



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**COMPUESTOS ANALGÉSICOS Y ANTIINFLAMATORIOS DE *Scaphyglottis livida* (LINDLEY)  
Schltr (Orchidaceae)**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS**

PRESENTA

Q. F. B. JUAN FRANCISCO PALACIOS ESPINOSA



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
AÑO: 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

|                  |                                    |
|------------------|------------------------------------|
| PRESIDENTE       | Dr. Leovigildo Quijano             |
| VOCAL            | Dr. Rafael Castillo Bocanegra      |
| SECRETARIO       | Dra. María Luisa Villarreal Ortega |
| PRIMER SUPLENTE  | Dr. José Pedraza Chaverri          |
| SEGUNDO SUPLENTE | Dra. María Eva González Trujano    |

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 124, EDIFICIO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de investigación se realizó mediante el apoyo otorgado a través de los proyectos CONACyT (C01-018) y DGAPA (PAPIIT IN 212005).

Al CONACyT, DGEP y SNI por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de maestría.

Al Biólogo Gustavo Carmona por la recolección e identificación del material vegetal utilizado en este estudio.

Al personal técnico de la USAI (Facultad de Química), Q. Georgina Duarte Lisci, Q.F.B. Marisela Gutiérrez y M. en C. Rosa Isela del Villar, por el registro de los espectros de masas, IR y RMN.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios durante la revisión del presente trabajo.

A la M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A las Dras. Myriam Arriaga Alba y Myrna Déciga Campos por la valiosa asesoría técnica brindada para la realización de los ensayos de inocuidad y eficacia.

Finalmente, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la mente creadora del presente proyecto de investigación, mi asesora, Dra. Rachel Mata Essayag. Gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

## **DEDICATORIAS**

**A toda mi familia, por todo el apoyo recibido en este tiempo.**

**Para mis padres, Sara y Francisco, por los consejos y regaños bien dados, por todo el cariño y la paciencia.**

**A mis hermanos, Lourdes, Jesús Alberto y Rafael, gracias por estar conmigo y hacer de cada día, el mejor.**

**A todos los amigos de la generación (que buenos tiempos aquellos), en especial a mis amiguitos que me acompañaron en el posgrado.**

**A los cuates del laboratorio 124, la aventura sigue chavos.**

**De todo corazón, para la Chabelita, siempre ahí, para darme un buen consejo o un jalón de orejas. Perdón por ser tan corto, pero creo que no necesito tantas palabras para decirte todo el aprecio hacia ti.**

**Para la Dra. Blanca, gracias por todo. A pesar de la presión que ejercí, siempre apoyándome. Muchas gracias.**

**Gracias al Dr. Siniestro, el cual espero que sea un gran investigador.**

**A mis maestras, Lupita y Gaby. Gracias por todo el apoyo y enseñanzas compartidas. Les deseo lo mejor en todos los proyectos que inicien.**

**Por supuesto, a la Dra. Myrna, por todo el apoyo y amistad brindados.**

---

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de Cuadros   | I         |
| Lista de Figuras   | III       |
| Lista de Diagramas   | V         |
| Resumen  |           |
| Abstract   |           |
| <b>I. ANTECEDENTES</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 La familia Orchidaceae   | 1         |
| 1.1.1 Importancia económica y etnomédica de la familia Orchidaceae   | 6         |
| 1.1.2 Orquídeas utilizadas en la medicina tradicional mexicana   | 10        |
| 1.2 Antecedentes etnobotánicos, farmacológicos y fitoquímicos de <i>S. livida</i>  | 11        |
| 1.3 Generalidades sobre el dolor   | 14        |
| 1.3.1 Mecanismos de nocicepción  | 16        |
| 1.3.2 Modelos animales para el estudio del dolor   | 23        |
| 1.4 Generalidades sobre el proceso inflamatorio  | 26        |
| 1.4.1 Inflamación aguda  | 27        |
| 1.4.2 Inflamación crónica  | 33        |
| 1.4.3 Inflamación: Modelos experimentales  | 33        |
| 1.4.3.1 Modelo del edema inducido con carragenina en ratas   | 35        |
| 1.5 Terapéutica de la inflamación y el dolor   | 36        |
| 1.6 Metabolitos de origen natural con propiedades antiinflamatorias y analgésicas  | 41        |
| 1.7 Pruebas de inocuidad   | 59        |
| 1.7.1 Ensayo de Ames   | 59        |
| 1.7.2 Toxicidad aguda: el método de Lorke  | 62        |
| <b>II. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA</b>   | <b>64</b> |
| <b>III. OBJETIVOS</b>  | <b>68</b> |
| <b>IV. PARTE EXPERIMENTAL</b>  | <b>69</b> |
| 4.1 Ensayos biológicos   | 69        |
| 4.1.1 Efecto antinociceptivo del extracto, fracciones y productos puros de la especie <i>S. livida</i> en ratones utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal | 69        |
| 4.1.1.1 Ensayo con el modelo de la placa caliente  | 69        |
| 4.1.1.2 Determinación del efecto antinociceptivo del gigantol (2) en presencia de L-NAME, glibenclamida y naloxona   | 70        |
| 4.1.1.3 Modelo del estiramiento abdominal  | 70        |
| 4.1.2 Determinación del potencial antiinflamatorio del extracto y compuestos puros aislados de <i>S. livida</i>  | 72        |
| 4.1.3 Determinación de la toxicidad aguda (DL <sub>50</sub> ) del extracto orgánico de <i>S. livida</i> de acuerdo al método de Lorke  | 73        |
| 4.1.4 Determinación del potencial mutagénico del extracto orgánico de <i>S. livida</i> y el gigantol (2) en la prueba de Ames  | 74        |



---

|   |     |
|---|-----|
| 4.2 Análisis fitoquímico  | 75  |
| 4.2.1 Análisis cromatográfico   | 75  |
| 4.2.2 Equipos utilizados para determinar las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas  | 76  |
| 4.2.3 Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>S. livida</i> .  | 76  |
| 4.2.3.1 Material vegetal  | 76  |
| 4.2.3.2 Obtención del extracto de <i>S. livida</i>  | 77  |
| 4.2.3.3 Fraccionamiento preliminar del extracto total   | 77  |
| 4.2.4 Aislamiento y purificación del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-9(11),25-dien-3-ona ( <b>77</b> )  | 77  |
| 4.2.5 Aislamiento e identificación de los bibencilos gigantol ( <b>2</b> ), batatasina III ( <b>14</b> ) y 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo ( <b>78</b> ) | 78  |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 81  |
| 5.1 Pruebas de inocuidad  | 81  |
| 5.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de <i>S. livida</i>  | 81  |
| 5.1.2 Evaluación del potencial mutagénico del extracto orgánico de <i>S. livida</i> y del gigantol ( <b>2</b> )   | 85  |
| 5.2 Pruebas de eficacia   | 85  |
| 5.2.1 Determinación del efecto antinociceptivo del extracto orgánico  | 88  |
| 5.2.1.1 Modelo de la placa caliente y estiramiento abdominal  | 88  |
| 5.2.2 Determinación del efecto antiinflamatorio del extracto orgánico   | 91  |
| 5.3 Determinación de los principios activos antiinflamatorios y antinociceptivos de los metabolitos mayoritarios de <i>S. livida</i>                              | 93  |
| 5.3.1 Caracterización de la 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (ciclobalanona) ( <b>77</b> )   | 94  |
| 5.3.2 Elucidación estructural del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo ( <b>78</b> )  | 97  |
| 5.3.3 Evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del gigantol ( <b>2</b> )  | 101 |
| 5.3.3.1 Caracterización del mecanismo de acción antinociceptivo del gigantol ( <b>2</b> ) en presencia de naloxona, L-NAME y glibenclamida                        | 101 |
| 5.3.4 Evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del triterpenoide 24,24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol ( <b>19</b> )     | 103 |
| 5.3.5 Evaluación del efecto antinociceptivo de los fenantrenos <b>75</b> y <b>76</b>  | 109 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>   | 112 |
| <b>VII. PERSPECTIVAS</b>  | 113 |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>   | 114 |
| <b>ANEXOS</b>   | 136 |

---

## ABSTRACT

This work describes some parameters of efficacy and innocuity of the medicinal orchid *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr, widely used in Veracruz to cure stomachaches.

An organic extract CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) was tested for its antinociceptive effect using two experimental models in mice; the hot plate and acetic acid tests. The organic extract (100, 300 and 600 mg/Kg, *per os*) significantly reduced the nociception induced by acetic acid intraperitoneal injection. The extract also significantly increased the latency time of mice licking or jumping in the hot plate test. Metamizol (50-100 mg/Kg, *per os*) and morphine (2.5-5 mg/Kg, *i.p.*) were used as positive controls. The anti-inflammatory effect of the organic extract was assayed in the carrageenan-induced edema test (100, 300 and 600 mg/Kg, *per os*). The results revealed that the extract significantly reduced the carrageenan-induced edema in rat paw, indomethacin (10 mg/Kg, *per os*) was used as positive control.

The possible toxicity of the extract was assayed using Lorke and Ames tests. The results indicated that the extract is not toxic.

Three stilbenoids and two triterpenoids were isolated from the active extract. These compounds were characterized as gigantol (**2**), batatasin III (**14**), 3,4'-dihydroxy-3',4,5-trimethoxybibenzyl (**78**), 5 $\alpha$ -lanosta-24,24-dimethyl-9(11),25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**) and cyclobalanone (**77**), by spectral means and/or comparison with authentic samples. The stilbenoid **78** is a new natural product and triterpene **77** is newly described in the species.

---

Gigantol (**2**) and  $5\alpha$ -lanosta-24,24-dimethyl-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**) were evaluated for its antinociceptive and anti-inflammatory activities. The results showed that both compounds possess significant anti-inflammatory and analgesic effects.

The antinociceptive effect of gigantol (**2**) was antagonized by naloxone, a non specific opioid antagonist, in the hot plate model. However the antinociceptive effect was not modified by previous treatment of the animals with L-NAME and glybenclamide. The results suggested that the mode of action of gigantol (**2**) could involve an activation of the opioid receptors.

Finally, the phenanthrenes fimbriol A (**75**) (25-100 mg/Kg, *per os*.) and erianthridin (**76**) (25-100 mg/Kg, *per os*), isolated from *Maxillaria densa*, were also tested as antinociceptive agents. Both compounds displayed significant antinociceptive effect when tested in mice using the acetic acid-induced abdominal constriction and hot plate models.

---

## RESUMEN

La presente investigación describe algunos parámetros de identidad, eficacia e inocuidad de la orquídea medicinal *Scaphyglottis livida* (Lindley) Schltr, ampliamente utilizada en la región de los Tuxtlas, Estado de Veracruz, para el tratamiento de desórdenes estomacales.

Los ensayos de eficacia consistieron en la evaluación de los efectos antinociceptivo y antiinflamatorio de un extracto orgánico CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de la planta entera de *S. livida*. La actividad analgésica se determinó utilizando los experimentos de la placa caliente y estiramiento abdominal en ratones, mientras que el efecto antiinflamatorio se estableció mediante la prueba del edema plantar inducido con carragenina en ratas. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el extracto en el intervalo de dosis comprendido entre 100 y 600 mg/Kg posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias significativas.

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo permitió el aislamiento de tres estilbenoides de tipo bibencilo [batacina III (**14**), gigantol (**2**) y 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (**78**)] y dos triterpenos de tipo lanostano [24,24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (**77**)]. La elucidación estructural de todos los productos se realizó mediante la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Cabe destacar que el producto **78** representa un producto natural novedoso.

---

Los compuestos mayoritarios **2** y **19** presentaron propiedades analgésicas y antiinflamatorias importantes comparables a las de la morfina (2.5-5 mg/Kg, i.p.) y el metamizol (50-100 mg/Kg, *per os*), respectivamente.

Por otra parte, los parámetros de inocuidad evaluados consistieron en la determinación de la toxicidad aguda y el efecto mutagénico de un extracto orgánico íntegro. Los resultados indicaron que el extracto de la planta no es tóxico ni genotóxico.

De manera adicional, se evaluó las propiedades antinociceptivas de dos estilbenoides de tipo fenantreno aislados de la especie relacionada *Maxillaria densa* (Lindley), ambos compuestos **75** y **76** presentaron actividad analgésica significativa en los dos modelos de prueba.

Por último, con el objetivo de establecer el posible mecanismo de acción del gigantol (**2**), se realizó su evaluación farmacológica en el modelo de la placa caliente en presencia de naloxona, L-NAME y glibenclamida. Estas evaluaciones permitieron establecer que el efecto antinociceptivo del estilbenoide **2** podría involucrar una interacción con receptores opioides.

## **I. ANTECEDENTES**

### **1.1 LA FAMILIA ORCHIDACEAE**

La familia Orchidaceae es probablemente una de las más grandes del reino vegetal, y de acuerdo con Atwood (1986) incluye alrededor de 19,000 especies agrupadas en cinco subfamilias, nueve tribus y 800 géneros (Dressler, 1981; Dressler, 1993; Mcvaugh, 1985). El 73 % de las especies de orquídeas son epífitas y tienen por hábitat los trópicos, especialmente la montaña tropical en alturas de 1,000 a 2,000 metros sobre el nivel del mar. El resto de las especies pueden ser terrestres, semiacuáticas o saprofíticas (Dressler, 1993).

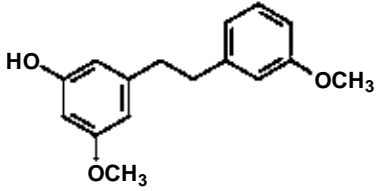
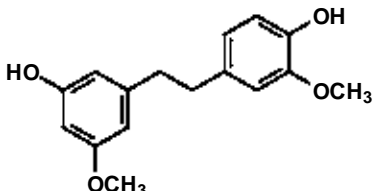
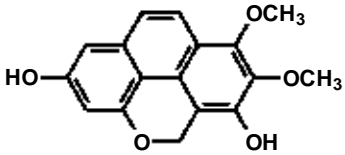
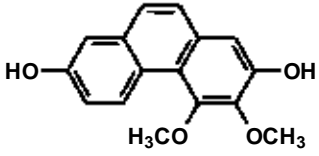
Las epífitas son plantas que, sin raíces en el suelo, crecen sobre plantas hospederas, por lo general árboles. A diferencia de los muérdagos hemiparásitos de las familias Lorantáceas y Viscáceas, las epífitas no tienen contacto directo con los haces vasculares de sus hospederos y no extraen agua ni nutrientes de ellos. Por eso, en general, estas plantas no son dañinas para su anfitrión, aunque son falsamente llamadas “parásitas”. Las principales ventajas de esta forma de vida es evitar la sombra del sotobosque y de los bosques húmedos y densos, además de evadir la competencia con las raíces de los árboles, arbustos y hierbas que crecen en el mismo hábitat.

En México, las orquídeas se distribuyen principalmente en cuatro estados: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guerrero. Otros estados con una cifra considerable

de especies son: Morelos, México, Michoacán y las regiones bajas de Puebla y San Luis Potosí (Hietz y Hietz-Seifert, 1994).

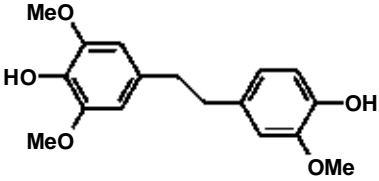
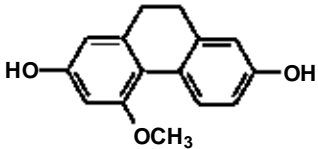
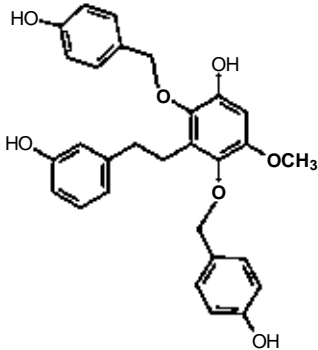
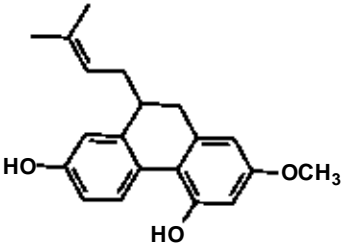
Desde el punto de vista fitoquímico, las orquídeas han sido objeto de numerosos estudios, los cuales han resultado en el aislamiento de metabolitos con diferentes esqueletos entre los que destacan alcaloides de los tipos picrotoxano, pirrolizidínico y fenilalquilamina (Slaytor, 1977; Okamoto *et al.*, 1966; Onaka *et al.*, 1965), triterpenoides de los tipos cicloartano y lanostano (Kikuchi *et al.*, 1981, 1985; Kadota *et al.*, 1987), flavonoides (Williams *et al.*, 1994; Williams, 1979), cumarinas (Wrigley, 1960), compuestos aromáticos simples (Harborne *et al.*, 1994; Bergstrom *et al.*, 1992) y estilbenoides (Yamaki *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1988; Miyazawa *et al.*, 1997; Sachdev y Kulshreshtha, 1986; Kong *et al.*, 2003; Baxter, 1994; Takagi *et al.*, 1983; Tezuka *et al.*, 1990; Estrada *et al.*, 1999a, 1999b, 2004; Hernández-Romero *et al.*, 2004), siendo este último grupo el más característico. Muchos de estos estilbenoides aislados de orquídeas han presentado importantes actividades biológicas. En el Cuadro 1 se presentan algunos ejemplos selectos de estilbenoides bioactivos.

