 mg/kg. de warfarina, lo prolongaron respectivamente a los 15 min. y a las 24 horas (observe las Tablas XI y XII y la Gráfica 4).

**Tabla XI. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a los 15 minutos.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	138	±	49
Warfarina (31 mg/kg.)	6	91	±	35
Heparina (100 U.I./kg.)	6	296	±	113*
<i>Brongniartia intemedia</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	111	±	42

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos X ± su desviación standard (ds). <sup>c</sup> extracto metanolico de las raíces.

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

**Tabla XII. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 24 horas.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	158	±	34
Warfarina (31 mg/kg.)	6	302	±	61*
Heparina (100 U.I./kg.)	6	145	±	20
<i>Brongniartia intemedia</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	136	±	29

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos X ± su desviación standard (ds). <sup>c</sup> extracto metanolico de las raíces.

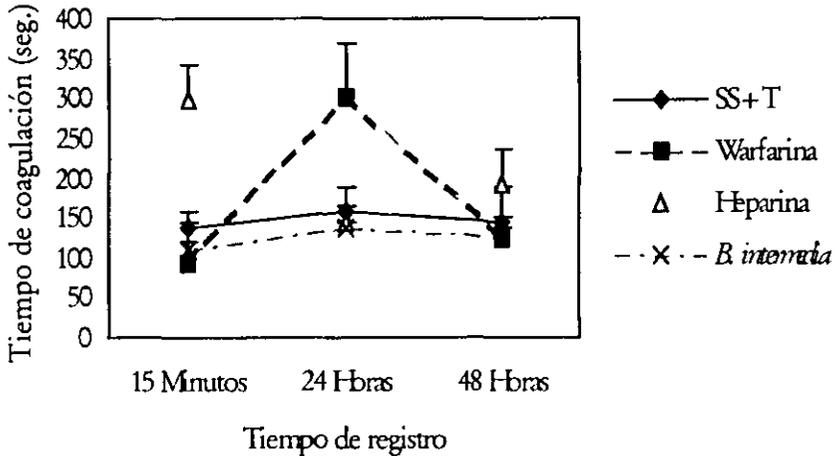
\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

Tabla XIII. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 48 horas.

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	143	± 9
Warfarina (31 mg/kg.)	6	122	± 18
Heparina (100 U.I./kg.)	6	191	± 44
<i>Brongniartia intermedia</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	128	± 37

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos X ± su desviación estandar (ds). <sup>c</sup> extracto metanolico de las raíces.

Gráfica 4. Efectos del extracto de *Brongniartia intermedia* sobre el Tiempo de Coagulación, registrado a los 15 minutos, 24 y 48 horas



La gráfica 4 muestra los promedios de los tratamientos (n=6) ± su Error estandar.

A diferencia del extracto metanólico de *B. intermedia*, el extracto de *P. methysticum* obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, tiene efecto anticoagulante (Gráfica 5). Como se observa en la Tabla XIV, 15 min. después de la administración i.p. de 100 mg/kg. de *P. methysticum*, se incrementa el tiempo de coagulación de manera significativa. De igual manera, 100 U.I. de heparina administrada por la misma vía. también lo prolonga. Como se observa en los siguientes tiempos de medición (Tabla XV y XVI), ambas sustancias pierden su efecto. En contraste, la administración i.p. de 31 mg/kg. de warfarina incrementa el tiempo de coagulación 24 horas después de su administración (Tabla XV).

**Tabla XIV. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a los 15 minutos.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	162 ±	16
Warfarina (31 mg/kg.)	6	144 ±	23
Heparina (100 U.I./kg.)	6	417 ±	95*
<i>Piper methysticum</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	275 ±	71*

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos (X ± su desviación estandar (ds). <sup>c</sup> extracto obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico.

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

**Tabla XV. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón, a las 24 horas.**

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	110 ±	34
Warfarina (31 mg/kg.)	6	291 ±	67*
Heparina (100 U.I./kg.)	6	153 ±	25
<i>Piper methysticum</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	156 ±	25

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos (X ± su desviación estandar (ds). <sup>c</sup> extracto obtenido con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico.

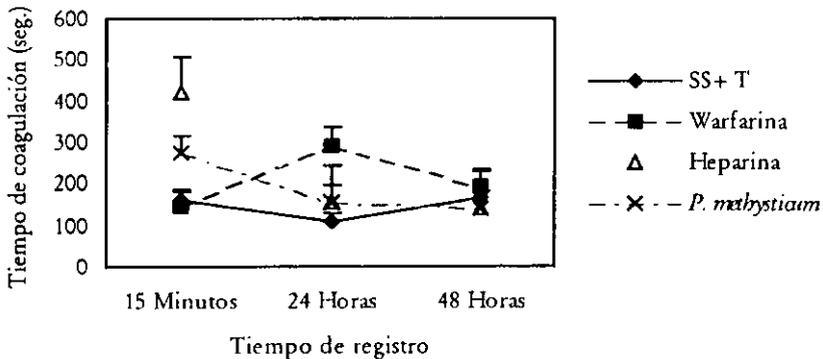
\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

Tabla XVI. Efecto de diferentes tratamientos sobre el Tiempo de Coagulación en sangre de ratón. a las 48 horas.

Tratamientos	n	X <sup>a</sup>	ds <sup>b</sup>
Solucion Salina + Tween 80-05 al 2%	6	165	± 13
Warfarina (31 mg/kg.)	6	191	± 144
Heparina (100 U.I./kg.)	6	138	± 18
<i>Piper methysticum</i> <sup>c</sup> (100 mg/kg.)	6	138	± 39

<sup>a</sup> número de sujetos. <sup>b</sup> representa el promedio en segundos (X ± su desviación estandar (ds). <sup>c</sup> extracto obtenido con CO2 en estado supercrítico.

Gráfica 5. Efectos del extracto de *Piper methysticum* sobre el Tiempo de Coagulación, registrado a los 15 minutos, 24 y 48 horas



La gráfica 5 muestra los promedios de los tratamientos (n=6) ± su Error estandar.

## EFECTO DE LA 4'-HIDROXI-DEHIDROKAVAINA Y LA 4'-O-ACETIL-DEHIDROKAVAINA SOBRE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

### Inducida con ADP

Los efectos de las concentraciones crecientes de una dosis de HK y AK sobre el porcentaje de agregación plaquetaria inducida con ADP en células humanas, se muestran en la Tabla XV y en la Gráfica 6. Observe que las dosis crecientes de ambos tratamientos, no guardan relación directa con la intensidad de la respuesta. Sin embargo, la concentración 10  $\mu\text{M}$  de ambas sustancias, disminuyen significativamente el porcentaje de agregación plaquetaria.

Tabla XVII. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con ADP.

Tratamientos	n	% de Agregación Plaquetaria		
		X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
DMSO y ADP (control)	6	86	±	12
4'-Hidroxi-dehidrokavaina				
1 $\mu\text{M}$	6	80	±	17
10 $\mu\text{M}$	6	66	±	13*
100 $\mu\text{M}$	6	67	±	13
4'-O-acetil-dehidrokavaina				
1 $\mu\text{M}$	6	76	±	4
10 $\mu\text{M}$	6	53	±	14*
100 $\mu\text{M}$	6	71	±	15

<sup>a</sup> X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n)  $\pm$  su <sup>b</sup> desviación estandar (ds).

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

### Inducida con Epinefrina

La Tabla XVIII y la Gráfica 7 muestran que todas las concentraciones probadas de HK y AK disminuyen de manera significativa, la agregación plaquetaria, inducida por epinefrina. Además, también muestra que la intensidad del efecto antiagregante, producido por cada una de las sustancias mencionadas, es directamente proporcional a la dosis administrada.

Tabla XVIII. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con Epinefrina.

Tratamientos	n	% de Agregación Plaquetaria		
		X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
DMSO y Epinefrina (control)	6	76	±	14
4'-Hidroxi-dehidrokavaina				
1 μM	6	55	±	18*
10 μM	6	50	±	11*
100 μM	6	36	±	16*
4'-O-acetil-dehidrokavaina				
1 μM	6	46	±	7*
10 μM	6	50	±	6*
100 μM	6	26	±	16*

<sup>a</sup> X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estándar (ds).

\* Señala diferencias significativas con respecto al control, en un nivel de significancia p 0.05.

### Inducida con Colágena

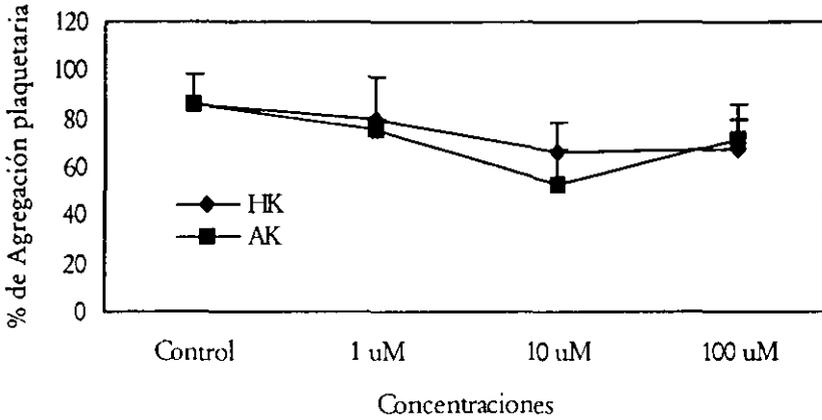
Cuando la agregación plaquetaria es inducida por colágena, la HK como tampoco la AK, modifican significativamente los valores de agregación plaquetaria, con respecto a los obtenidos en el grupo control (Tabla XIX y Gráfica 8).

Tabla XIX. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con Colágena.

Tratamientos	n	% de Agregación Plaquetaria		
		X <sup>a</sup>	±	ds <sup>b</sup>
DMSO y Colagena (control)	6	76	±	15
4'-Hidroxi-dehidrokavaina				
1 μM	6	91	±	5
10 μM	6	70	±	33
100 μM	6	39	±	27
4'-O-acetil-dehidrokavaina				
1 μM	6	87	±	23
10 μM	6	84	±	13
100 μM	6	70	±	24

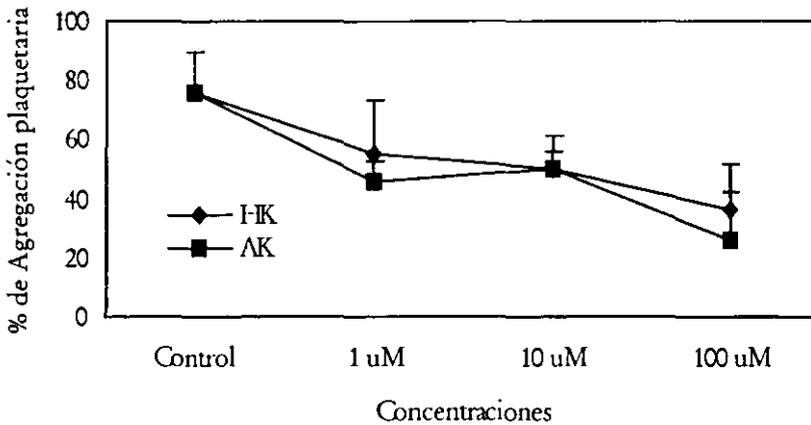
<sup>a</sup>X representa el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± su <sup>b</sup> desviación estandar (ds).

Gráfica 6. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con ADP



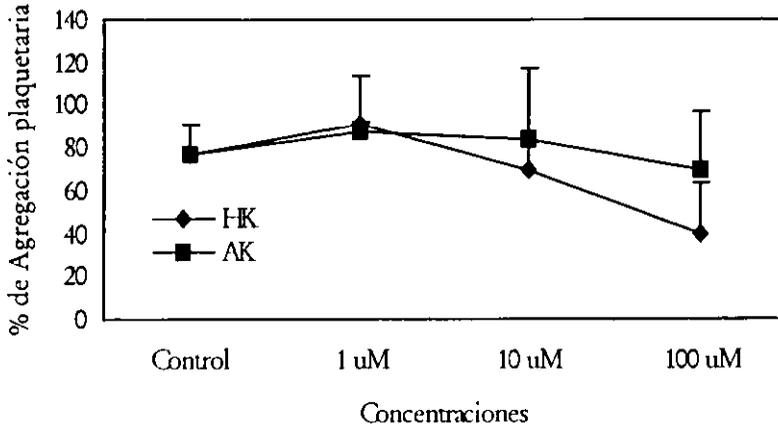
La gráfica 6 muestra el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± desviación estandar.

Gráfica 7. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con Epinefrina



La gráfica 7 muestra el promedio en segundos de 6 sujetos (n) ± desviación estandar.

Gráfica 8. Efecto de la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina y 4'-O-acetil-dehidrokavaina sobre la Agregación Plaquetaria inducida con Colágena



La gráfica 8 muestra el promedio en segundos de 6 sujetos (n)  $\pm$  desviación estandar.

## DISCUSIÓN

En este estudio, del extracto metanólico de las raíces de *Bryonia intermedia* se aislaron seis metabolitos secundarios:  $\beta$ -Sitosterol; (-)-Maackian; Neorautanano; 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinámato de metilo; 4'-Hidroxi-dehidrokavaina (HK) y un cumestano no identificado. debido a que su punto de fusión es mayor a 300° C., lo cual impidió la realización de pruebas espectroscópicas. La estilpirona HK, ha sido aislada con anterioridad de *B. podalyroides* (Reyes, 1994) y de *B. intermedia* (Salinas, 1998). Es interesante señalar que este metabolito es típico de familias primitivas como Lauráceas y Piperáceas (Hipolito *et al*, 1997; Smith, 1993; Talapatra *et al*, 1982 y Kaloga *et al*, 1983), siendo rara su presencia en Leguminosas y Asteraceas. La acetilación de la HK se obtuvo mediante reacción química y sus espectros de U. V. y RMN<sup>1</sup>H fueron similares a los reportados por Salinas (1998), Hipolito *et al* (1997) y Romo *et al* (1971).

La evaluación farmacológica indica que tanto la 4'-O-acetil-dehidrokavaina (AK), como el extracto de *Piper nathyticum* (CO<sub>2</sub> supercrítico), prolongan el tiempo de coagulación registrado 15 minutos después de haber administrado los tratamientos (100 mg/kg. por vía intraperitoneal) de manera independiente. En cambio, ninguno de los tratamientos modificaron el tiempo de coagulación registrado a las 24 y 48 horas. Estos resultados, son similares a los obtenidos con heparina, administrada por la misma vía y hacen pensar en la posibilidad de que los tratamientos pudieran compartir el principal mecanismo de acción conocido para esta sustancia, es decir la activación de la antitrombina III (Page *et al*, 2001). Sin embargo, la única prueba realizada en el ratón

íntegro, en la presente tesis, no permitió distinguir el sitio o los sitios de acción. Por otra parte, los estudios realizados con plaquetas humanas, indican acciones de la AK sobre estas células y por ende su innegable participación en el efecto anticoagulante, pero de ninguna manera descartan una posible actividad sobre la enzima antitrombina III. En contraste, la actividad anticoagulante de la HK, se observa 24 horas después de haberse administrado el tratamiento, lo cual concuerda con lo observado para warfarina. Desde el punto de vista estructural, las estirilpironas, al igual que la warfarina, poseen un anillo  $\alpha$ -lactona, por lo cual se esperaría un efecto anticoagulante producido por un mecanismo similar al propuesto para la warfarina, es decir que inhibieran los factores de la coagulación dependientes de la vitamina K (Stryer, 1993). Sin embargo, no se entiende por que la AK y el extracto de *P. methysticum*, no modifican el tiempo de coagulación a los 15 min. Con relación a esto último, es probable que la alta polaridad de HK debido a la presencia del grupo hidroxilo, retarde su absorción y en consecuencia no se observa efecto anticoagulante debido a que en los primeros 15 minutos no se alcanzan concentraciones efectivas. De todas maneras la presencia del anillo  $\alpha$ -lactona en la AK, no es suficiente para conferirle actividad anticoagulante por un mecanismo de acción similar al de la warfarina. Además, otros mecanismos parecen estar involucrados, como lo demuestran los resultados de agregación plaquetaria, en donde la HK, al igual que la AK son activas. En resumen, los resultados sugieren que la actividad de la HK y del extracto de *P. methysticum* no es a consecuencia de la desaparición de los factores de coagulación  $\gamma$ -carboxilados (Page *et al*, 2001). Sin embargo, en el caso de la HK, la actividad

anticoagulante podría estar ligada al anillo  $\alpha$ -lactona, ya que su efecto se observa en el mismo tiempo que el efecto producido por la warfarina.