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae.

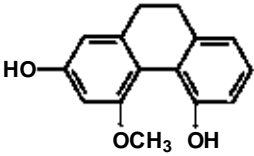
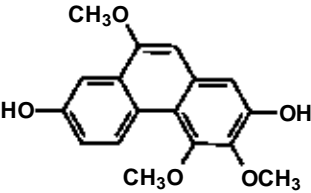
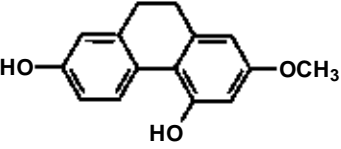
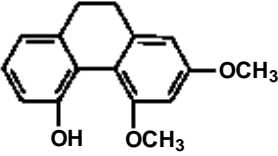
| Especie   | Metabolito   | Propiedades  |
|---|--|--|
| <p><i>Coelogyne ovalis</i></p>  |  <p>3'-O-metilbatatasina III (1)</p> | <p>Antibacteriano contra <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Yamaki <i>et al.</i>, 1989)</p>                                   |
| <p><i>Bulbophyllum vaginatum</i><br/><i>Lusia volucris</i><br/><i>Catasetum barbatum</i><br/><i>Dendrobium nobile</i></p> |  <p>Gigantol (2)</p>                 | <p>Antiinflamatorio (Shimizu <i>et al.</i>, 1988)<br/>Antimutagénico (Miyazawa <i>et al.</i>, 1997)<br/>Fitotóxico (Hernández <i>et al.</i>, 2005)</p> |
| <p><i>Coelogyne ovalis</i><br/><i>Coelogyne cristata</i></p>  |  <p>Coelogina (3)</p>               | <p>Espasmolítico, bloqueador de canales de Ca<sup>2+</sup> en íleon de cobayo (Sachdev y Kulshreshtha, 1986)</p>                                       |
| <p><i>Eria convallarioides</i><br/><i>Eulophia nuda</i><br/><i>Oncidium cebolleta</i></p>                                 |  <p>Nudol (4)</p>                   | <p>Antiinflamatorio, inhibidor específico no competitivo de las contracciones inducidas por histamina (Shimizu <i>et al.</i>, 1988)</p>                |



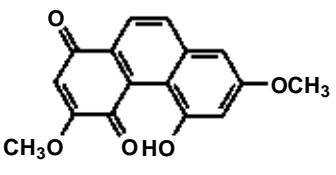
**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae (Cont.).

| Especie  | Metabolito  | Propiedades   |
|--|---|---|
| <p><i>Dendrobium loddigessi</i><br/><i>Dendrobium nobile</i></p>                                 |  <p>Aloifol II ( Moscatilina) (5)</p>  | <p>Inhibidor de la agregación plaquetaria<br/>(Kong <i>et al.</i>, 2003)<br/>Antimutagénico<br/>(Miyazawa <i>et al.</i>, 1999)<br/>Fitotóxico<br/>(Hernández <i>et al.</i>, 2005)</p>   |
| <p><i>Orchis militaris</i><br/><i>Agrostophyllum callosum</i><br/><i>Spiranthes sinensis</i></p> |  <p>Orcinol (6)</p>  | <p>Antifúngico contra el moho<br/><i>Candida lipolytica</i>,<br/><i>Phytophthora infestans</i> y<br/><i>Monilinia fructicola</i><br/>(Baxter, 1994)</p>   |
| <p><i>Bletilla striata</i></p>   |  <p>3,3'- dihidroxi-5-metoxi-2,6-bis-<br/>(p-hidroxibencil)bibencilo (7)</p> | <p>Antibacteriano contra <i>Bacillus subtilis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>Nocardia gardneri</i> y <i>Staphylococcus aureus</i><br/>(Takagi <i>et al.</i>, 1983)</p>   |
| <p><i>Spiranthes sinensis</i></p>  |  <p>Espirantol-A (8)</p>   | <p>Antibacteriano contra <i>B. subtilis</i>, <i>B. cereus</i>, <i>N. gardneri</i> y <i>S. aureus</i><br/>Antifúngico contra <i>Candida albicans</i> y <i>Trichophyton mentagrophytes</i><br/>(Tezuka <i>et al.</i>, 1990)</p> |

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae (Cont.).

| Especie   | Metabolito  | Propiedades  |
|---|---|--|
| <i>Loroglossum hircinum</i>   |  <p>Hircinol (9)</p>         | Antifúngico contra <i>Aspergillus niger</i> (Baxter, 1994)   |
| <i>Maxillaria densa</i>   |  <p>Gimnopusina (10)</p>     | Actividad fitotóxica (Valencia-Islas <i>et al.</i> , 2002)   |
| <i>Dendrobium plicatile</i><br><i>Lusia indivisa</i><br><i>Bletilla striata</i> |  <p>Lusiantridina (11)</p> | Antitumoral en ratón, agente citotóxico <i>in vitro</i> (A-549, SK-DV-3 y HL-60 leucemia humana) (Lee <i>et al.</i> , 1995)<br>Fitotóxico (Hernández <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Loroglossum hircinum</i>   |  <p>Loroglosol (12)</p>    | Antifúngico contra <i>Phytophthora infestans</i> (Baxter, 1994)  |

**Cuadro 1.** Ejemplos selectos de estilbenoides bioactivos aislados de la familia Orchidaceae (Cont.).

| <b>Especie</b>           | <b>Metabolito</b>   | <b>Propiedades</b>                        |
|--------------------------|---|---|
| <i>Dendrobium nobile</i> | <br>Denbinobina (13) | Antitumoral<br>(Lee <i>et al.</i> , 1995) |

### 1.1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ETNOMÉDICA DE LA FAMILIA ORCHIDACEAE

Debido a la belleza de sus flores varias especies de orquídeas son utilizadas como plantas de ornato, como por ejemplo las especies del género *Phalaenopsis* (Hietz y Hietz-Seifert, 1994; Tatsuzawa *et al.*, 1997). Muchas otras especies tienen relevancia en las industrias cosmética y de alimentos por sus aceites esenciales que les confieren propiedades aromáticas, tal es el caso de la especie *Vanilla planifolia*. Asimismo, algunas culturas orientales utilizan los tubérculos de especies del género *Orchis* para la producción de harinas con propiedades reconstituyentes y analépticas (Stoessl y Arditti, 1984). En países como la India, Turquía y el Tibet, especies del mismo género se agregaban a los vinos como alimento y por sus supuestas propiedades afrodisíacas (Zimmemann, 1959).

En la medicina tradicional de muchas regiones del planeta ciertas orquídeas se utilizan por sus propiedades curativas. Por ejemplo, las flores de la especie *Angracum fragans* se emplean en la medicina tradicional por sus propiedades sedantes, diaforéticas, digestivas y expectorantes (Zimmemann, 1959). Algunas especies del género *Cattleya* se utilizan para el tratamiento de la hipotensión por su alto contenido en tiramina. Las raíces de *Cypripedium reginae*, también conocida como valeriana americana, son utilizadas en América del Norte por sus propiedades tranquilizantes (Stoessl y Arditti, 1984). En el género *Dendrobium* encontramos varias especies con propiedades curativas, de estas destacan dos: *D. nobile* y *D. loddigensi*. La primera especie se emplea en la China desde tiempos ancestrales como tónico y antipirético, así como, para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y anorexia (Onaka *et al.*, 1965; Miyazawa *et al.*, 1997). También forma parte de la droga china “Shih-hu” empleada para tratar la dismenorrea, el reumatismo, la impotencia y la leucorrea. El “Shih-hu” es apreciado como tónico y por la creencia de que imparte la longevidad a sus consumidores (Kong *et al.*, 2003). Por último se comprobó que el extracto metanólico de *D. nobile* posee actividad antimutagénica (Miyazawa *et al.*, 1997, 1999), y los principios responsables del efecto fueron caracterizados como los bibencilos gigantol (2) y moscatilina (Aloifol II) (5).

*D. loddigensi* ha sido objeto de varios estudios fitoquímicos y farmacológicos; algunos compuestos aislados de esta planta como la

moscatilina (5), la moscatina y el diacetato de moscatilina inhiben la agregación plaquetaria inducida por el ácido araquidónico o el colágeno. Otros estudios farmacológicos comprobaron que los alcaloides shihunidina y shihunina, presentes también en la especie, son potentes inhibidores de la actividad de la enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa aislada de riñón de rata (Kong *et al.*, 2003).

*Gastrodia elata* es otra orquídea medicinal ampliamente utilizada en la región del Tibet, Corea, Japón y China como alimento. Además, el rizoma se utiliza en China para aliviar dolores de cabeza. Los tubérculos y el rizoma (cocidos o secos) se utilizan, con el nombre de “tienma”, para el tratamiento de la migraña, reumatismo, parálisis, convulsiones infantiles, fiebre, entre otras numerosas afecciones (Noda *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2003); en Corea, los tubérculos de la especie se utilizan para el tratamiento de desórdenes nerviosos, para prevenir el resfriado común y como tónico. En Taiwán, la planta se recomienda para fortalecer el sistema nervioso debilitado y aliviar los dolores de cabeza, en tanto que los japoneses la utilizan para el vértigo, dolor de cabeza y enfermedades nerviosas. Recientemente, varias pruebas farmacológicas han demostrado las propiedades sedantes y analgésicas del extracto crudo; por otro lado, el extracto ocasionó un incremento en el flujo sanguíneo del corazón y cerebro, disminuyendo así la resistencia de los vasos sanguíneos (Wu *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1995). Por último, Wu y colaboradores demostraron que el extracto acuoso posee actividad antioxidante y secuestradora de radicales libres, mientras que el extracto

metanólico tiene poco efecto sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Wu *et al.*, 1996).

Otra orquídea usada en la medicina tradicional China es *Bletilla striata*, también conocida como “Daichi” o “Baiji”. Los tubérculos de esta planta se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis, úlceras gástricas y duodenales, así como también para mejorar la piel agrietada en pies y manos (Kong *et al.*, 2003). En China, Mongolia y Japón se utiliza para la purificación de la sangre y fortalecimiento de los pulmones; también es de utilidad para el tratamiento de abscesos, tumores malignos, cáncer de mama, flatulencias, dispepsia, disentería, fiebre, úlceras malignas, desórdenes gastrointestinales, hemorroides, malaria, enfermedades de los ojos, algunas micosis, tos, dolor de pecho, sangrados internos, inflamación y como agente expectorante. Un preparado a base de las raíces de la planta mezcladas con aceite se aplica de manera tópica para aliviar quemaduras y enfermedades de la piel, así mismo, la planta entera es apreciada para curar leucorrea, tos purulenta y como tónico (Kong *et al.*, 2003). *Nervilia purpurea*, conocida en Taiwán como “I-Tiam-Hong”, se utiliza para el tratamiento de heridas y la hipertensión. *N. aragoana*, en cambio, se emplea para curar enfermedades pulmonares y la hipertensión (Kikuchi *et al.*, 1985a, 1985b). Finalmente, los tubérculos de *Pleione bulbocodioides* (“Shan ci-gu”) son efectivos para el tratamiento de tumores en China (Bai *et al.*, 1996 y 1997; Kong *et al.*, 2003).

### **1.1.2 ORQUÍDEAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA**

En México, varias orquídeas son apreciadas también por sus propiedades medicinales. Así por ejemplo, de acuerdo al primer libro de América sobre plantas medicinales, el Códice De la Cruz-Badiano, la vainilla era utilizada para el tratamiento de la histeria, fiebres, impotencia y reumatismo.

En la actualidad *Encyclia citrina* es apreciada para el tratamiento de heridas mientras que *Laelia autumnalis* para aliviar la tos; *Stanhopea hernandezii* se utiliza para tratar la insolación y las especies *Arpophyllum spicatum*, *Bletia catenulata*, *Cranichis speciosa* y *Epidendrum pastoris* para curar la disentería (Nageswara, 2004).

Otra orquídea utilizada en rituales curativos es *Oncidium cebolleta* ya que los indios Tarahumaras de Chihuahua la emplean como agente alucinógeno en sustitución de peyote o “hikuri” (*Lophophora williamsii*) durante sus ceremonias mágico-religiosas (Stermitz *et al.*, 1983).

La especie *S. livida*, objeto del presente estudio, y *Maxillaria densa* se utilizan ampliamente en la región de los Tuxtlas para aliviar dolores de estómago. Los aspectos etnomédicos de la especie *S. livida* se describirán con mayor detalle en el siguiente inciso.

## 1.2 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS, FARMACOLÓGICOS Y FITOQUÍMICOS DE *Scaphyglottis livida*

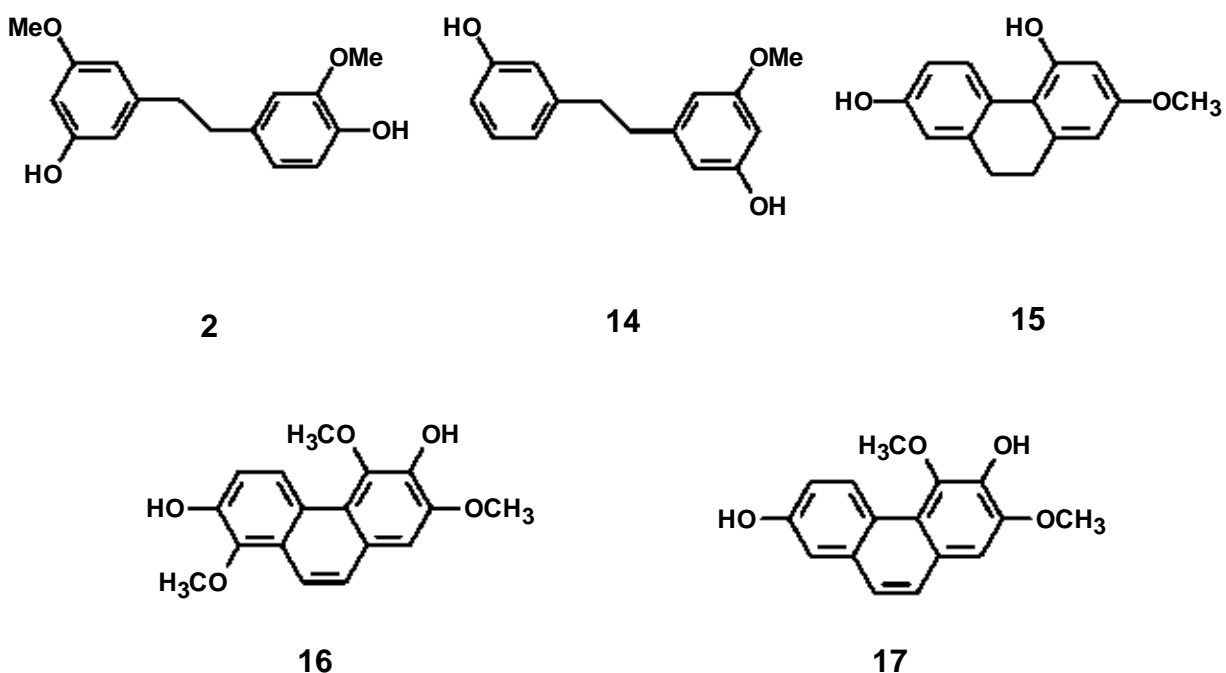
*S. livida*, es una planta erecta, con tallos de 2 a 3 veces ramificados. Sus ramas poseen un pseudobulbo fusiforme, delgado, costado, hasta de 10 cm de largo, 8 mm de diámetro y dos hojas. Las hojas son angostas, lineales, de 4 a 12 cm de largo, 3 a 4 mm de ancho y ápice retuso. Las flores son escasas en el pseudobulbo terminal, con pequeños ovarios cortos, verdoso-crema con líneas violetas, pétalos y sépalos de aproximadamente dos mm de largo. *S. livida* crece tanto en la selva alta como en los bosques (seco premontano y mesófilo de montaña), entre los 600 y 1500 m de altura.