En lo que se refiera a la agregación plaquetaria, los resultados muestran que tanto la HK como la AK, inhiben la agregación plaquetaria inducida con epinefrina y con ADP, y no la modifican cuando esta es inducida por colágena.

Respecto a la actividad antiagregante de la AK, hablamos posiblemente de un mecanismo de acción similar al del ácido acetilsalicílico (Harvey *et al*, 1968), esto puede deberse a la semejanza estructural que existe entre ambos (grupo acetilo), lo que nos hace pensar que la AK esta inhibiendo la ciclooxigenasa de forma similar a la aspirina. Para el caso de la HK, posiblemente presenta un mecanismo de acción dependiente de este grupo estructural siendo otro u otros los grupos de la molécula los que interaccionen para llevar acabo la inhibición de la agregación plaquetaria.

## CONCLUSIONES

- Se aislaron seis compuestos, de los cuales únicamente se identificaron cinco:  $\beta$ -Sitosterol; (-)-Maackian; Neorautanano; 3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinámato de metilo, y especialmente la 4'-Hidroxi-dehidrokavaina, de este último compuesto se hizo la acetilación, obteniendo la 4'-O-acetil-dehidrokavaina.
- La 4'-Hidroxi-dehidrokavaina a dosis de 100 mg/kg, Causa un efecto anticoagulante notorio registrado 15 minutos después de administrado el tratamiento.
- La 4'-O-acetil-dehidrokavaina y el extracto de *Piper mabysticum* a la misma dosis, causan un efecto anticoagulante notorio que se expresa a las 24 horas posteriores a la administración de manera independiente de los tratamientos.
- El extracto metanólico de las raíces de *Brongnartia intermedia*, no posee actividad anticoagulante, en ninguno de los 3 tiempos registrados.
- La HK y la AK a dosis 100  $\mu$ M, poseen actividad antiagregante plaquetaria cuando es inducida con Epinefrina o ADP, y no poseen actividad cuando es inducida con Colágena.

## REFERENCIAS

- Aronow W. S. Antiplatelet agents in the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in older patients with vascular disease. *Drugs & Aging*. 15: (1999) 91-101.
- Bhatt D. L., Topol. E. J. Antiplatelet an anticoagulant therapy in the secondary prevention of ischemic heart disease. *Medical Clinics of North America*. 84: (2000) 163-179.
- Corona Reyes Manuel I. Aislamiento y determinación estructural de metabolitos secundarios en *Bryoniaartia intermedia* (Leguminosae). Universidad Veracruzana (Orizaba). Tesis de Licenciatura. Instituto de Química. UNAM. 1993.
- Duffield A. M., Jamieson D. D., Lidgard R. O., Duffield P. H. and Bourne D. J. Identification of some human urinary metabolites of the intoxicating beverage Kava. *Journal of Chromatography*. 475: (1989) 273-281.
- Gleitz Johannes, Beile Anne, Wilkens Petra, Ameri Angela and Peters Thies. Antithrombotic Action of the Kava Pyrone (+)-Kavain Prepared from *Piper methysticum* on Human Platelets. *Planta Medica*. 63: (1997) 27-30.
- Harvey J. Weis, Louis M. Aledort and Shaul Kochwa. The Effect of Salicylates on the Hemostatic Properties of Platelets in Man. *The Journal of Clinical Investigation*. 47: (1968) 2169-2180.
- Hipólito F. P., Muradian J., Walter B. Mors. Estudio Fitoquímico de la *Ascomium subelegans* (Mohlenb). Yakovl. Aislamiento y síntesis del 4-Metoxi-6-(p-hidroxi-estiril)- $\alpha$ -pirona. *Revista Latinoamericana de Química*. 8:(1997) 79-81.

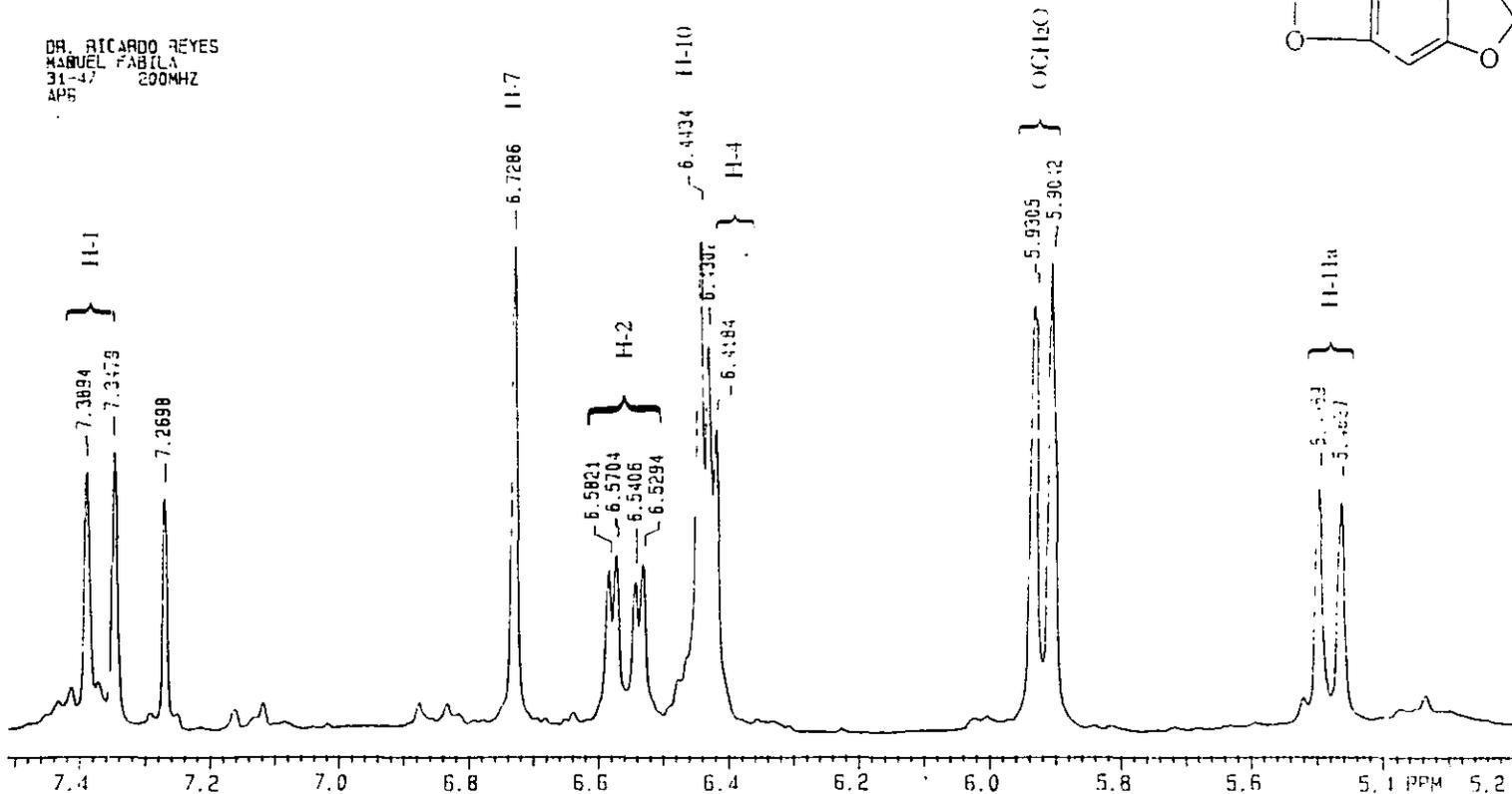
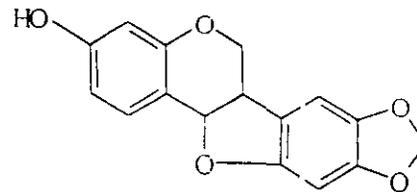
- Homma S. Yamaguchi I. Thrombolytic, antiplatelet and anticoagulant therapy for thrombotic disorders. *Nippon Rinsho-Japanese Journal of Clinical Medicine*. 57: (1999) 1561-1568.
- Houssay Bernardo. *Fisiología Humana*. Ed. El Ateneo. Barcelona, 1999. pp: 1-7
- Kaloga M., Hansel R. Isolation of a Kawapyrone from *Achyrocline satureioides*. *Planta Medica*. 48: (1983) 103-104.
- Mandoki J. J., Zavala E., Silva G. The dual effects of estrogens on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc*. 20: (1983) 45-48.
- Martínez Maximino. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. Primera Edición 1979. Primera Reimpresión, 1987.
- Murray Robert K., Peters Mayes A., Daryl Granner K. y Rodwell Victor W. *Bioquímica de Harper*. Ed. El Manual Moderno. México, 1994.
- Newsholme E. A. y Leech A. R. *Bioquímica Medica*. Ed. Interamericana. México, 1990. pp: 497-499.
- Orten M. James and Neuhaus W. Otto. *Bioquímica Humana*. Ed. Panamericana. México, 1990. Pp: 529
- Page P. Clive, Curtis J. Michael, Sutter C. Morley, Walker J. A. Michael and Hoffman B. Brian. *Farmacología integrada*. Ed. Harcourt. España, 2000.
- Rang H. P., Dale M. M. y Ritter. J. M. *Pharmacology*. Ed. Churchill Livingstone. 1999. 310-327.