*S. livida* se distribuye ampliamente en México (principalmente en los Estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca y Guerrero), Guatemala y Honduras. Los habitantes de la región de los Tuxtlas, Veracruz, la designan con el nombre vulgar de “parásita” y emplean la planta entera para el tratamiento de heridas, para evitar el aborto, como repelente de insectos y para el tratamiento de cólicos estomacales (Carmona, 1995). Desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, esta especie ha sido objeto de varios estudios que han validado parcialmente su uso para el tratamiento de cólicos estomacales. Así, un estudio realizado por Estrada y colaboradores (1999b) permitió comprobar que el extracto CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1) provoca una disminución en el tono y la amplitud de las contracciones



espontáneas del íleon de rata; el estudio fitoquímico biodirigido de un extracto espasmolítico activo permitió el aislamiento de una serie de estilbenoides espasmolíticos [gigantol (**2**), batasina III (**14**), coelonina (**15**), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**16**) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**17**)] (Estrada *et al.*, 1999b) y los triterpenoides [ $5\alpha$ -lanosta-24(S)-metil-9(11),25-dien-3 $\beta$ -ol (**18**),  $5\alpha$ -lanosta-24,24-dimetil-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**), 9,19-ciclolanosta-24,24-dimetil-25-en-3 $\beta$ -il *trans*-*p*-hidroxicinamato (**20**) y cicloneolistol (**21**)] (Estrada *et al.*, 2001). Las estructuras de estos compuestos se ilustran en las Figuras 1 y 2.

**Figura 1.** Estilbenoides espasmolíticos de *S. Livida*.





### **1.3 GENERALIDADES SOBRE EL DOLOR**

El dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular que se puede experimentar de manera cotidiana (Teixidor y Massó, 1997). En esta experiencia, se combinan mecanismos neurofisiológicos, psicológicos, de comportamiento y culturales. En síntesis, el dolor es un problema multidimensional, psicofísico y sociocultural, por ello quizás Aristóteles lo definió como un estado de “sufrimiento del alma”.

El dolor es afectado por varios factores como son: las emociones, el medio ambiente, el estado afectivo, la experiencia previa, factores socioculturales, y acondicionamiento previo, entre otros. Es importante señalar que el dolor es la causa más común de estrés psíquico y fisiológico, y el motivo más usual para buscar atención médica. Asimismo, es el factor más importante de ausentismo laboral, incapacidad y pensión por invalidez.

Como la experiencia del dolor y la capacidad para tolerarlo varia entre los individuos y las circunstancias, se optó por acuñar el término neurofisiológico de nocicepción (Forth y Martín, 1995). Se denomina nocicepción a la detección de estímulos (ya sea térmicos, mecánicos, eléctricos y químicos) y sus consecuencias inmediatas (Yaksh, 1997). Estos estímulos se transmiten por las fibras periféricas sensitivas que llegan a la médula espinal y de ésta al tronco cerebral (Teixidor y Massó, 1997).

El dolor está determinado por dos componentes: uno discriminativo sensorial, relacionado con la intensidad específica y con la localización del estímulo efectivo; y otro, afectivo-motivacional, a través del cual se percibe el ambiente definido y complejo conductual atribuido a las emociones y ansiedad (Yaksh, 1997).

El dolor puede ser persistente o crónico. El primero caracteriza a muchas enfermedades y es la razón principal por la que un paciente acude al médico, mientras que el dolor crónico parece no tener ningún propósito útil y tan solo sirve para hacer miserable la vida del paciente. A su vez, los dolores persistentes pueden dividirse en dos categorías, los nociceptivos y los neuropáticos.

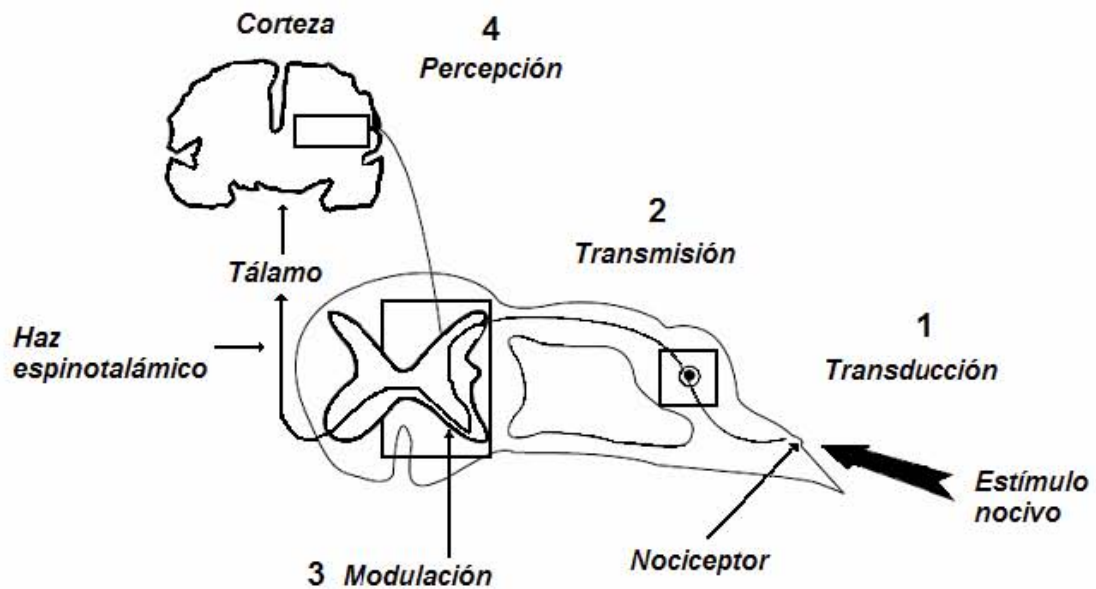
Los primeros son el resultado de la activación directa de nociceptores de la piel o de los tejidos blandos en respuesta a una lesión tisular. Por lo general, aparecen como acompañantes de una inflamación. Como ejemplos se tienen los dolores ocasionados por esguinces, cólicos, distensiones musculares, artritis, y aquellos asociados a tumores cancerosos que invaden los tejidos blandos. Los tres primeros padecimientos producen formas leves de dolor nociceptivo, mientras que el dolor ocasionado por los dos últimos es más intenso.

Los dolores neuropáticos se deben a la lesión directa de los nervios del sistema nervioso periférico o central, y a menudo producen una sensación de quemadura o de descarga eléctrica. Estos se presentan en casos de diabetes, síndromes de distrofia simpática refleja y de neuralgia

postherpética, que es un dolor agudo que se presenta en algunos pacientes después de un ataque de herpes zóster o “culebrilla”.

### **1.3.1 Mecanismos de nocicepción**

Algunos autores describen a la nocicepción como la percepción de señales eléctricas en el sistema nervioso central (SNC), que se originan por la estimulación y activación de receptores sensoriales que son terminaciones nerviosas especializadas (nociceptor), localizados en la periferia y que nos informan acerca del daño en algún tejido. La nocicepción, como mecanismo electroquímico, comprende cuatro procesos fisiológicos ilustrados en la Figura 3 y son: la transducción, transmisión, modulación y percepción.

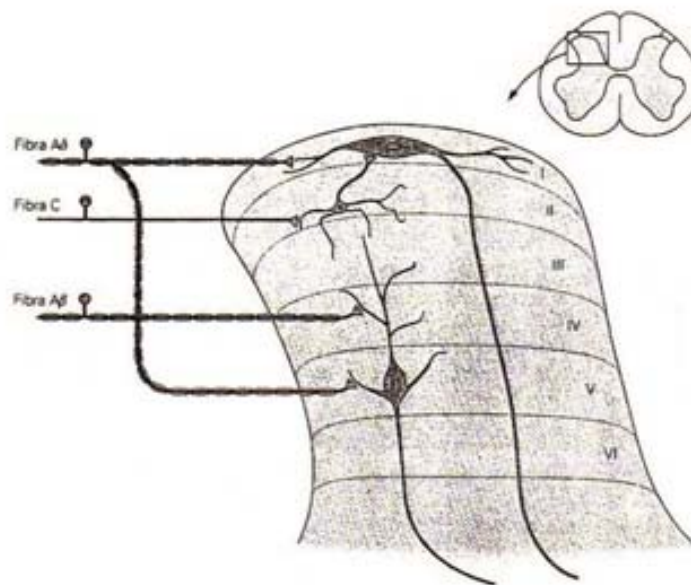


**Figura 3.** Procesos fisiológicos que participan en la percepción del dolor.

### ***Transducción y Transmisión***

La transducción es la conversión de los estímulos nocivos en señales eléctricas por las terminaciones nerviosas periféricas, en tanto que, la transmisión es la propagación de las señales eléctricas a lo largo de las vías nociceptivas (Figura 3). Los nociceptores tienen la capacidad de extraer la información generada por los estímulos y transformarla en potenciales de acción.

Tanto la transducción, como la transmisión de los estímulos generadores de dolor se llevan a cabo a través de diferentes tipos de fibras. Estas se clasifican de acuerdo a su grado de mielinización y la velocidad a la cual conducen los potenciales de acción en: (i) Fibras C, (ii) Fibras  $A\delta$ , (iii) Fibras  $A\beta$  (Figura 4).



**Figura 4.** Clasificación de las fibras nociceptivas encargadas de la transducción y la transmisión de los estímulos generadores de dolor.

La activación de fibras aferentes somáticas (que inervan piel, articulaciones y músculo esquelético) o viscerales (que inervan tejido cardiovascular, genitourinario, respiratorio y gastrointestinal) por estímulos mecánicos, térmicos, eléctricos o químicos, provocan la liberación local de mediadores que sensibilizan a los nociceptores y además facilitan el desarrollo del proceso de inflamación. Estos mediadores y sus efectos se indican en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos.

| <b>MEDIADOR</b> | <b>MECANISMO HIPERALGÉSICO</b>  | <b>REFERENCIA</b>                                       |
|-----------------|---|---|
| Bradiquinina    | Cuando actúa en el receptor B2 acoplado a PLC promueve la liberación de ácido araquidónico; que participa en la síntesis de prostaglandinas involucradas en la nocicepción. Además, en presencia de la serotonina y prostaglandinas, incrementa el influjo de calcio y la conductancia. Este efecto es de tipo sinérgico.   | Dray y Perkins, 1993, 1994<br>Millan, 1999              |
| Prostaglandinas | Las prostaglandinas de la serie E <sub>2</sub> e I <sub>2</sub> sensibilizan a los nociceptores periféricos. Las Prostaglandinas E <sub>2</sub> actúan sobre sus receptores EP <sub>1</sub> -EP <sub>4</sub> acoplados a proteínas G, incrementando los niveles de AMPc y en consecuencia la nocicepción. También tienen un efecto excitatorio directo al incrementar la conductancia al Na <sup>+</sup> en la neuronas sensoriales que liberan la sustancia P. | Ferreira y Nakamura, 1979<br>Nicol <i>et al.</i> , 1992 |

**Cuadro 2.** Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos (Cont.).

| MEDIADOR   | MECANISMO HIPERALGÉSICO   | REFERENCIA  |
|--|---|---|
| Serotonina   | Actúa sobre los receptores 5-HT <sub>2</sub> acoplados a proteínas G ocasionando el cierre de los canales de K <sup>+</sup> y el incremento de la descarga neuronal para que las neuronas sensoriales se activen. También puede sensibilizar a las neuronas, incrementar su excitabilidad vía AMPc y aumenta la inhibición de las fosfodiesterasas. | Fozard, 1984<br>Taiwo <i>et al.</i> , 1992                                    |
| Protones   | Activan los nociceptores y los sensibilizan a estímulos de tipo mecánico. Niveles bajos de pH ocasionan dolor e hiperalgesia asociada a inflamación.  | Steen <i>et al.</i> , 1992  |
| Oxido Nítrico  | Puede regular la actividad de la COX-II (producción de prostanoideos proinflamatorios), además también produce hiperalgesia por el aumento de GMPc.   | Salvemini <i>et al.</i> ,<br>1993<br>Duarte y Ferreira,<br>1992               |
| Adrenalina y Noradrenalina                                     | Estas catecolaminas estimulan las fibras aferentes. En axones aferentes dañados se encontró un aumento en los receptores α <sub>2</sub> – adrenérgicos.   | Sato y Perl, 1991   |
| Canales de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Ca <sup>++</sup> | Cuando hay daño en los axones y un incremento de los mediadores inflamatorios se incrementa la conductancia del Na <sup>+</sup> y Ca <sup>++</sup> y los canales de K <sup>+</sup> se cierran. Estos eventos contribuyen a la excitabilidad de la neurona.  | Devor <i>et al.</i> , 1993<br>Dolphin, 1990<br>Weinreich y<br>Wonderlin, 1990 |

Los potenciales de acción generados por el estímulo de los nociceptores son transmitidos a lo largo de los axones hacia el asta posterior de la médula espinal, luego se bifurcan y ascienden o descienden por el fascículo de Lissauer.



Las células marginales de Cajal reciben estas fibras con la información periférica nociceptiva (Forth y Martín, 1995).

De las fibras periféricas se liberan sustancias excitadoras como la sustancia P, el glutamato y el aspartato que hacen sinapsis con neuronas de relevo amplificando la transmisión del dolor; estas neuronas de relevo se concentran en una serie de vías localizadas preferentemente en el cordón anterior y anterolateral de la sustancia blanca.

La información nociceptiva puede ser modulada endógenamente a diferentes niveles. El mecanismo principal de modulación es a nivel supraespinal, en éste se activan sistemas que se dirigen hacia la médula espinal para contrarrestar la información de la periferia (Teixidor y Massó, 1997). A nivel supraespinal la sustancia gris periacueductal (SGPA), el núcleo de rafé magnus (NRM) y el locus coeruleus (LC) modulan la transmisión nociceptiva a nivel espinal (Forth y Martín, 1995). Estos sistemas están interconectados entre sí permitiendo que la activación de uno genere la actividad de otro (Benhbehani, 1995).

Existen tres familias de péptidos opioides estos son: la proopiomelanocortina (precursor de  $\beta$ -endorfinas); la proencefalina (precursor de las encefalinas) y la prodinorfina (precursor de dinorfina y péptidos relacionados); estos actúan en receptores específicos opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  (Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 1999). En la SGPA abundan los receptores opioides de tipo  $\mu$ ; cuando estos son activados por los opioides endógenos y exógenos se inhibe al sistema GABAérgico y se activan

las células de apagado “off-cells” localizadas en el NRM las cuales producen analgesia. Estas células de apagado permanecen inactivas por la actividad inhibitoria GABAérgica (Roering *et al.*, 1988).

Además de las células de apagado, en el NRM existen dos tipos más de células: células de encendido “on-cells” y células neutrales “neutral-cells”, mismas que se proyectan hacia el trigémino y médula espinal, a lo largo del funículo dorsolateral. Las neuronas “off-cells” tienen una influencia inhibitoria tónica sobre las aferentes nociceptivas de la médula espinal, mientras que las “on-cells” facilitan la respuesta de estas aferencias al estímulo nocivo (Fields *et al.*, 1991). Cuando las células de apagado son activadas hay liberación de 5-HT, la cual actúa en los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5HT<sub>3</sub> ocasionando la disminución de la excitabilidad de las fibras aferentes (Fields *et al.*, 1996).

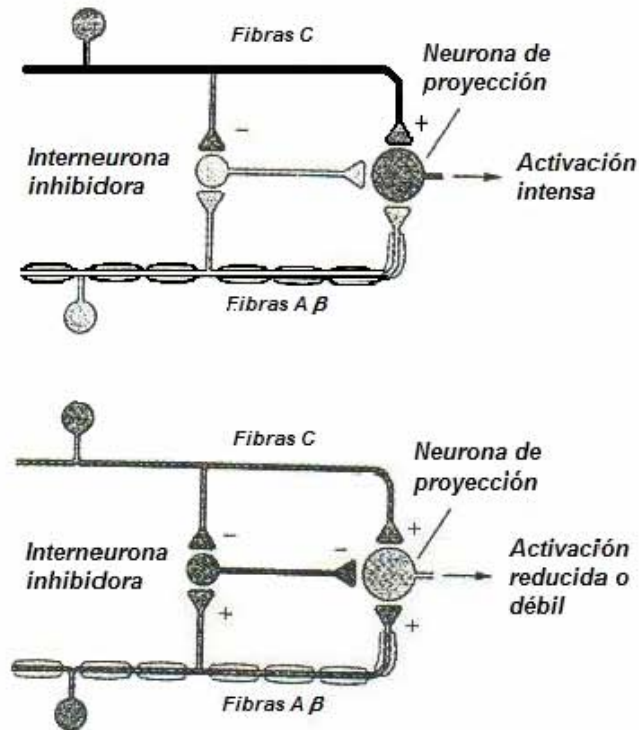
El LC es un sistema que se activa cuando la NA ocupa los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . En consecuencia se incrementa el umbral de actividad de las fibras C y la hiperpolarización de las fibras aferentes primarias, que trae como consecuencia una disminución de la liberación de la sustancia P. Este sistema se proyecta hacia la médula espinal para bloquear la información nociceptiva, debido a la actividad presináptica (Nance y Sawynok, 1987; Bensson, 1997).

### ***Modulación y Percepción***

Uno de los principales descubrimientos en la investigación del dolor es que el encéfalo tiene circuitos moduladores cuya principal función es regular la percepción del dolor. Hay varios sistemas moduladores o reguladores dentro del sistema nervioso central (SNC) que responden a estímulos nocivos. El sitio donde inicia la regulación está en la médula espinal, donde las interconexiones entre las vías aferentes nociceptivas y no nociceptivas pueden controlar la transmisión de información nociceptiva a centros superiores del encéfalo.

El mecanismo más estudiado de modulación del dolor es el de Compuerta de Control o Del Control Regulado. Este mecanismo, en palabras sencillas, implica el “cierre” de las fibras aferentes no nociceptivas, y la “apertura”, de las fibras aferentes nociceptivas, durante la transmisión de los potenciales nocivos. El mecanismo se centra en la interacción entre cuatro clases de neuronas en el asta posterior de la médula espinal: 1) fibras aferentes nociceptivas no mielínicas (fibras C); 2) fibras no nociceptivas mielínicas (fibras A $\beta$ ); 3) neuronas de proyección; e 4) interneuronas inhibitorias. La neurona de proyección es excitada tanto por neuronas nociceptivas como no nociceptivas. La neurona inhibitoria se activa espontáneamente y normalmente inhibe a la neurona de proyección, con lo que reduce la intensidad del dolor; esta neurona excitada por fibras no nociceptivas mielínicas, sin embargo, no es inhibida directamente por el nociceptor

no miélnico. Así pues, el nociceptor tiene efectos directos e indirectos sobre la neurona de proyección (Figura 5).



**Figura 5.** Teoría del control regulado, uno de los mecanismos para la modulación del dolor.

### 1.3.2 Modelos animales para el estudio del dolor

El estudio del dolor requiere de modelos que nos permitan obtener información útil para comprender la red de eventos involucrados en el proceso. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ha descrito varios modelos que

requieren el uso de animales. Básicamente, los modelos animales de dolor deben tratar de reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan el estudio de alternativas terapéuticas aplicables a la clínica o, al menos, el mejor conocimiento de las mismas. Las características de estos modelos son las siguientes:

- *Deben ser de utilidad clínica*
- *Deben ser cuantificables y reproducibles*
- *Deben estar validados y cumplir con determinados requerimientos de tipo ético*

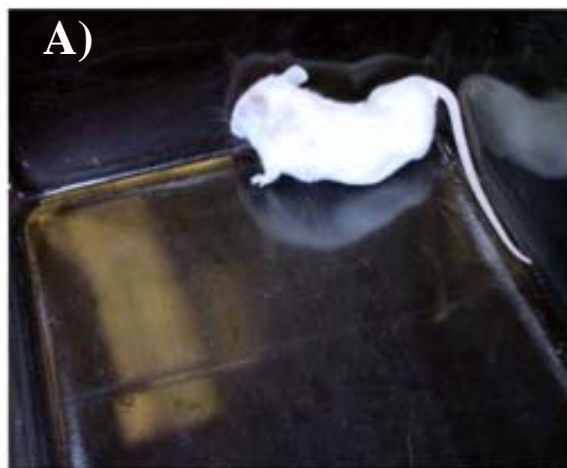
Dos de los modelos más utilizados son: el de retirada ante un estímulo térmico (modelo de la placa caliente) y el de estiramiento abdominal. Ambos modelos son de fácil implementación y detectan principalmente dolor agudo (Figura 4).

### ***MODELO DE RETIRADA ANTE UN ESTÍMULO TÉRMICO***

El animal, generalmente roedores (rata o ratón), se coloca dentro de un cilindro de plástico que está sobre una placa caliente (a temperatura constante,  $55 \pm 5$  °C) (Figura 6b). Este estímulo produce dos conductas (saltar o lamer sus patas traseras) que pueden medirse en términos de tiempo de reacción. Este modelo es comúnmente usado para identificar analgésicos que actúan a nivel del SNC (Eddy y Leimbach, 1953).

**MODELO DE ESTIMULACIÓN QUÍMICA: ESTIRAMIENTO ABDOMINAL**

En este modelo el animal (normalmente roedores) responde al dolor que se genera en respuesta a un estímulo químico (Figura 6a). El método consiste en inyectar intraperitonealmente a los roedores una solución alrogénica (i.e. sol. diluída de ácido acético) y medir, en un periodo de tiempo, el número de estiramientos-contracciones provocados por el estímulo químico. El modelo permite detectar compuestos con actividad analgésica central y periférica; cabe señalar que este modelo ha sido objeto de críticas debido a que el estímulo químico no se considera natural (Koster *et al.*, 1959).



**Figura 6.** Modelos A) del estiramiento abdominal y B) la placa caliente.

#### **1.4 GENERALIDADES SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO**

La inflamación es una respuesta patológica/fisiológica fundamental diseñada para eliminar los estímulos nocivos, tanto exógenos (i.e. sustancias químicas, bacterias y virus) como endógenos (i.e. productos del sistema inmune), y reparar las lesiones provocadas por radiaciones y quemaduras, entre otros. La respuesta inflamatoria se encuentra entonces estrechamente relacionada con los procesos de reparación de tejidos (Clark y Jonson, 1995).

La inflamación y consecuente reparación de los tejidos pueden ser perjudiciales ya que comprenden una serie de respuestas como la fagocitosis del agente lesivo y su neutralización mediante la hipertrofia de la célula. Los signos clínicos que caracterizan a la inflamación son calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de la función (Robbins *et al.*, 1990).

La inflamación, en términos de su duración puede ser aguda o crónica, y por lo general conduce -al igual que el dolor- a una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada (Robbins *et al.*, 1990; Smith y Reinard, 1992).

La inflamación aguda tiene un periodo de duración relativamente corto, desde varios minutos hasta varias horas o días y, sus principales características son la acumulación de un exudado de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la migración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos, en el sitio de la lesión. Por otra parte, la inflamación crónica es menos uniforme y obviamente, de mayor

duración. Se asocia histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos y a la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo. Muchas de las respuestas celulares de la inflamación están mediadas por factores químicos generados por la acción del estímulo inflamatorio sobre el plasma o las células involucradas en el proceso inflamatorio (Smith y Reinard, 1992).

Los eventos del proceso inflamatorio tienen lugar en el tejido conectivo vascularizado, incluyendo el plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los componentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circulantes que tienen importancia en la inflamación son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son las cebadas, que están en íntima relación con los vasos sanguíneos, los fibroblastos, linfocitos y macrófagos del mismo (Clark y Jonson, 1995).

#### **1.4.1 Inflamación aguda**

El edema es una reacción inmediata y transitoria en la inflamación aguda que suele comenzar inmediatamente después del estímulo lesivo, alcanzando su máximo entre los 5 y 10 minutos, y desaparece entre los 15 y 30 minutos, si no existe otro estímulo, o si no se desencadenan otras respuestas. La inflamación se caracteriza por: (i) cambios en el flujo y el calibre vascular, (ii) cambios en la permeabilidad vascular y (iii) exudación leucocitaria.

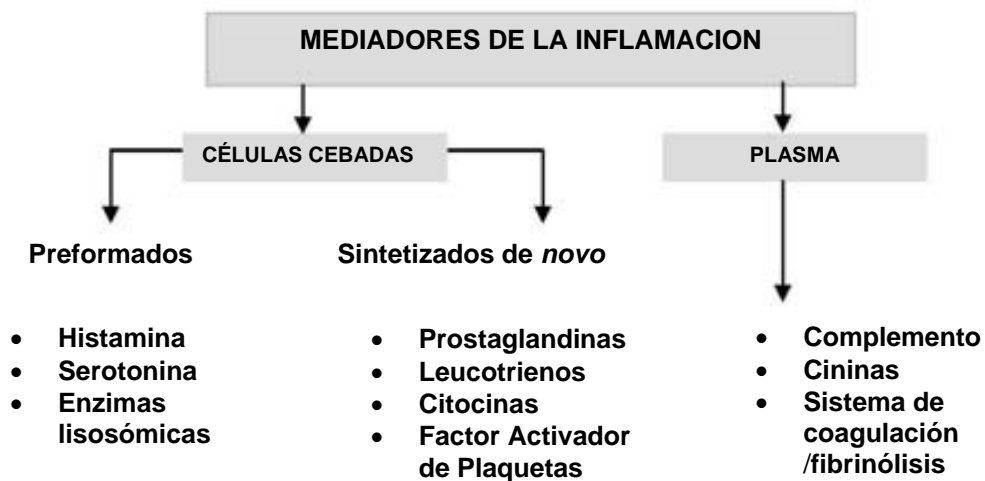


La respuesta inflamatoria es mediada inicialmente por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos, que son activados en fases consecutivas (Figura 7). La histamina y la serotonina son los mediadores químicos de la fase activa inmediata al incremento de la permeabilidad. En el hombre y en ciertos roedores, la histamina y la serotonina son producidas y almacenadas en los gránulos de las células cebadas, basófilos y plaquetas. Estas aminas producen vasodilatación e incremento en la permeabilidad vascular creando el edema, especialmente en vénulas (Crukhorn *et al.*, 1971). Los agentes físicos, las reacciones inmunes, los fragmentos del complemento C3a y C5a y los factores liberadores presentes en neutrófilos, monocitos y plaquetas, así como, la interleucina I (IL-1), producen la liberación de histamina y serotonina a partir de las células cebadas (Smith y Reinard, 1992).

Por otra parte, las proteasas plasmáticas que incluyen tres sistemas activos e interrelacionados entre sí, el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación o fibrinólisis, al igual que las aminas anteriormente mencionadas, poseen actividad vasoactiva y quimiotáctica que median el incremento en la permeabilidad vascular, el quimiotactismo sobre neutrófilos, eosinófilos y monocitos, la opsonización ante la fagocitosis y la lisis de microorganismos. Las anafilotoxinas del complemento C3a y C5a, además de incrementar la permeabilidad vascular y la liberación de histamina de las células cebadas y plaquetas, poseen otros mecanismos que incrementan la respuesta inflamatoria. El componente C5a también activa la vía de la lipooxigenasa para el

metabolismo del ácido araquidónico en neutrófilos y macrófagos (Figura 7) (Robbins *et al.*, 1990; Smith y Reinard, 1992).

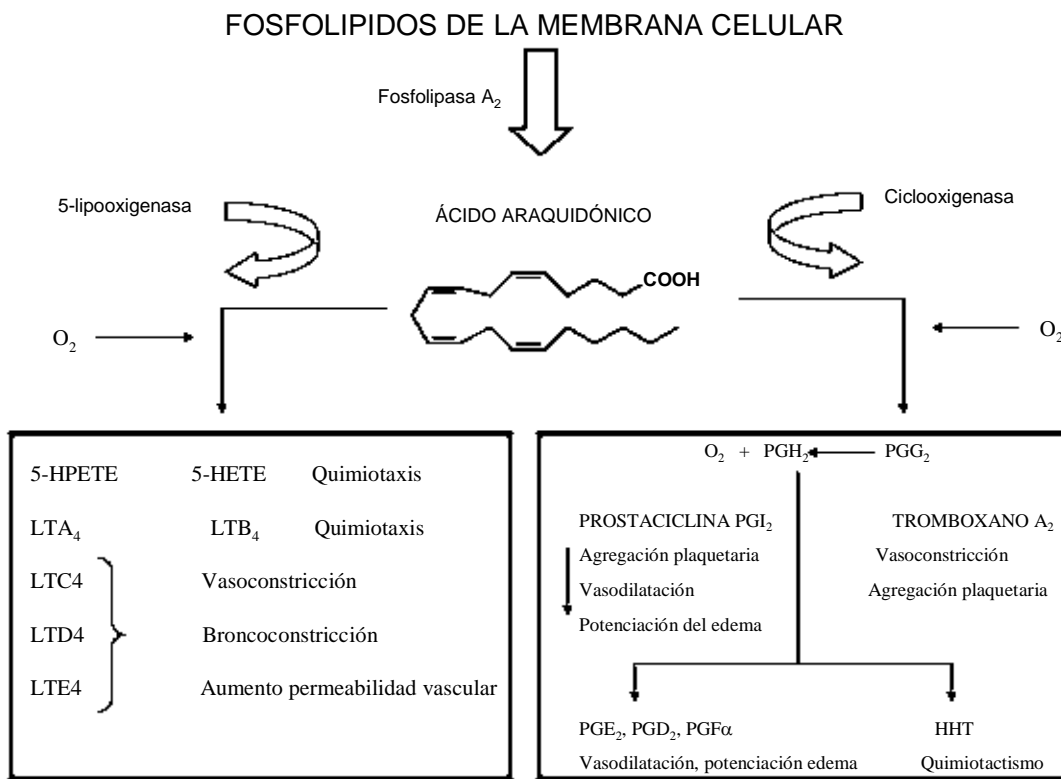
De igual manera, el sistema de las cininas da lugar a la formación de un péptido vasoactivo, la bradiquinina, un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular pero no posee actividad quimiotáctica. La bradiquinina se forma también a partir de la calicreína y el cininógeno, y tiene acción corta, ya que se inactiva por la enzima cininasa (Syntex, 1987).



**Figura 7.** Mediadores químicos involucrados en el proceso inflamatorio (Robbins *et al.*, 1990).

En lo que respecta a los mediadores sintetizados de *novo*, el ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico) es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, que deriva directamente de la dieta o

de una transformación del ácido linoleico. El ácido araquidónico se encuentra bajo la forma esterificada con los fosfolípidos de la membrana, particularmente en el carbono de la posición C-2 de la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol. Para que el ácido araquidónico sea utilizado por la célula para formar eicosanoides, tiene que ser liberado de los fosfolípidos, mediante activación de las fosfolipasas celulares por estímulos mecánicos, físicos y químicos, o por otros mediadores. El ácido araquidónico es metabolizado por dos vías principales: la vía lipooxigenasa y la vía ciclooxigenasa (Figura 8) (Dawson, 1987).



**Figura 8.** Cascada del ácido araquidónico (Jurlow *et al.*, 1996).

En la vía de la ciclooxigenasa (COX), el ácido araquidónico, es transformado rápidamente en el endoperóxido PGG<sub>2</sub> por acción de una ciclooxigenasa (COX-II). PGG<sub>2</sub> a su vez, es convertido enzimáticamente en PGH<sub>2</sub>. En esta conversión se genera un radical libre de oxígeno. La PGH<sub>2</sub> se puede transformar enzimáticamente en:

- Tromboxano A<sub>2</sub>, potente agregador plaquetario de vida media corta (seg) además de ser un potente vasoconstrictor. Se encuentra en plaquetas y otras células.
- Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), potente inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador, lo encontramos predominantemente en la pared vascular.
- Otras prostaglandinas (entre las más estables, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> y PGD<sub>2</sub>), que se encuentran en muchos tejidos, ejercen diversas acciones sobre el tono y la permeabilidad vascular.

La vía de la lipooxigenasa implica la conversión del ácido araquidónico en derivados hidroperóxidos (12-HPETE en plaquetas y 5-HPETE y 12-HPETE en los leucocitos). El 5-HPETE es metabolizado por diversas enzimas peroxidasas o por mecanismos no enzimáticos al ácido hidroxieicosatetraenoico (HETE), un potente estimulador quimiotáctico para los neutrófilos. El 5-HPETE también da lugar a los leucotrienos. El leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) es convertido en los leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y en leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>), en este último caso por acción del glutatión. LTB<sub>4</sub> es un

potente agente quimiotáctico que estimula la agregación de los leucocitos al endotelio vascular mientras que LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> producen vasoconstricción, broncoespasmo y un aumento en la permeabilidad vascular. De igual manera, los neutrófilos también producen metabolitos trihidroxilados del ácido araquidónico llamados lipoxinas (Robbins *et al.*, 1990). Otros agentes responsables de la inflamación son los constituyentes microsómicos y radicales libres de oxígeno (ROS), liberados a partir de neutrófilos, monocitos y macrófagos.