- Reyes Chilpa Ricardo. Isoflavonoides de *Brongniartia podalyrioides* "Hierba de la Víbora" (Leguminosae) y su efecto contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. 1994.
- Reyes Chilpa R., Gómez G. F., Quijano L., Magos G. G. A. y Ríos C. T. Preliminary result on the protective effect of (-)-edunol a pterocarpan from *B. podalyrioides* (Leguminosae). Against *Bothrops atrox* venom in mice. Journal Ethnopharmacol. 42: (1994) 199-203.
- Romo J., Mundo H. y Cariño M. A. Aislamiento y estructura de la Panamina, un componente de la *Suettia panamensis* Benth. Revista Latinoamericana de Química. 3: (1971) 46-49.
- Salinas Sánchez Josefina. Química de *Brongniartia podalyrioides* y *Brongniartia inaemedia* (Leguminosae). Tesis de Licenciatura. UAM. Xochimilco. 1998.
- Sing Y. N. Kava: an overview. Journal Ethnopharmacol. 37(1992) 13-45.
- Smith M. Roger. Kava lactonas in *Piper methysticum* from Fiji. Phytochemistry. 22: (1983) 1055-1056.
- Smith M. Roger, Thakrar H., Arowolo T. A. and Shafi A. A. High-performance liquid chromatography of Kava lactonas from *Piper methysticum*. Journal of Chromatography. 283: (1984) 303-308.
- Stryer Lubert. Bioquímica. Ed. Reverté. México, 1993. pp: 257.
- Talapatra Sunil K., Pal Milan K., Mallik Asok K. and Talapatra Bani. Structure and Synthesis of (-)-Anabellamide. A new Phenylalanine derived ester amide from

- Anaphalis subumbellata*: Occurrence of 4'-Hydroxydehydrokawain. Journal of Natural Products. 46: (1983) 140-143.
- Teng Che-Ming, Hsu Shih-Yuan, Lin Chien-Huang, Yu Sheu-Meei, Wang Kuei-Jane, Lin Ming-Hsuan and Chen Chieh-Fu. Antiplatelet action of Dehydrokawain Derivates Isolated from *Alpinia speciosa* Rhizoma. Chinese Journal of Physiology. 33: (1990) 41-48.
  - Turpie A. G. G. A comparison of aspirin with placebo in patients treated with warfarin after heart-valve replacement. N Engl J Med. 328: (1994) 628-635.
  - Voet Donald, Voet Judith. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, 1992.