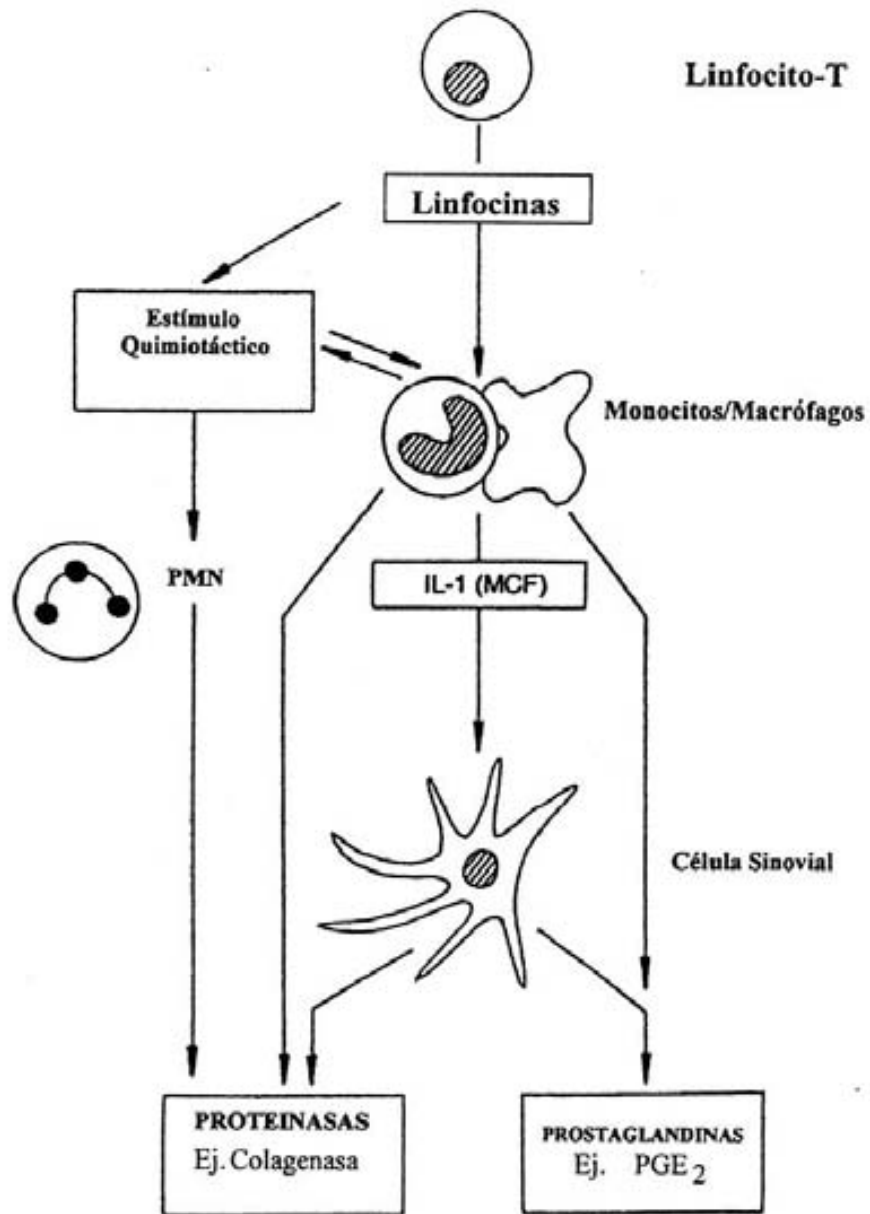
Estos agentes aumentan la permeabilidad, directamente o mediante la liberación de histamina de las células cebadas, son quimiotácticas para los monocitos e inhiben el movimiento de los neutrófilos y eosinófilos. Los constituyentes lisosómicos tienen, por lo tanto, numerosos efectos; si no es controlada, la infiltración leucocitaria inicial, se puede potenciar aún más el aumento de la permeabilidad vascular, la quimiotaxis y la lesión tisular. La influencia de los ROS, en una reacción inflamatoria, depende del equilibrio entre la producción e inactivación por las diferentes células y tejidos del organismo (Syntex, 1987; Smith y Reinard, 1992). La respuesta inflamatoria aguda puede evolucionar hacia una cura completa, o en casos muy severos el proceso puede progresar en dirección a una inflamación crónica.

### **1.4.2 Inflamación crónica**

La inflamación crónica se caracteriza por la destrucción del tejido y por la pérdida de la funcionalidad de la parte afectada; tiene una mayor duración que la inflamación aguda y puede generarse por varios factores, entre los que destacan: a) la persistencia del estímulo nocivo o alguna interferencia en la curación normal, caracterizada por la existencia de una destrucción tisular y pérdida de la funcionalidad de la parte afectada, b) la aparición de una inflamación aguda de manera repetida, es decir, ciclos de curación-lesión, como en el caso de varios padecimientos como la pielonefritis o colecistitis, por mencionar algunos (Figura 9).

### **1.4.3 Inflamación: Modelos experimentales**

La inducción de inflamación experimental en animales es el punto de partida usual para evaluar posibles agentes antiinflamatorios. Estos experimentos son variados y quizá el más utilizado es la prueba de inducción del edema en el cojinete plantar en rata. Dicho modelo puede ser adaptado de varias maneras usando diferentes agentes inflamatorios para mimetizar patologías como la inflamación y la artritis. De manera general, los modelos de inflamación en animales son de gran utilidad para evaluar fármacos potenciales y extractos vegetales con bastante fidelidad, de manera cuantitativa y eficaz (Cuadro 3).



**Figura 9.** Esquema de cooperación celular entre los linfocitos T, macrófagos y células sinoviales en la producción de la inflamación crónica (Tomado de Williamson *et al.*, 1996).

#### **1.4.3.1 Modelo del edema inducido con carragenina en ratas**

Sin lugar a duda, el modelo del edema inducido con carragenina en rata, es uno de los modelos más utilizado para evaluar agentes antiinflamatorios en el ámbito científico, esto debido a que presenta varias ventajas, entre las que destacan las siguientes:

- i. La carragenina es muy estable y la cantidad necesaria para provocar el efecto inflamatorio, sin ocasionar otros daños adicionales al animal de experimentación, se encuentra debidamente establecida.
- ii. El curso de la inflamación es similar a la presentada en el hombre
- iii. El ensayo es altamente reproducible
- iv. El ensayo permite la evaluación de manera cuantitativa de la inflamación, ya que la magnitud de la respuesta es proporcional a la concentración de prueba.

El mecanismo de acción de la carragenina ha sido ampliamente estudiado, sin embargo los resultados han sido controversiales, algunos autores mencionan que el edema es causado en una primera etapa por la liberación de histamina, serotonina y elementos del complemento y, en una segunda fase por la producción de prostaglandinas, bradiquinina y 5-hidroxitriptamina (5-HT), además de la presencia de leucocitos (Winter *et al.*, 1962; Crukhorn *et al.*, 1971).



## **1.5 TERAPÉUTICA DE LA INFLAMACIÓN Y EL DOLOR**

Los fármacos analgésicos constituyen un conjunto de compuestos heterogéneos desde el punto de vista estructural e incluyen fundamentalmente a los opioides naturales morfina y codeína y sus sucedáneos. Los alcaloides morfina y codeína se extraen del opio, látex producido por *Papaver somniferum* (Papaveraceae). Los derivados opiáceos sintéticos y semisintéticos más importantes son: la buprenorfina, el profadol, el propiran, la pentazocina, la nalbufina, la naloxona y la nalorfina. Los opiáceos se usan principalmente para el tratamiento del dolor agudo en especial el relacionado con el cáncer. La morfina es un alcaloide soluble en agua, poco soluble en medios no polares y es ampliamente utilizada para el tratamiento del dolor agudo, post-operatorio y severo (Christrup, 1997). La morfina actúa sobre los receptores  $\mu_1$  a nivel supraespinal y en  $\mu_2$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  a nivel espinal. A nivel supraespinal, la morfina activa la vía

**Cuadro 3.** Modelos de inflamación más utilizados para la evaluación de agentes antiinflamatorios potenciales.

| <b>INDUCTORES DE LA INFLAMACION</b>   | <b>ANIMALES DE PRUEBA</b>               | <b>TIPO DE PADECIMIENTO MIMETIZADO</b>  |
|---|---|---|
| <b>Agentes Físicos</b><br>-Dislocación  | Conejo                                  | Artrosis  |
| <b>Agentes Químicos</b><br>-Carragenina<br>-Sulfas<br>-Colesterol<br>-Caolín, dextran y formalina<br>-TPA (Ésteres de Forbol) | Rata<br>Rata<br>Conejo<br>Rata<br>Ratón | Artritis reumatoide<br>Artritis periartritis<br>Artritis<br>Artritis reumatoide<br>Dermatitis |
| <b>Agentes infecciosos</b><br>-Estreptobacilos<br>-Diploestreptococos<br>-Herpes simple                                       | Ratón<br>Rata<br>Conejo                 | Artritis reumatoide<br>Artritis reumatoide<br>Artritis  |
| <b>Agentes inmunógenos</b><br>-Complejos inmunes<br>-Adyuvantes<br>-Albúmina y levadura                                       | Cobayo<br>Rata<br>Rata                  | Artritis<br>Artritis reumatoide<br>Artritis reumatoide  |
| <b>Otros</b><br>-Papaína<br>-Enzimas hidrolíticas   | Conejo<br>Conejo                        | Artritis<br>Artritis reumatoide   |

descendente inhibitoria de la nocicepción, donde activa los receptores  $\mu$  localizados de manera abundante en la sustancia gris periacueductal (SGPA), ocasionando una inhibición en la liberación de ácido  $\gamma$  aminobutírico (GABA), que a su vez inhibe la activación de las células de apagado. La activación de estas células de apagado, localizadas en el núcleo de rafé magnus (NRM), desencadena mecanismos serotoninérgicos y noradrenérgicos hacia la médula espinal, bloqueando la nocicepción (Heinricher *et al.*, 1992; Heinricher y Morgan, 1999). De manera adicional, la morfina ejerce analgesia mediante la vía del sistema adrenérgico descendente, debido a la inhibición de la actividad neuronal en el líquido cefalorraquídeo (LC) por hiperpolarización de las neuronas presentes en este lugar. Esto ocasiona una disminución en la concentración de noradrenalina (NA) en el NRM y la consecuente inhibición en la liberación del GABA (Bodnar *et al.*, 1988; Nestler y Talla, 1987).

A nivel espinal, la morfina antagoniza las acciones de la sustancia P (SP), administrada de manera exógena, realizando acciones de carácter inhibitorio post-sináptico sobre las interneuronas y sobre las neuronas de salida del denominado haz espinotalámico, encargados de transmitir la información nociceptiva hacia el cerebro (Levine *et al.*, 1993).

A nivel periférico, la morfina, activa la vía L-Arg-ON-GMPc, donde la analgesia se produce por un aumento en los niveles de GMPc (Ferreira *et al.*, 1991; Duarte *et al.*, 1990), y por ocupación de los receptores  $\mu$  presentes en las

terminales periféricas, inhibiendo su excitabilidad y la propagación de los potenciales de acción. También el alcaloide provoca una inhibición en la liberación de neuropéptidos proinflamatorios dependientes de calcio, como la sustancia P (SP) (Stein *et al.*, 1999).

Cuando el dolor y la inflamación van uno de la mano del otro, como sucede en varios padecimientos, el tratamiento se basa en el empleo de los analgésicos-antiinflamatorios (AAI's) que incluyen dos grandes grupos de agentes terapéuticos: (i) los analgésicos-antiinflamatorios esteroideos (AAIE's) y los no esteroideos (AINE's). El segundo grupo incluye a los salicilatos, derivados de *p*-acetoaminofen, las pirazolonas, la indometacina y congéneres, los fenamatos, derivados del ácido propiónico y del piroxicam y los coxibs (Celecoxib, Rofecoxibs, etc) por mencionar los más relevantes. Los salicilatos tienen como prototipo estructural a la aspirina, que a su vez se originó de la salicina, glicósido del sauce blanco (*Salix alba*), utilizado en la terapéutica tradicional como antiinflamatorio y analgésico. Los AINE's derivados del ácido salicílico son el grupo de fármacos más ampliamente utilizado en la terapéutica del dolor y la inflamación.

En 1971, Vane demostró que la acción de los AINE's se debía a su capacidad de inhibir a la enzima COX y por lo tanto la síntesis de prostaglandinas y otros eicosanoides. Posteriormente, en la década de los 90's y a principios del siglo XXI se demostró la existencia de tres isoformas de dicha enzima: la COX-I, la COX-II y la COX-III (Fu *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1991).

La primera y la tercera son constitutivas. La COX-I interviene en respuestas fisiológicas tales como la citoprotección del estómago y la agregación plaquetaria y la COX-III está involucrada en la producción de la fiebre y el dolor a nivel central. La COX-II se expresa en células implicadas en la respuesta inflamatoria (macrófagos, monocitos, sinoviocitos) y está regulada por un amplio espectro de mediadores específicos de la inflamación, destacándose las prostaglandinas. Hoy día ha quedado plenamente demostrado que los salicilatos actúan sobre la COX-I y la COX-III, en tanto que el acetoaminofen, el ibuprofeno y la indometacina son más efectivos en contra de la COX-III.

Los salicilatos, a pesar de su eficacia, provocan efectos secundarios como daño a la mucosa gástrica, hemorragias en el estómago y disfunción plaquetaria, atribuibles a la supresión de la COX-I. Existen otros AINE's de amplio uso en la terapéutica que ejercen su efecto a través de la inhibición selectiva de la COX-II. Quizás los más efectivos, a pesar de su efecto cardiotóxico, son los coxibs.

Finalmente, existe otro grupo de compuestos como: la aspirina, el diclofenaco, la indometacina, el ibuprofeno, el naproxeno, el piroxicam, etc., que afectan indistintamente a las COX-I y II. Los antiinflamatorios esteroideos más importantes son los glucocorticoides (cortisol, cortisona, prednisolona, dexametasona, etc). Estos actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales una vez activados migran al núcleo induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta inflamatoria (Saklatvala, 2002).

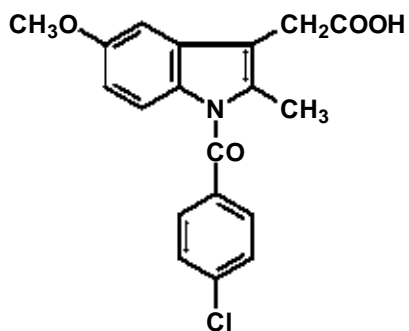
Los efectos antiinflamatorios de estos esteroides son el resultado de la inhibición de la expresión de citocinas proinflamatorias, como la IL-12, el TNF $\alpha$  y la producción de prostaglandinas (Elenkov y Chrousos, 2002). De esta manera se disminuyen las manifestaciones inmediatas de la inflamación, como rubor, dolor, etc. También inhiben la vasodilatación y disminuyen el exudado plasmático reduciendo la formación del edema; modifican las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales alterando la migración hacia la zona lesionada (Pitzalis *et al.*, 2002); reducen la liberación de enzimas lisosomales, así como, de mediadores proinflamatorios y bloquean la recaptación extraneuronal de catecolaminas, potenciándose la vasoconstricción inducida por catecolaminas endógenas (Devillier, 2001; Belvisi *et al.*, 2001).

En la Figura 10 se presentan algunos fármacos utilizados en la terapéutica de la inflamación y el dolor.

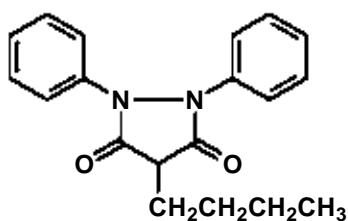
## **1.6 METABOLITOS DE ORIGEN NATURAL CON PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS Y ANALGÉSICAS**

Los productos naturales han contribuido por muchos años al desarrollo de fármacos utilizados en la terapéutica moderna de la inflamación, principalmente los metabolitos secundarios derivados de plantas superiores han sido de gran interés, ya que algunos de ellos interactúan de manera directa o indirecta con distintas moléculas o mecanismos implicados en los procesos inflamatorios.

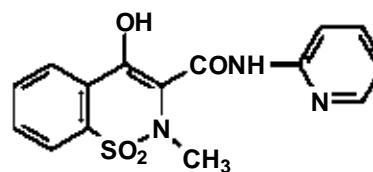
**Figura 10.** Ejemplos selectos de los fármacos más utilizados en la terapéutica del dolor y la inflamación.