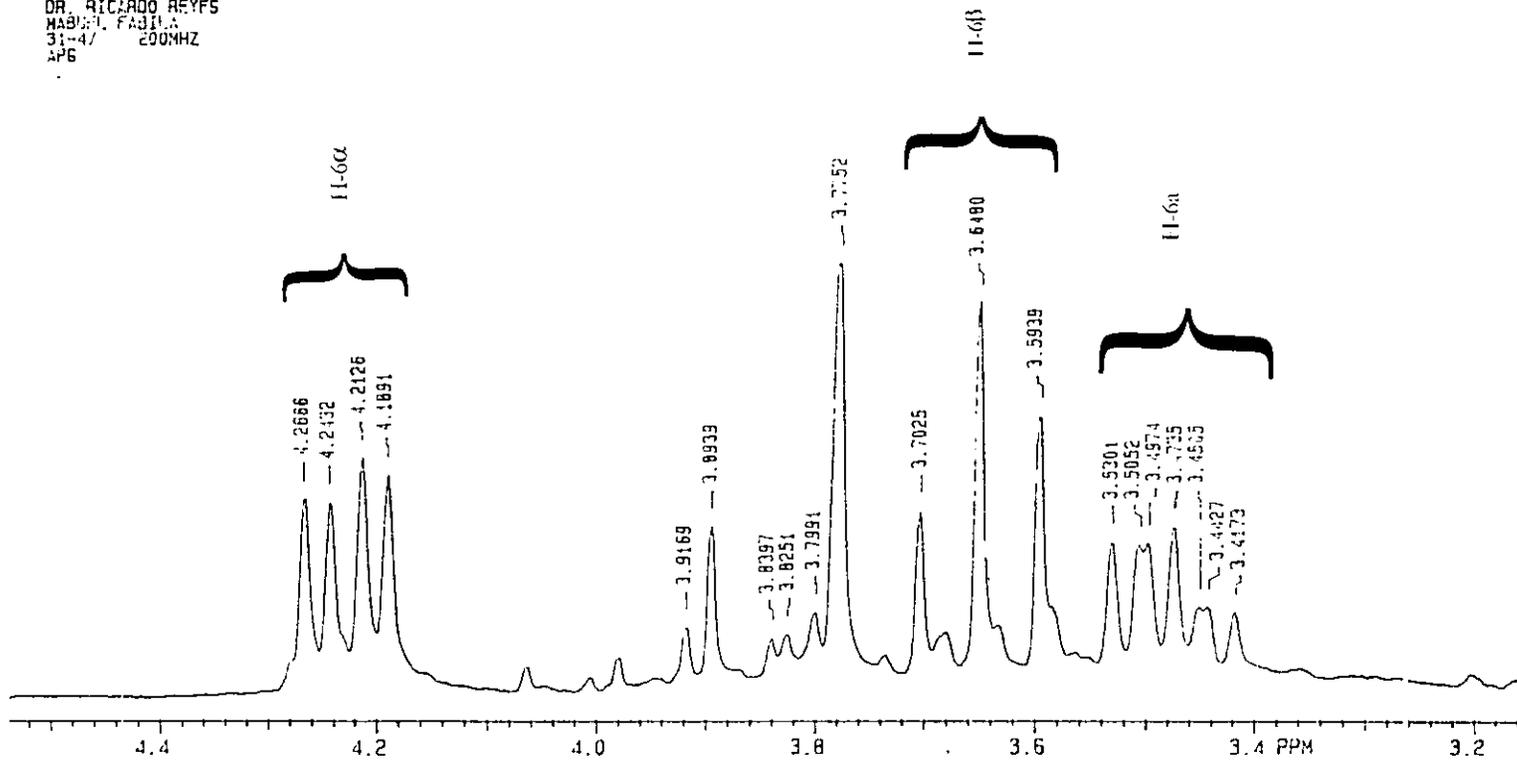
# ANEXO

DR. RICARDO REYES  
MANUEL FABILA  
31-47 200MHZ  
APS



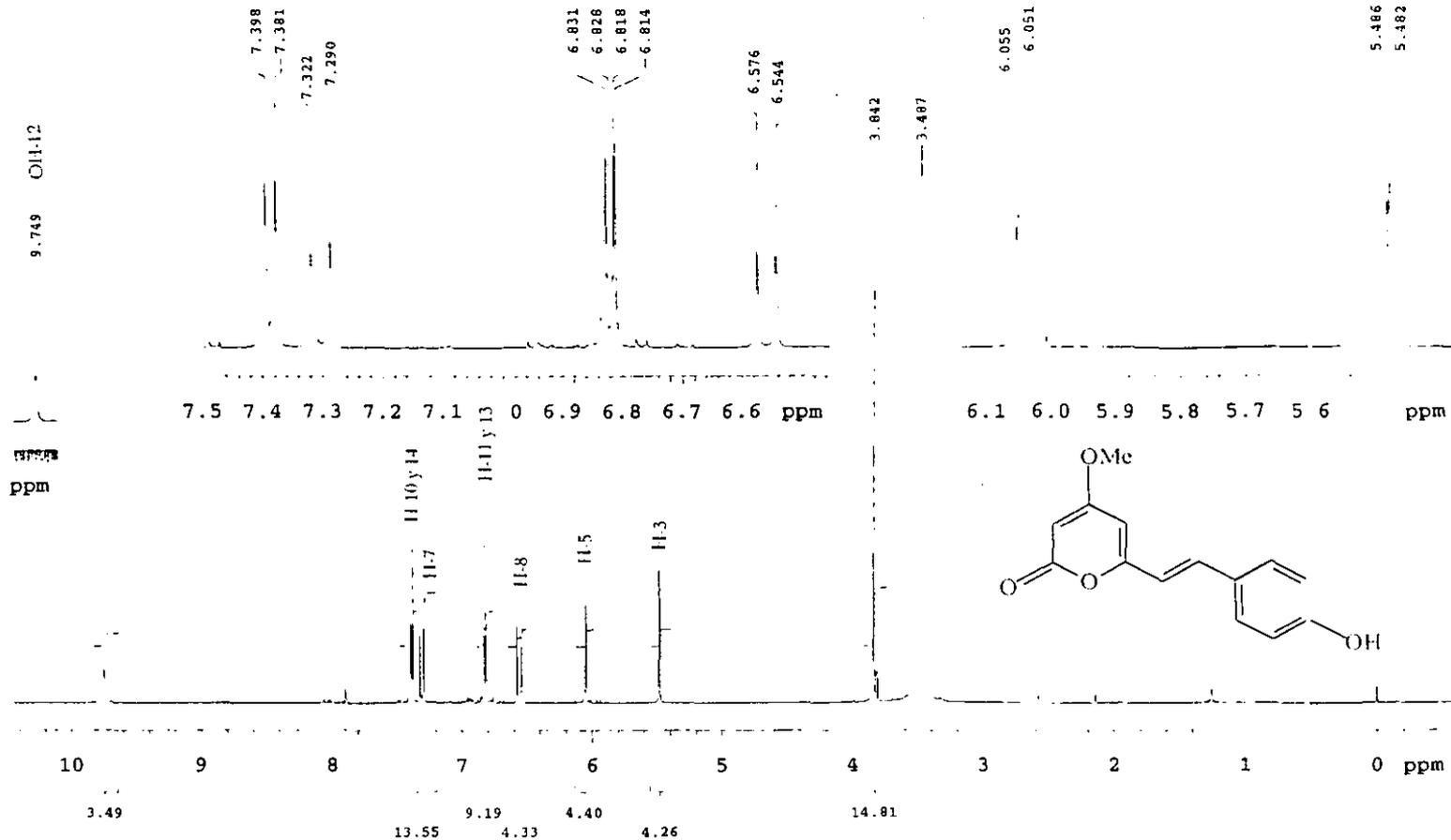
Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, agua deuterada). (-)-Maackian

DR. RICARDO REYFS  
MARIO L. FABIJA  
31-4/ 200MHZ  
AP6



Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, Cloroformo, agua deuterada): (-)-Maacki

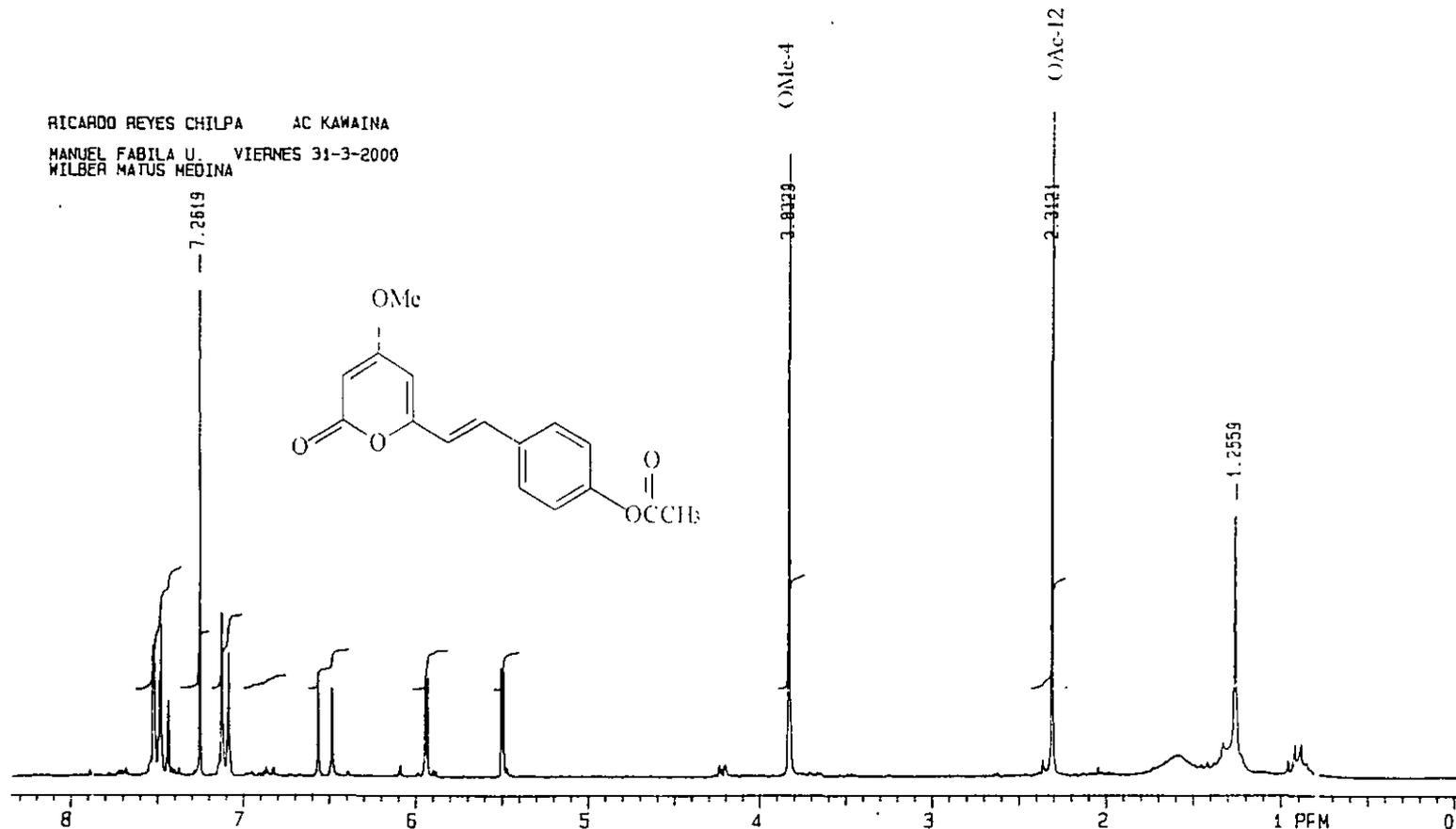
disolvente: CDC13



Espectro de RMN<sup>1</sup>H (500MHz, Cloroformo, agua deuterada)