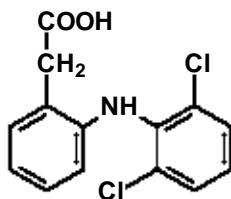
Indometacina (22)



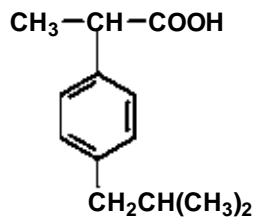
Fenilbutazona (23)



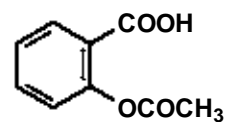
Piroxicam (24)



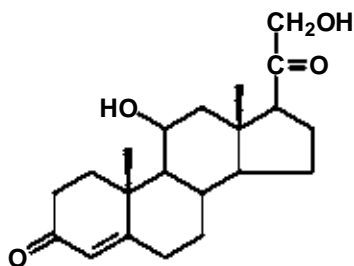
Diclofenaco (25)



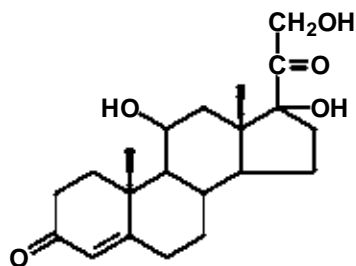
Ibuprofeno (26)



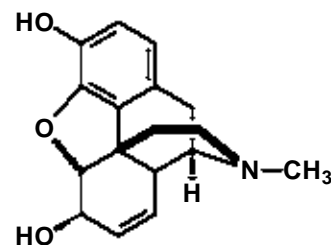
Aspirina (27)



Corticosterona (28)

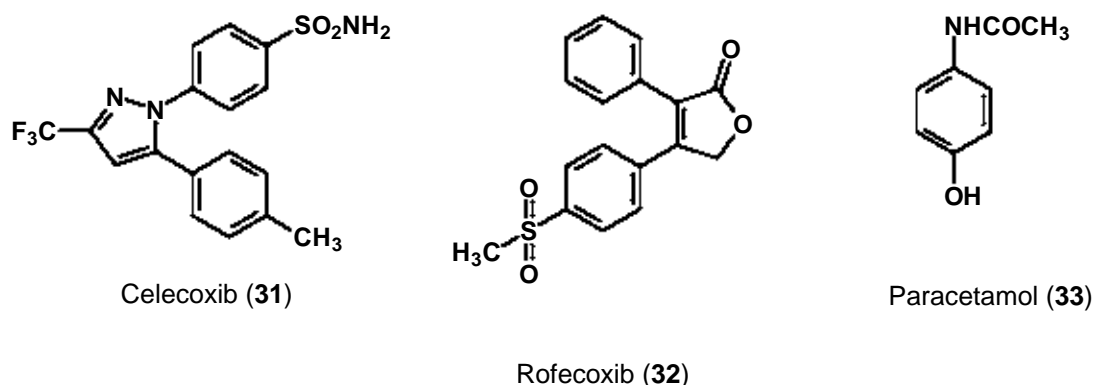


Cortisol (29)



Morfina (30)

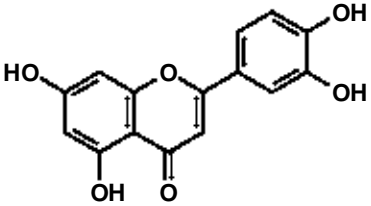
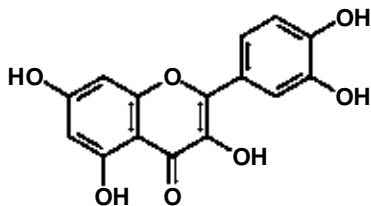
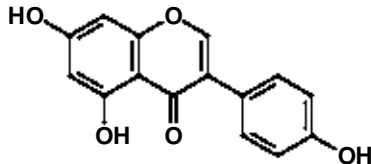
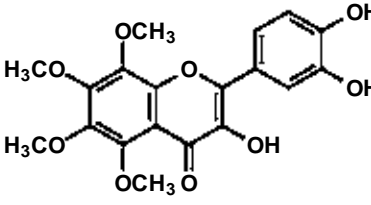
**Figura 10.** Ejemplos selectos de los fármacos más utilizados en la terapéutica del dolor y la inflamación (Cont.).



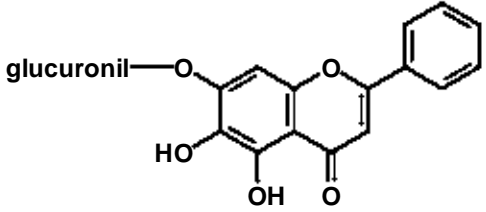
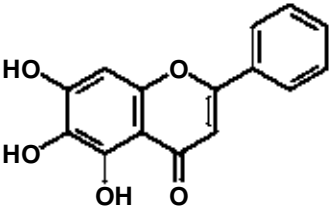
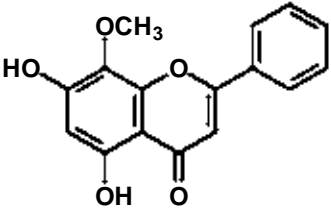
Dichos metabolitos comprenden una gama estructural amplia, destacando los derivados del ácido salicílico, flavonoides, prostanoides, terpenos, triterpenos, lignanos, estilbenoides, alcaloides, etc. En los Cuadros 4 y 5 se indican algunos ejemplos de antiinflamatorios y analgésicos selectos de origen natural, respectivamente. La mayoría de estos productos se aislaron de especies vegetales de amplio uso en las prácticas médicas populares en diversas regiones del mundo, las cuales han contribuído de manera notable a la terapia de la inflamación y el dolor, en particular de los sectores sociales más necesitados. Estas plantas representan entonces una fuente invaluable de fármacos y/o alternativas terapéuticas.



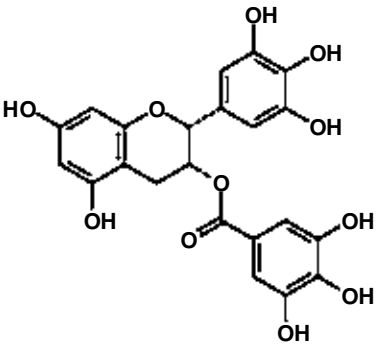
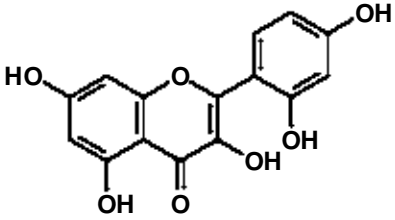
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias.

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD   | REFERENCIA   |
|--|---|--|
|  <p>Luteolina (34)</p>  | <p>Inhibe la liberación del TNF<math>\alpha</math> e IL-6</p> <p>Disminuye el edema en oreja de ratón inducido con TMA y oxazolona</p>  | <p>Xagorari <i>et al.</i>, 2001</p>                              |
|  <p>Quercetina (35)</p>  <p>Genisteina (36)</p> | <p>Inhibe la liberación del TNF<math>\alpha</math> e IL-6</p>   | <p>Xagorari <i>et al.</i>, 2001</p>                              |
|  <p>Nobiletina (37)</p>   | <p>Inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> en fibroblastos de conejo</p> <p>Inhibe la producción de PGE<sub>2</sub> inducido por la IL-1<math>\beta</math> en fibroblastos sinoviales humanos</p> | <p>Ishiwa <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Lin <i>et al.</i>, 2003</p> |

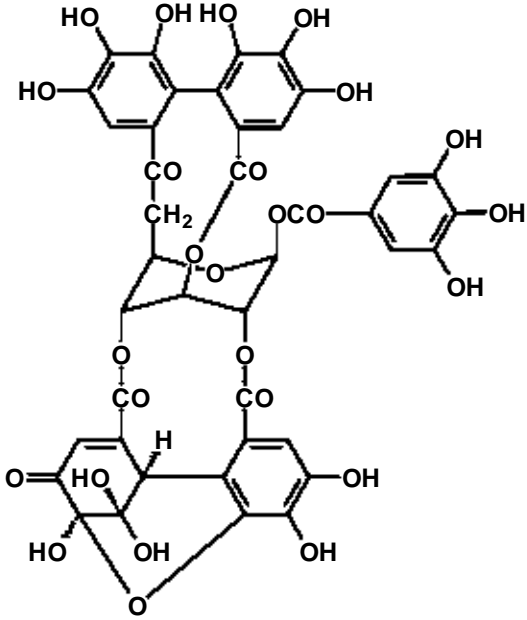
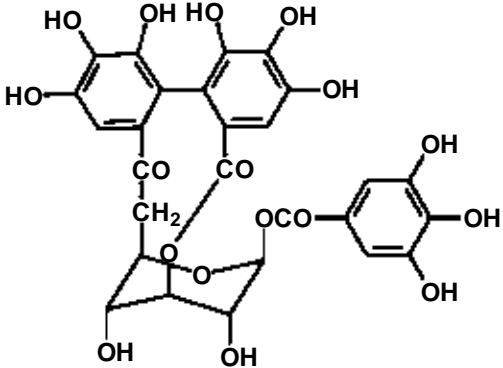
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA  | ACTIVIDAD  | REFERENCIA   |
|---|--|--|
|  <p>Baicalina (38)</p>   | <p>Su actividad antiinflamatoria se atribuye a sus propiedades antioxidantes y su habilidad para inhibir la producción de NO</p> | <p>Kubo <i>et al.</i>, 1983<br/>Chen <i>et al.</i>, 2001<br/>Chiu <i>et al.</i>, 2002<br/>Li <i>et al.</i>, 2000</p> |
|  <p>Baicaleina (39)</p> |  |  |
|  <p>Wogonina (40)</p>  | <p>Inhibe la actividad de la leucocito elastasa MMP-2 y MMP-9<br/>Antioxidante</p>   | <p>Kimura <i>et al.</i>, 2001<br/>Krakauer <i>et al.</i>, 2001</p>   |

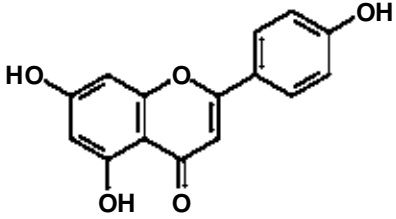
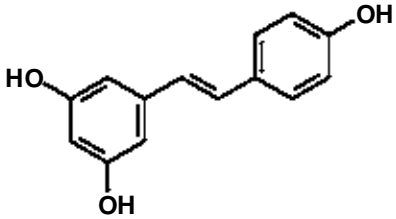
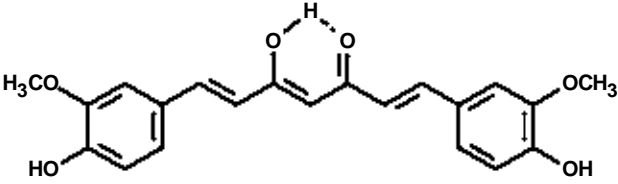
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA   |
|--|--|--|
|  <p>3-galato de epigalocatequilo (41)</p> | <p>Inhibe la actividad de la leucocito elastasa<br/>MMP-2 y MMP-9<br/>Antioxidante</p> | <p>Kimura <i>et al.</i>, 2001<br/>Krakauer <i>et al.</i>, 2001</p> |
|  <p>Morina (42)</p>                      |  |  |

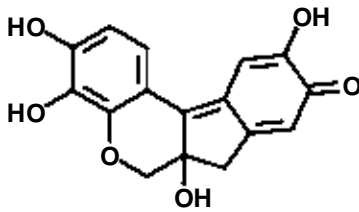
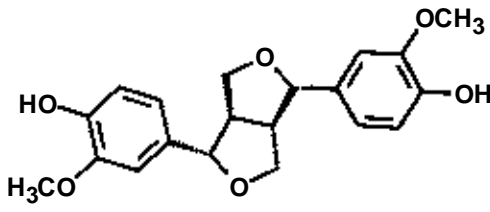
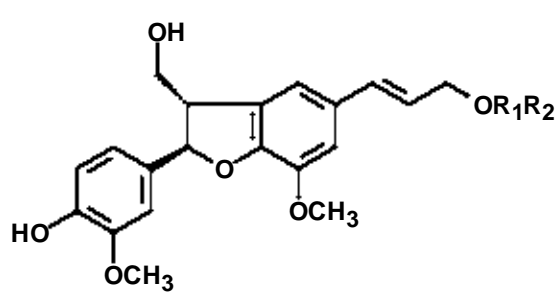
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA                       |
|--|--|----------------------------------|
|  <p style="text-align: center;">Geraniina (43)</p>   | <p>Inhibe la liberación del <math>TNF\alpha</math></p>   | <p>Okabe <i>et al.</i>, 2001</p> |
|  <p style="text-align: center;">Corilagina (44)</p> | <p>Previene la liberación del <math>TNF\alpha</math> en células BALB/3T3 estimuladas con ácido akádico</p> | <p>Okabe <i>et al.</i>, 2001</p> |

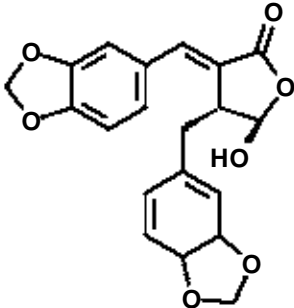
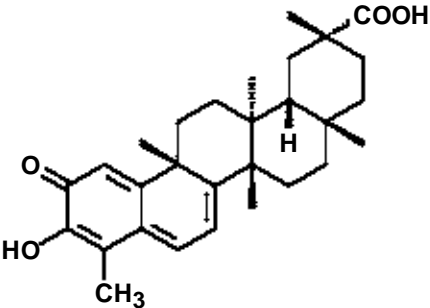
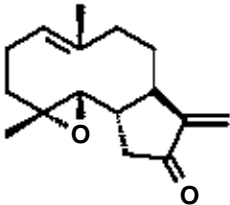
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD   | REFERENCIA   |
|--|---|--|
|  <p style="text-align: center;">Apigenina (45)</p>    | <p>Inhibe de manera dosis dependiente la actividad de la IL-5</p>   | <p>Park <i>et al.</i>, 1999</p>  |
|  <p style="text-align: center;">Resveratrol (46)</p> | <p>Produce una inhibición muy marcada del ICAM-1 y VCAM-1, bloquea la adhesión celular inducida por el TNF<math>\alpha</math></p> | <p>Hunter <i>et al.</i>, 1997<br/>Ahn <i>et al.</i>, 2000<br/>Tanaka <i>et al.</i>, 2001</p> |
|  <p style="text-align: center;">Curcumina (47)</p>  | <p>Inhibe liberación de la IL-1beta</p>   | <p>Calixto <i>et al.</i>, 2003</p>   |

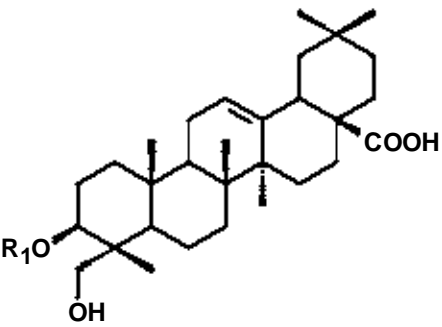
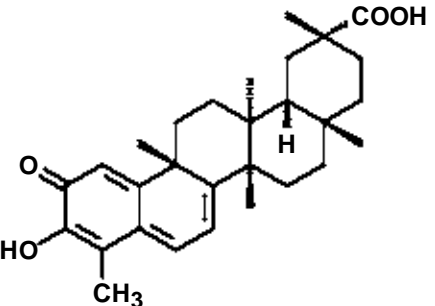
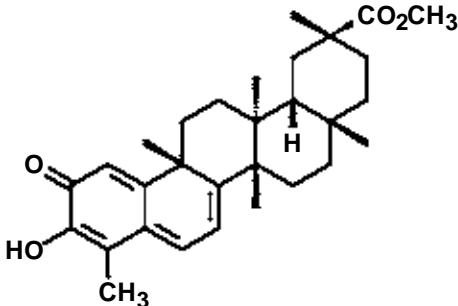
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA   |
|--|--|--|
|  <p style="text-align: center;">Hemateina (48)</p>  | <p>Reduce la expresión e incremento de VCAM-1, TNF<math>\alpha</math>, MCP-1</p>   | <p>Oh <i>et al.</i>, 1998; 2001<br/>Hong <i>et al.</i>, 2001</p> |
|  <p style="text-align: center;">Piroresinol (49)</p>  <p style="text-align: center;">R<sub>1</sub> <math>\beta</math>-D-Glucopiranosil</p> <p style="text-align: center;">R<sub>2</sub> = <math>\text{—CO—C(=O)—CH}_2\text{—CH}_2\text{—OH}</math></p> <p style="text-align: center;">Wurenosido V (50)</p> | <p>Causan inhibición significativa en la producción del TNF<math>\alpha</math>, también inhiben la proliferación de linfocitos T</p> | <p>Cho <i>et al.</i>, 1998; 2000; 2001a; 2001b</p>               |

**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

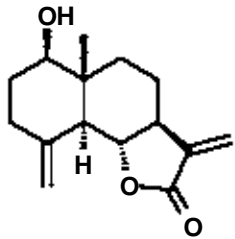
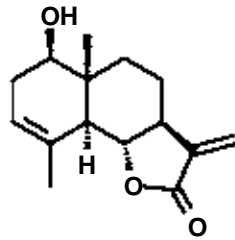
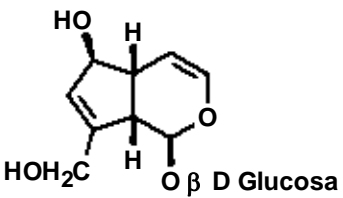
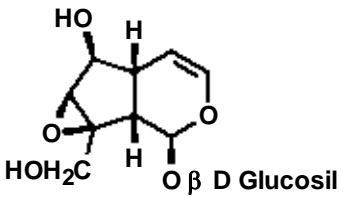
| ESTRUCTURA  | ACTIVIDAD  | REFERENCIA   |
|---|--|--|
|  <p>Calocedrina (51)</p>   | <p>Causan inhibición significativa en la producción del <math>TNF\alpha</math>, también inhiben la proliferación de linfocitos T</p>   | <p>Cho <i>et al.</i>, 1998; 2000; 2001a; 2001b</p>                   |
|  <p>Celastrol (52)</p>    | <p>Disminuye la producción de citocinas proinflamatorias <math>TNF\alpha</math> e <math>IL-1\beta</math> en macrófagos y monocitos humanos, también inhibe la artritis inducida con adyuvantes en ratas, confirmando su actividad antiinflamatoria</p> | <p>Sylvester <i>et al.</i>, 2001<br/>Allison <i>et al.</i>, 2001</p> |
|  <p>Partenólida (53)</p> | <p>Bloquea la expresión del VCAM-1 en células endoteliales inducidas con IL-4<br/>Con otros compuestos terpénicos decrece la expresión de IL-2 en linfocitos T</p>   | <p>Schnyder <i>et al.</i>, 2002</p>                                  |