4'-Hidroxi-dehidrokavaina

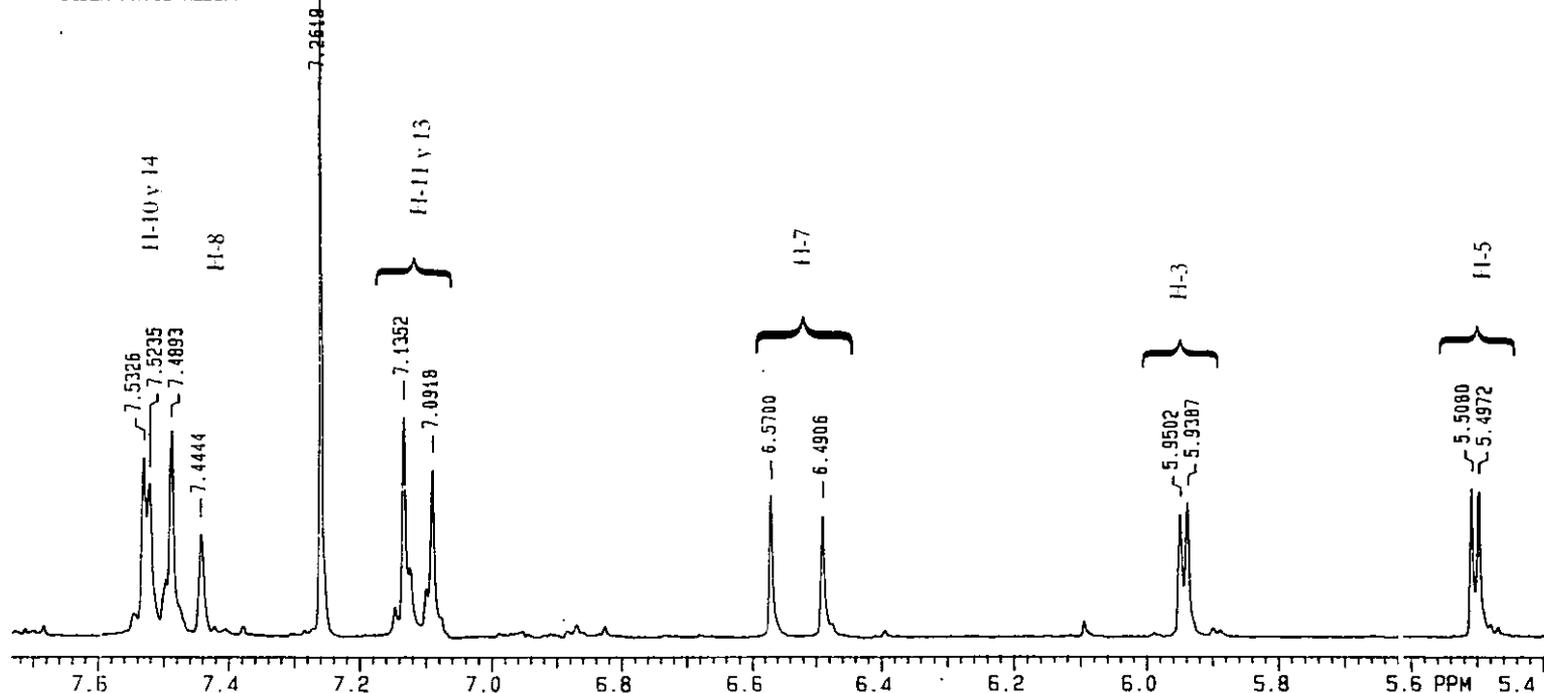
RICARDO REYES CHILPA AC KAWAINA  
MANUEL FABILA U. VIERNES 31-3-2000  
WILBER MATUS MEDINA



Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, Cloroformo, agua deuterada)

4'-O-acetil-denidrokavaina

RICARDO REYES CHILPA AC KAWAINA  
MANUEL FABILA U. VIERNES 31-3-2000  
WILBER MATUS MEDINA

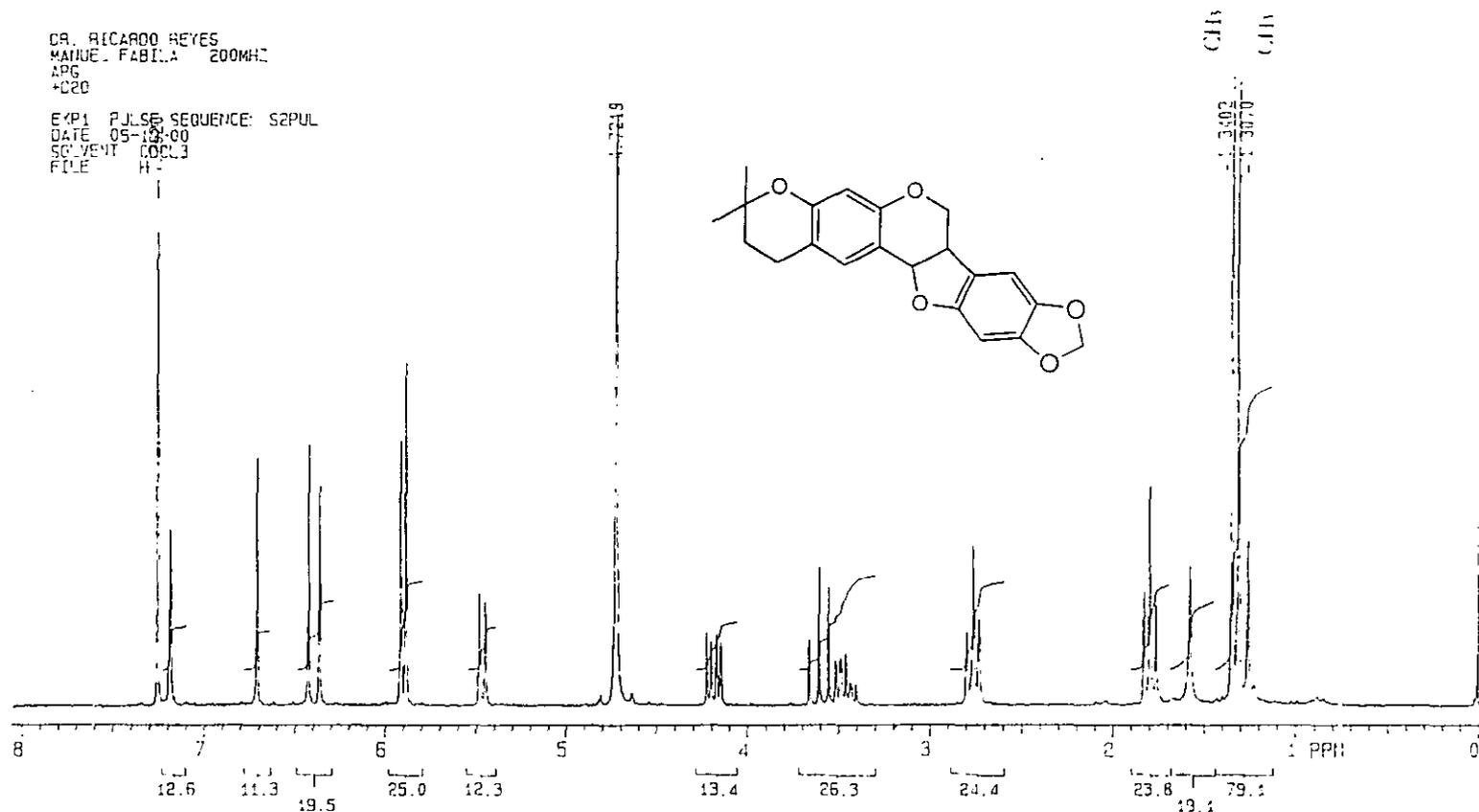
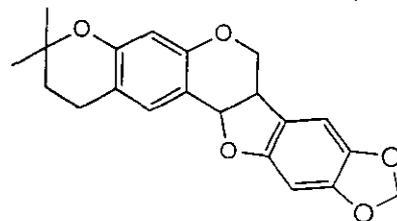


Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, Cloroformo, agua deuterada)

4'-O-acetil-dehidrokavaina

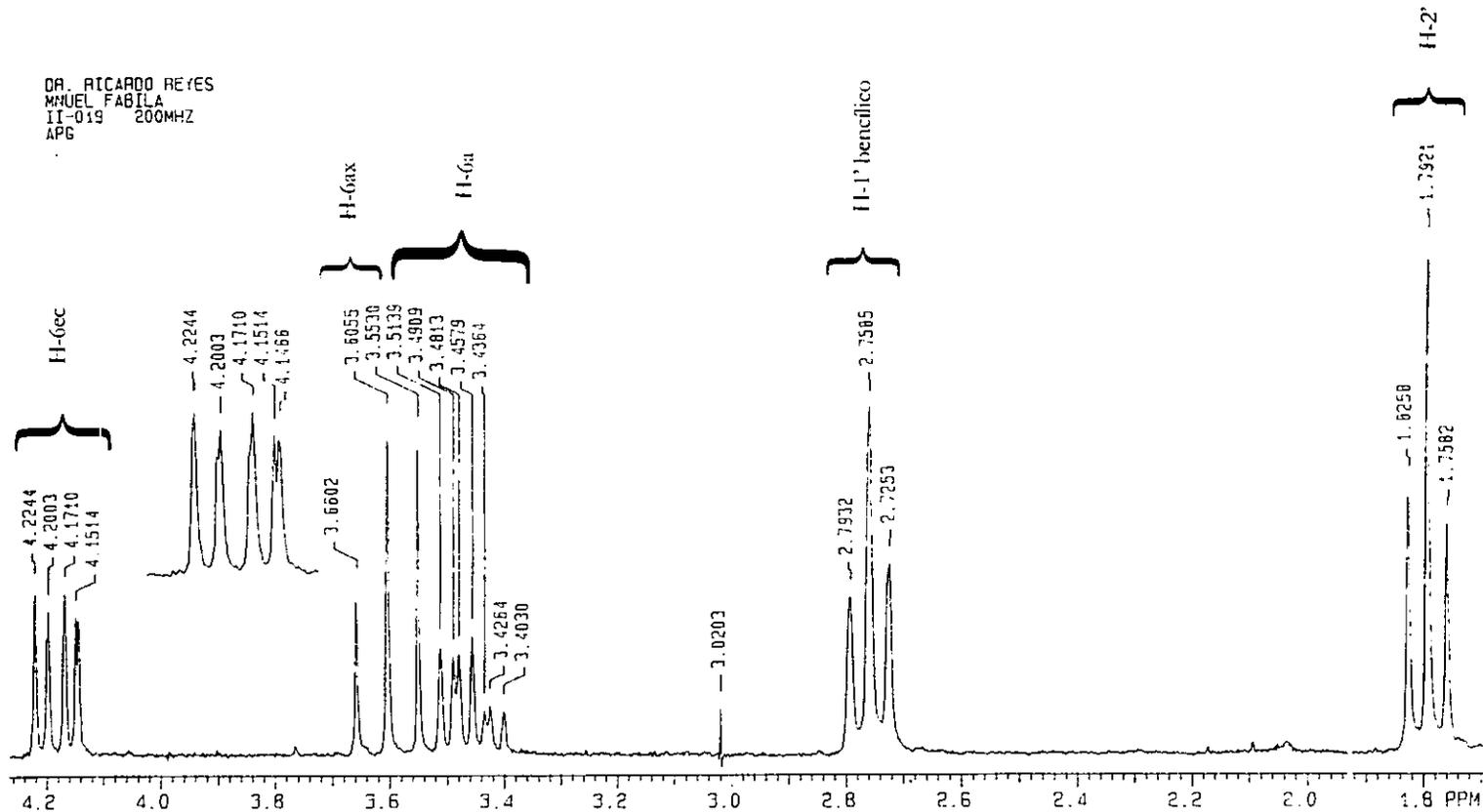
DR. RICARDO REYES  
MANUE. FABILA 200MHZ  
APG  
+C20

EXP1 PULSE SEQUENCE: S2PUL  
DATE 05-19-00  
SOLVENT CDCL3  
FILE H-



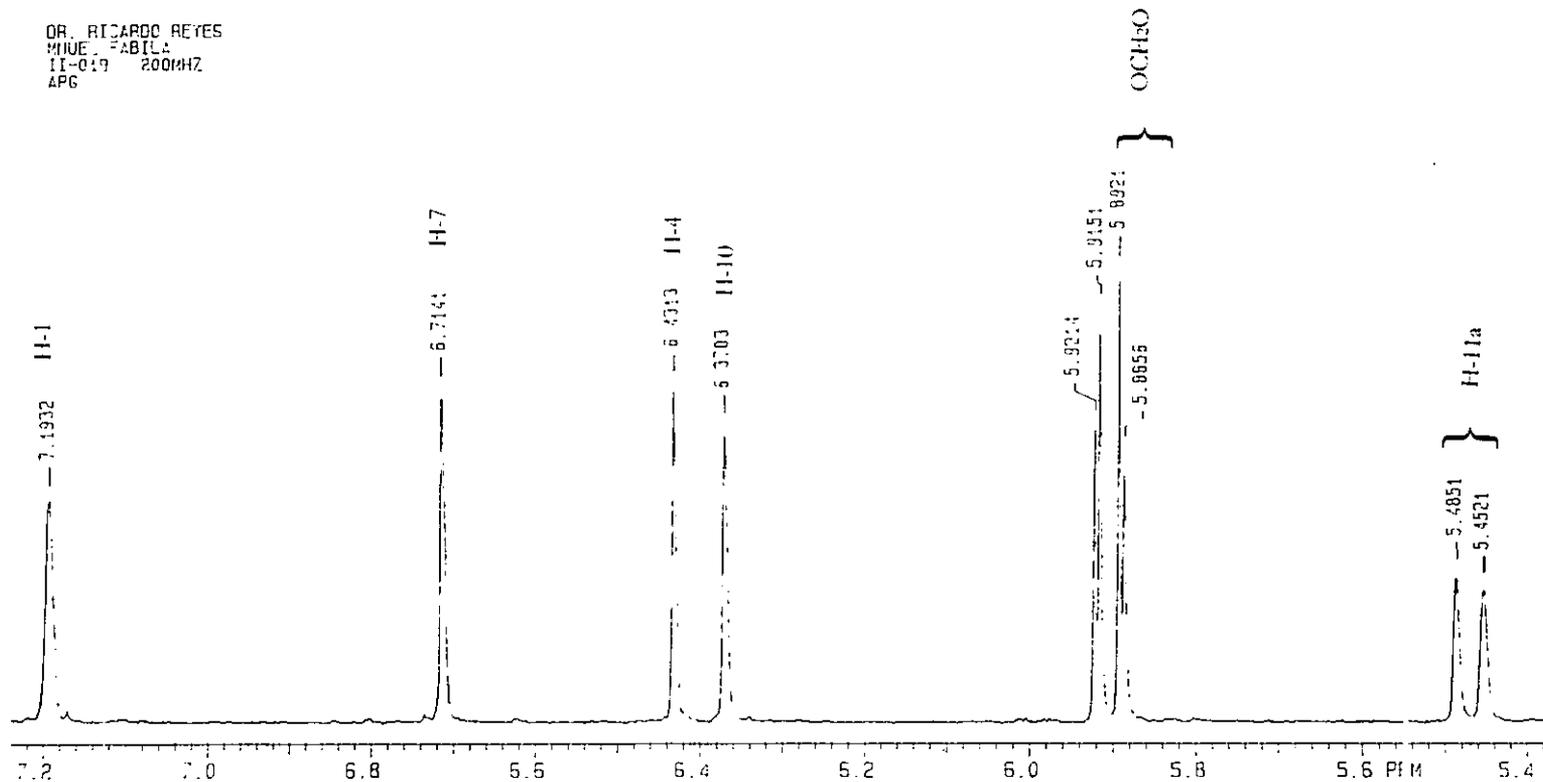
RMN<sup>1</sup>H(200MHz, Cloroformo, agua deuterada): Neorautanano