**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

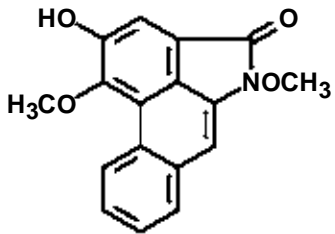
| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD   | REFERENCIA                       |
|--|---|----------------------------------|
|  <p><math>R_1</math> <math>\alpha</math>-L-ramnopiranosil(1-2)-<math>\alpha</math>-L-arabinopiranosil<br/>Kalopanaxsaponina (54)</p>  | <p>Previene la formación del <math>TNF\alpha</math> en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS</p> | <p>Kim <i>et al.</i>, 2002</p>   |
|  <p>Tripterina (55)</p>  <p>Pristimerina (56)</p> | <p>Inhiben la producción de <math>IL-1\beta</math> en monocitos humanos estimulados con LPS</p>     | <p>Huang <i>et al.</i>, 1998</p> |



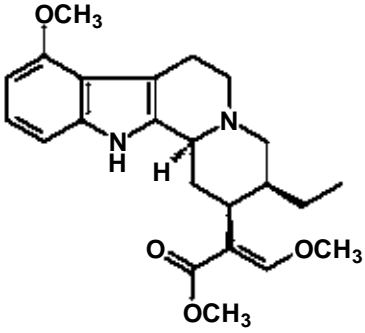
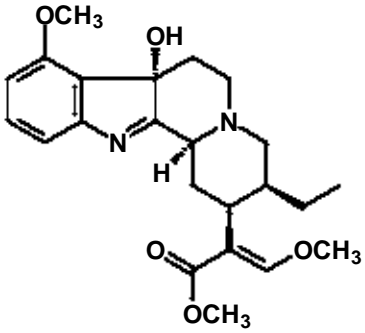
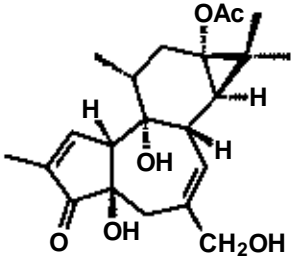
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA                       |
|--|--|----------------------------------|
|  <p>Reinosina (57)</p>  <p>Santamarina (58)</p> | <p>Inhiben la producción del <math>TNF\alpha</math> en células RAW 264.7 activadas con LPS</p>                         | <p>Cho <i>et al.</i>, 1998</p>   |
|  <p>Aucubina (59)</p>   | <p>Previene la producción de <math>TNF\alpha</math> y de IL-6 en células mastoides estimuladas RBL-2H3</p>             | <p>Jeong <i>et al.</i>, 2002</p> |
|  <p>Catalpol (60)</p>   | <p>Previene la producción de <math>TNF\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> e IL-6 en macrófagos activados con LPS</p> | <p>An <i>et al.</i>, 2002</p>    |

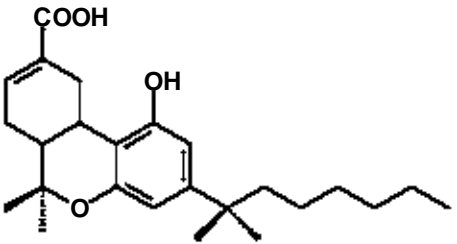
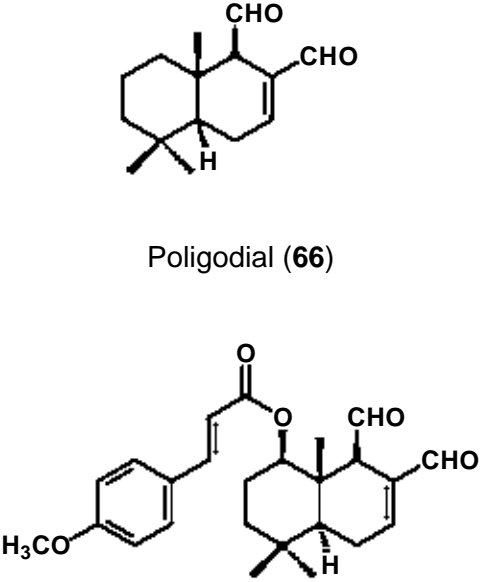
**Cuadro 4.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias (Cont.).

| ESTRUCTURA  | ACTIVIDAD  | REFERENCIA                       |
|---|--|----------------------------------|
|  <p>Piperolactama S (61)</p> | <p>Inhibe la liberación de <math>TNF\alpha</math> e <math>IL-1\beta</math> en macrófagos RAW 264.7 inducidos con C5a</p> | <p>Chiou <i>et al.</i>, 2003</p> |

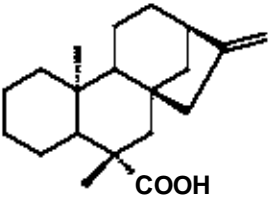
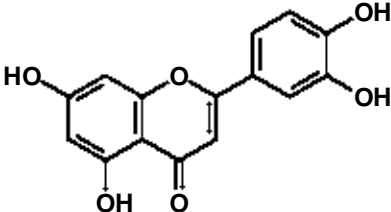
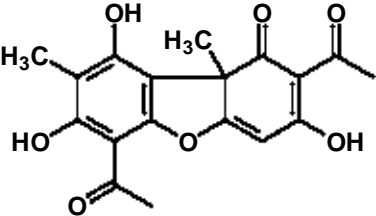
**Cuadro 5.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antinociceptivas.

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD   | REFERENCIA                           |
|--|---|--------------------------------------|
|  <p>Mitraginina (62)</p>            | <p>La mitraginina presenta actividad parecida a la morfina, la 7-hidroxitmitraginina se une con mayor afinidad a los receptores <math>\mu</math> y es más potente en los experimentos de la placa caliente y el "tail-flick test"</p> | <p>Matsumoto <i>et al.</i>, 2004</p> |
|  <p>7-hidroxitmitraginina (63)</p> |   |                                      |
|  <p>Prostratina (64)</p>          | <p>Propiedades analgésicas y sedativas en ratones</p>   | <p>Q. G. Ma <i>et al.</i>, 1997</p>  |

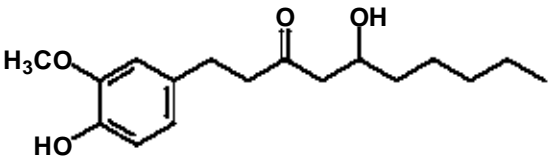
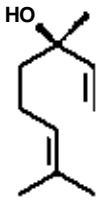
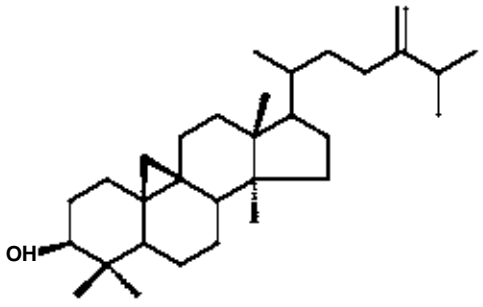
**Cuadro 5.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antinociceptivas (Cont.).

| ESTRUCTURA  | ACTIVIDAD   | REFERENCIA                          |
|---|---|-------------------------------------|
|  <p>Acido ajulemico (65)</p>   | <p>Presenta una gran potencia como antiinflamatorio y analgésico, en pruebas como: la administración de formalina, la prueba del estiramiento abdominal y la placa caliente mostró DE<sub>50</sub> en rangos de 1-10 mg/Kg</p>                        | <p>Burstein <i>et al.</i>, 2004</p> |
|  <p>Poligodial (66)</p> <p><math>\beta</math>-(<i>p</i>-metoxicinamoil) poligodial (67)</p> | <p>Ambos compuestos fueron evaluados en el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético, mostrando una respuesta antinociceptiva dosis-dependiente. Además de ser más potentes que los analgésicos comerciales AAS y Acetaminofeno</p> | <p>Filho <i>et al.</i>, 1998</p>    |

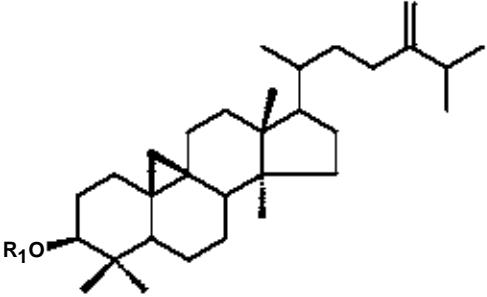
**Cuadro 5.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antinociceptivas (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA  |
|--|--|---|
|  <p>Ácido kaurenoico (68)</p> | <p>En la prueba de estiramiento abdominal inducido con ácido acético al 0.6 % ambos productos fueron más potentes que varios analgésicos comerciales</p> | <p>Block <i>et al.</i>, 1988</p>                            |
|  <p>Luteolina (69)</p>       |  |   |
|  <p>Ácido úsnico (70)</p>   | <p>En dosis de 30 a 100 mg/Kg inhibió de manera significativa los estiramientos y contracciones inducidos con ácido acético</p>                          | <p>Okuyama <i>et al.</i>, 1995<br/>Ingólfssdóttir, 2002</p> |

**Cuadro 5.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antinociceptivas (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD  | REFERENCIA                             |
|--|--|--|
|  <p>[6]-Gingerol (71)</p> | <p>La administración i.p. (25–50 mg/Kg) produjo una inhibición en las contracciones inducidas con ácido acético y en la fase tardía en la prueba de la formalina</p>   | <p>Young <i>et al.</i>, 2005</p>       |
|  <p>(-)-Linalol (72)</p> | <p>Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria. La analgesia la ejerce a nivel periférico y a nivel sistémico</p>   | <p>Peana <i>et al.</i>, 2003; 2004</p> |
|  <p>Folidotina (73)</p> | <p>Presentaron efecto antinociceptivo en los modelos de contracciones inducidas con ácido acético, la prueba de la formalina y la capsaicina, además de aumentar el tiempo de latencia en la prueba de la placa caliente</p> | <p>Ferreira <i>et al.</i>, 2000</p>    |

**Cuadro 5.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios de origen vegetal con propiedades antinociceptivas (Cont.).

| ESTRUCTURA   | ACTIVIDAD   | REFERENCIA  |
|--|---|---|
|  <p data-bbox="354 856 659 940">R<sub>1</sub> <i>p</i>-hidroxicinamato<br/>Metilencicloartenol (74)</p> | <p data-bbox="818 474 1125 915">Presentaron efecto antinociceptivo en los modelos de contracciones inducidas con ácido acético, la prueba de la formalina y la capsaicina, además de aumentar el tiempo de latencia en la prueba de la placa caliente</p> | <p data-bbox="1159 680 1391 709">Ferreira <i>et al.</i>, 2000</p> |

## **1.7 PRUEBAS DE INOCUIDAD**

En cualquier investigación que involucre el descubrimiento de nuevas moléculas de utilidad terapéutica, alimenticia o cosmética, es fundamental determinar su inocuidad, en especial la carencia de efectos tóxicos agudos y mutagénicos. El primer parámetro dará información sobre los intervalos a los cuales podemos estar expuestos a un determinado producto, además de los síntomas y signos en caso de una intoxicación.

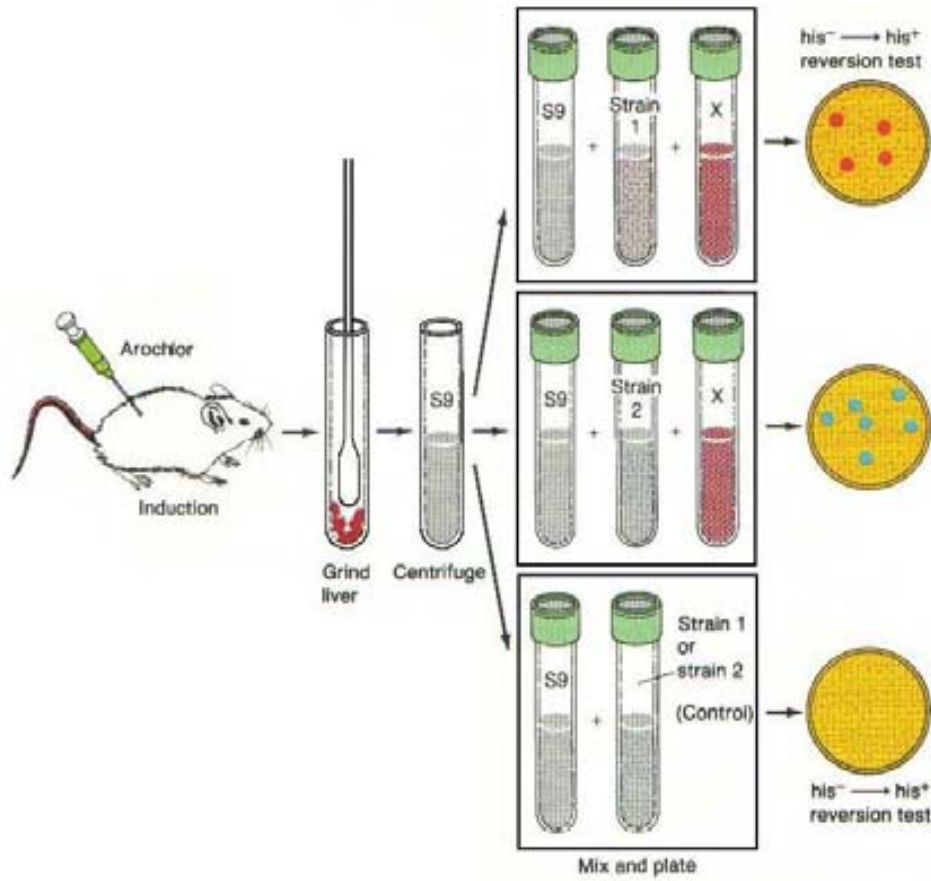
### **1.7.1 Ensayo de Ames**

A la fecha, se han desarrollado varios métodos para detectar la posible actividad mutagénica de los productos de interés farmacéutico. Algunos de estos ensayos involucran un gran consumo de tiempo y el uso de animales de laboratorio (roedores por lo general) (Griffiths *et al.*, 1993).

En los años 70's, Bruce Ames y colaboradores desarrollaron uno de los procedimientos más utilizados en la actualidad para detectar el potencial mutagénico de una sustancia. La prueba se conoce como la Prueba de Ames o Ensayo de Mutagenicidad de Ames. Este procedimiento fue específicamente diseñado para detectar sustancias químicas que induzcan mutagénesis y es sumamente útil para la valoración inicial de fármacos debido a su alto valor predictivo.



La prueba de Ames (Figura 11) está basada en la reversión de la mutación bacteriana de cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 98, TA 100, TA 102, TA 104, etc) específicamente diseñadas para detectar productos que provoquen daño genético. Las cepas utilizadas en el ensayo de Ames son histidina dependientes (His -), y poseen diferentes mutaciones en el operón de la histidina, por lo tanto, no pueden sintetizar el aminoácido (AA). El crecimiento y formación de colonias bacterianas no se presentará en ausencia del AA. Estas mutaciones actúan como blancos para mutágenos que causan daño en el ADN por distintos mecanismos. Así, nuevas mutaciones en la proximidad de estos puntos, pueden restaurar la funcionalidad de esos genes y llevar a las células a sintetizar histidina. Estas nuevas células mutantes (His +) pueden crecer en ausencia de histidina y formar colonias. Por esta razón, la prueba es a veces referida como un Ensayo de Reversión. De manera adicional, con el objetivo de incrementar la eficiencia del ensayo se han diseñado cepas de *S. typhimurium* con mutaciones adicionales. Así por ejemplo, la mutación *rfa* que causa la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubre la superficie de la bacteria, incrementa su permeabilidad a un gran número de compuestos que normalmente no penetran paredes celulares normales (Ames *et al.*, 1983). Otra modificación del genoma de *S. typhimurium* que ha incrementado la sensibilidad de la bacteria para detectar mutágenos consiste en la eliminación del gen que codifica para el sistema de reparación del ADN (mutación *uvrB*) (Ames, 1971, 1983).