DR. RICARDO REYES  
MUEL FABILA  
II-019 200MHZ  
APG

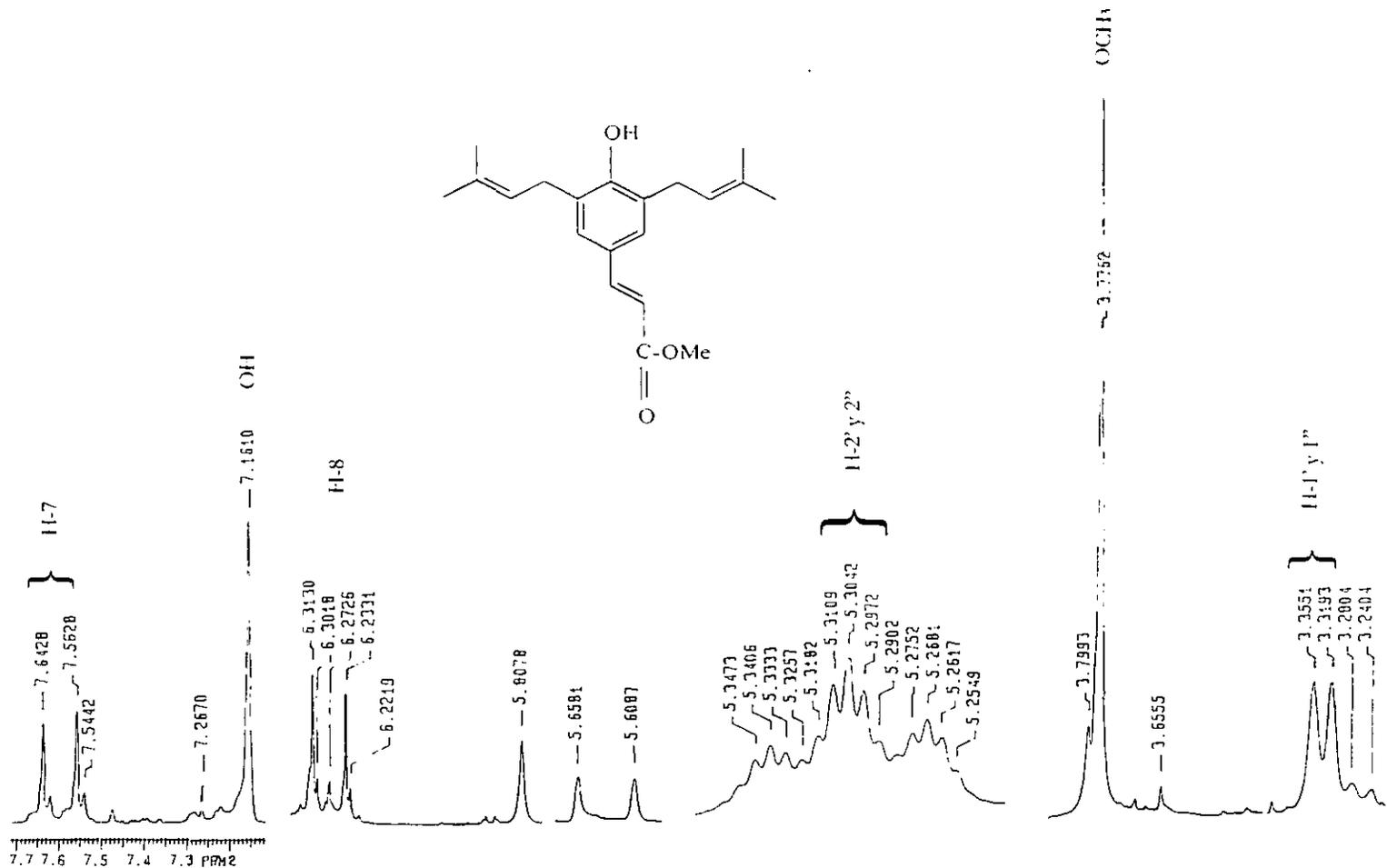


Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200MHz, Cloroformo, agua deuterada) Neorautanano

DR. RICARDO REYES  
MQUE. FABILA  
11-019 200MHZ  
APG

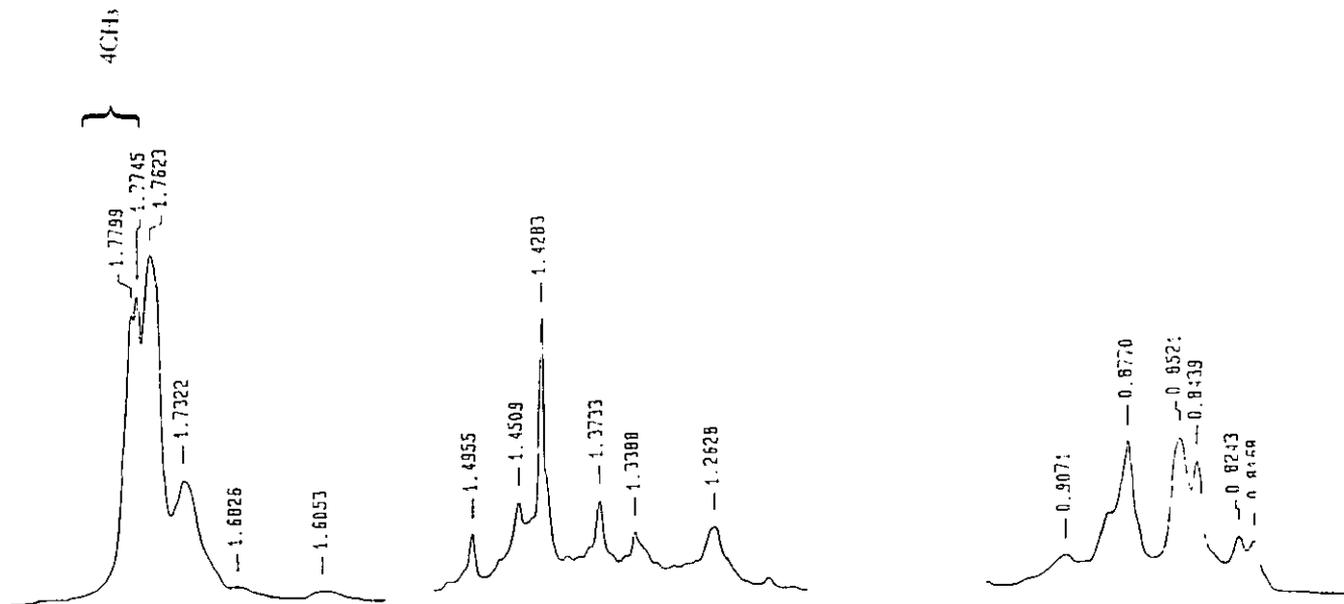


Espectro de RMN<sup>1</sup>H(200MHZ, Cloroformo, agua deuterada). Neorautanano



Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, Cloroformo, agua deuterada)

3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo



Espectro de RMN<sup>1</sup>H (200 MHz, Cloroformo, agua deuterada)

3,5-Diprenil-p-hidroxi-cinamato de metilo