**Figura 11.** Ensayo de mutagenicidad desarrollado por Ames y colaboradores.

Una modificación de la prueba original consiste *en incorporar al* medio de cultivo el supuesto mutágeno a ensayar, la cepa y un extracto de células de mamífero de manera que en el sistema *in vitro* el metabolismo celular animal pueda actuar sobre el mutágeno potencial, dando así una idea de su posible actuación *in vivo*. El sistema celular utilizado comúnmente es la fracción S9 separada del hígado de ratas previamente tratadas con un potente inductor de los citocromos P450, el aroclor 1254.

Dentro del estudio de los mutágenos químicos es necesario hacer referencia a su posible acción cancerígena ya que la mayoría de los carcinógenos tienen actividad mutagénica. Así, por ejemplo, Ames y colaboradores (1983), demostraron que el 90% de los carcinógenos ensayados en *S. typhimurium* resultaron mutágenos. Debido a este hecho, los ensayos de mutagénesis son de gran utilidad para detectar agentes carcinogénicos.

### **1.7.2 Toxicidad aguda: el método de Lorke**

Uno de los modelos utilizados para determinar la inocuidad de productos de interés terapéutico es el desarrollado por Dietrich Lorke (1983). Este modelo nos ayuda a determinar de manera preliminar la toxicidad aguda de una sustancia o un extracto. A diferencia de la mayoría de los protocolos experimentales utilizados hoy día, el método de Lorke permite calcular la DL<sub>50</sub> utilizando un número reducido de animales de laboratorio (generalmente ratas o ratones). Esta característica constituye la principal ventaja de este método.

La determinación se realiza en dos fases: En la primera etapa se administran tres dosis del compuesto o extracto de prueba (10, 100 y 1000 mg/Kg), y se determina la mortalidad, si existe alguna, a las tres concentraciones. Esta primera fase tiene como objetivo establecer si los extractos son tóxicos, muy tóxicos o ligeramente tóxicos, de acuerdo a la mortalidad observada con cada dosis (ver Cuadro 6), y a *grosso modo* el rango de concentración en que se encuentra la concentración letal media (DL<sub>50</sub>). En la segunda etapa, y con base en los resultados anteriores, se repite el estudio con otro grupo de animales utilizando un intervalo de dosis, mayor o menor que las iniciales, para establecer la DL<sub>50</sub>. Este valor se obtiene calculando la media geométrica entre la primera dosis donde se presentó el deceso de algún animal, y la última donde sobrevivieron todos los ratones.

**Cuadro 6.** Criterios de Lorke para determinar las dosis en la segunda etapa del estudio de toxicidad aguda.

| <b>Dosis (mg/Kg)<br/>Resultados de la 1ª etapa</b> |            |             | <b>Dosis a escoger para la 2ª etapa</b> |      |      |      |
|--|------------|-------------|---|------|------|------|
| <b>10</b>  | <b>100</b> | <b>1000</b> |   |      |      |      |
| 0/3  | 0/3        | 0/3         |   | 1600 | 2900 | 5000 |
| 0/3  | 0/3        | 1/3         | 600                                     | 1000 | 1600 | 2900 |
| 0/3  | 0/3        | 2/3         | 200                                     | 400  | 800  | 1600 |
| 0/3  | 0/3        | 3/3         | 140                                     | 225  | 370  | 600  |
| 0/3  | 1/3        | 3/3         | 50                                      | 100  | 200  | 400  |
| 0/3  | 2/3        | 3/3         | 20                                      | 40   | 80   | 160  |
| 0/3  | 3/3        | 3/3         | 15                                      | 25   | 40   | 60   |
| 1/3  | 3/3        | 3/3         | 5                                       | 10   | 20   | 40   |
| 2/3  | 3/3        | 3/3         | 2                                       | 4    | 8    | 16   |
| 3/3  | 3/3        | 3/3         | 1                                       | 2    | 4    | 8    |

## **II. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA**

El reconocimiento del valor terapéutico y económico de las plantas medicinales es claro en el mundo moderno. En consecuencia, el conocimiento de su eficacia, inocuidad, calidad y otros aspectos médicos-farmacéuticos, así como, la regulación de su explotación y comercio son tareas esenciales para garantizar el uso racional y la conservación de este importante recurso. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (Resolución WHA 42.43, 1989) ha solicitado a los países miembros que realicen una evaluación detallada de sus sistemas tradicionales de salud, incluyendo los recursos terapéuticos de origen vegetal. De esta forma sería factible obtener un listado de las especies más utilizadas, e incorporarlas en las Farmacopeas nacionales. Evidentemente, los requerimientos en cuanto a eficacia, seguridad y calidad de los productos herbolarios que se incorporen en las Farmacopeas deben de ser iguales a los de cualquier producto destinado a la salud humana.

A partir de esta iniciativa de la OMS, muchas instituciones gubernamentales del sector salud de sus países miembros han tratado de establecer paulatinamente, con mucho éxito, en algunos casos, los criterios que garanticen la seguridad, eficacia y calidad de los productos herbolarios medicinales.

La temática de las plantas medicinales ha sido considerada también en

varias Conferencias Internacionales de la International Conference of Drug Regulatory Authorities (ICDRA) desde el año de 1986. En estas reuniones se propuso que la OMS debía presentar los lineamientos básicos para regular y registrar productos derivados de plantas. Fue así que la OMS presentó en junio de 1991 el proyecto “Guidelines for Assessment of Herbal Medicines”, el cual facilitaría el establecimiento de normas en el ámbito internacional y los estándares necesarios para el registro de medicamentos botánicos sobre bases científicas. De tal forma, que el documento anterior define los criterios básicos para la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de las plantas medicinales y sus preparados, así como también los requisitos de rotulado y envasado; todo ello con la finalidad de asistir a las autoridades de regulación sanitaria en varios países, organizaciones científicas y fabricantes de productos herbolarios. Así mismo, esta guía contiene información acerca del uso tradicional de las plantas, incluyendo las indicaciones terapéuticas mejor documentadas, y la forma farmacéutica más recomendada, identificación botánica, análisis de estabilidad de la droga, estudios toxicológicos que deben realizarse en caso de especies de dudoso historial y revisión bibliográfica pertinente. La ICDRA aceptó esta propuesta en la 6ª reunión en Ottawa en 1991. Posteriormente la OMS publicó la primera versión de la guía en 1993, años más tarde, en 1999, la OMS publicó otro documento, que bajo el nombre de “Quality Control Methods for Medicinal Plants Materials” representa una versión más actual del trabajo antes señalado.

En 1999, la OMS también editó las primeras 28 monografías de plantas medicinales ampliamente utilizadas alrededor del mundo. Cada monografía contiene información científica sobre control de calidad y procedimientos para establecer la eficacia e inocuidad de las plantas seleccionadas, estas monografías serían la base para la elaboración de documentos similares en distintos países del mundo (WHO, 1998; WHO, 1999). Posteriormente en el año 2000, la OMS publicó un segundo volumen con 30 monografías adicionales de especies medicinales.

En el año 2001, México, a través de la Secretaría de Salud y su Comisión Permanente de la Farmacopea, publicó la primera edición de la “Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos”, como una respuesta a la creciente necesidad de referentes respecto a los recursos herbolarios y como una repercusión de la propuesta de la OMS. Dicha farmacopea fue generada por un conjunto de expertos. Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria de nuestro país y de la gran tradición en el uso de las plantas medicinales con fines curativos, las monografías de especies autóctonas de amplio uso médico tradicional resultaron muy limitadas en cantidad y calidad ya que no se dispone de la información para integrarlas adecuadamente. De tal manera que en el México actual, a pesar del amplio uso y comercialización de plantas medicinales, hay una carencia notable de estándares para el control de calidad de las plantas y sus preparados. Así mismo la información acerca de la eficacia, inocuidad, desarrollo

sustentable, composición química y otros aspectos farmacéuticos de las mismas es escasa.

La información requerida para integrar una monografía, tipo OMS o farmacopeica, de una especie vegetal medicinal demanda una investigación multidisciplinaria de la planta. En el caso de México, para llevar a cabo esta tarea, la Secretaría de Salubridad depende de los centros de investigación y universidades que cuenten con la infraestructura y funcionamiento adecuados. De tal forma que recientemente la Secretaría de Salud y el CONACyT otorgaron a la Facultad de Química de la UNAM un financiamiento modesto para iniciar la elaboración de monografías tipo OMS y Farmacopeicas de especies selectas de la flora medicinal mexicana (Proyecto CONACyT-SALUD C01-018).

En este marco de referencia se planteó el presente trabajo de tesis, mismo que describe la investigación sobre varios aspectos farmacológicos, toxicológicos y químicos de la orquídea medicinal *S. livida* (Lindley) Schltr. La información generada, aunada a otros trabajos sobre esta especie permitirá en un futuro la integración de su monografía tipo OMS.



### **III. OBJETIVOS**

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar algunos aspectos sobre la inocuidad, eficacia y parámetros de identidad de la especie medicinal *S. livida* con la finalidad de contribuir a la elaboración de las monografías tipo OMS y farmacopeica de la planta. Los objetivos particulares pertinentes son los siguientes:

1. Establecer los compuestos marcadores de la especie mediante el estudio químico de la planta.
2. Investigar la probable actividad antinociceptiva del extracto íntegro y metabolitos secundarios mayoritarios de la especie mediante el uso de los métodos de la placa caliente y estiramiento abdominal.
3. Investigar el potencial antiinflamatorio del extracto íntegro y metabolitos secundarios mayoritarios utilizando el método de la inducción del edema plantar en rata.
4. Evaluar el potencial mutagénico del extracto íntegro mediante la prueba de Ames.
5. Determinar la toxicidad aguda del extracto ( $DL_{50}$ ) mediante la metodología descrita por Lorke.

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 ENSAYOS BIOLÓGICOS

#### 4.1.1 Efecto antinociceptivo del extracto, fracciones y productos puros de la especie *S. livida* en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal

El efecto antinociceptivo se determinó utilizando los modelos de la placa caliente y el estiramiento abdominal, de acuerdo a los protocolos experimentales reportados en la literatura (Williamson *et al.*, 1996). En los dos tipos de experimentos se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso en el rango de 25 a 30 g. Los animales se mantuvieron en un bioterio con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Antes de los ensayos, los animales se dividieron en grupos de seis y se mantuvieron en ayuno por 24 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*).

##### 4.1.1.1 Ensayo con el modelo de la placa caliente

Los ratones se introdujeron en un cilindro de plástico transparente colocado sobre una placa caliente a la temperatura de  $55.5 \pm 0.2$  °C. Inmediatamente se determinó el período de latencia (en segundos) al dolor, es decir, el tiempo transcurrido entre el estímulo y la primera respuesta de los animales al estímulo térmico (lamida, levantamiento de las patas traseras o salto fuera del cilindro). Debido a la naturaleza del experimento fue necesario inicialmente adaptar a los animales al entorno del experimento.

Para ello, los animales se colocaron dentro del cilindro; a continuación el conjunto animal-cilindro se colocó sobre la placa de calentamiento (apagada) durante 20 minutos o hasta que el ratón no presentó un comportamiento de exploración del medio. Este proceso se realizó el día previo al experimento y momentos antes de iniciarlo. La administración del extracto y los compuestos de prueba se realizó por vía oral (p.o.). Como control negativo se empleó solución salina isotónica (SSI) (p.o.) y como control positivo morfina a la dosis de 3.75 mg/Kg administrado por vía intraperitoneal (i.p.). Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de variancia seguida por una prueba de Dunnet.

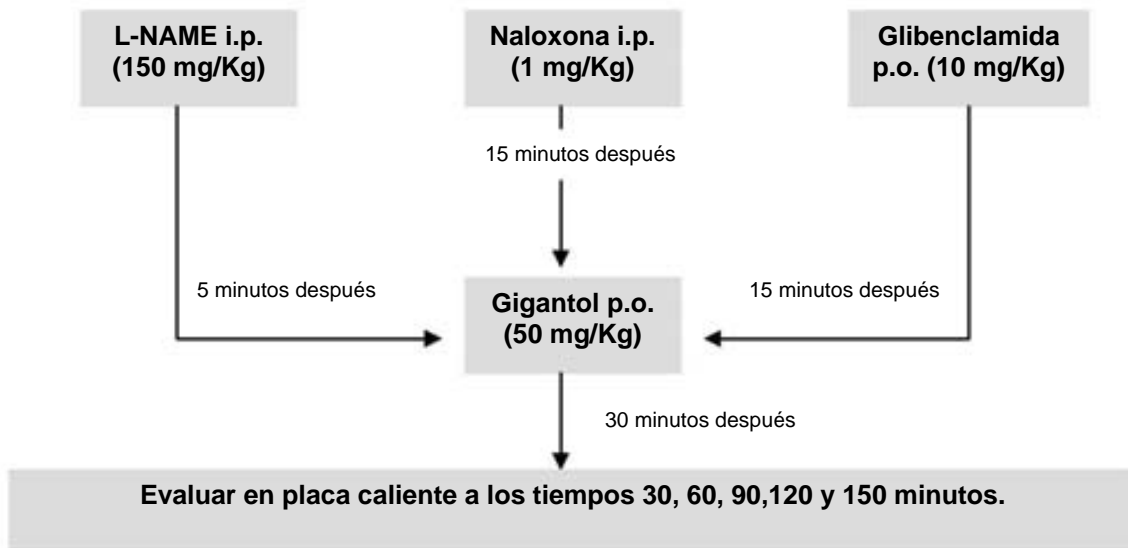
#### **4.1.1.2 Determinación del efecto antinociceptivo del gigantol (2) en presencia de L-NAME, glibenclamida y naloxona**

El experimento se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso anterior, previa administración de los distintos antagonistas seleccionados: naloxona, glibenclamida y L-NAME. La secuencia de administración de los fármacos antagonistas y productos de prueba a los animales de experimentación se resume en el Diagrama 1.

#### **4.1.1.3 Modelo de estiramiento abdominal**

El extracto (100, 300 y 600 mg/Kg) y los metabolitos **2**, **19**, **75** y **76** (25, 50 y 100 mg/Kg) se administraron por vía oral, a los 60 y 30 minutos, respectivamente, previos a la realización del experimento.

Una vez cumplido el tiempo de absorción, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal una solución de ácido acético al 0.6 %. Inmediatamente después, los animales se colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron durante 30 minutos.



**Diagrama 1.** Determinación del efecto antinociceptivo del gigantol (2) en presencia de distintos antagonistas.

En este caso la nocicepción se manifiesta por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto el experimentador registra el número de los estiramientos de las patas traseras y flexión del cuerpo hacia atrás. El efecto antinociceptivo se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados en relación al control (tween al 2% en solución salina vía p.o.).

En esta prueba se utilizó dipirona como control positivo y fue administrada 30 minutos antes de inyectar el agente algogénico, a la dosis de 100 mg/Kg, vía p.o., este fármaco bloquea totalmente el efecto nociceptivo producido por el ácido acético. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de variancia seguida por una prueba de Dunnet.

#### **4.1.2 Determinación del potencial antiinflamatorio del extracto y compuestos puros aislados de *S. livida***

Para determinar el potencial antiinflamatorio del extracto orgánico y los metabolitos **2** y **19** se utilizó el modelo del edema plantar inducido con carragenina en ratas. Los animales utilizados fueron ratas macho de la cepa Sprage Dawley, con un peso en el rango entre 180 a 200 g, adquiridas en Harlan de México S. A. de C. V. La administración del extracto y los compuestos de prueba se realizó por vía oral una hora antes de aplicar una suspensión de carragenina (0.1 mL al 1% en solución salina isotónica) en el cojinete plantar de la pata derecha. Se utilizó como fármaco de referencia la indometacina (10 mg/Kg), administrada 30 minutos antes por vía oral. En la pata izquierda de cada animal se administró el vehículo como un control blanco. Para cuantificar las variaciones de volumen de la pata inflamada se utilizó la técnica volumétrica de desplazamiento de fluido mediante un pletismómetro de la marca Ugo Basile 7140. Se realizaron varias mediciones de la pata inflamada durante un periodo de 6 horas (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, horas). Para

el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de variancia seguida por una prueba de Dunnet.

#### **4.1.3 Determinación de la toxicidad (DL<sub>50</sub>) del extracto orgánico de *S. livida* de acuerdo al método de Lorke**

La toxicidad aguda se determinó en ratones de la cepa ICR de dos semanas de edad y con un peso promedio de 20 g, adquiridos comercialmente de Harlan de México S. A. de C. V.

El experimento consta de dos etapas, en la primera se administraron las siguientes dosis del extracto: 10, 100 y 1000 mg/Kg por vía oral. A continuación los animales se observaron durante ocho horas y posteriormente en intervalos de 24 horas durante dos semanas, registrándose su comportamiento, peso y algún cambio perceptible. Si algún animal muere debe ser registrada la hora y día del deceso y hacer un examen morfológico de los órganos del animal.

En la segunda fase, se utilizaron nuevos grupos de ratones y se trataron con dosis más altas, de acuerdo a los criterios de Lorke. A continuación se realizaron las mismas observaciones de la primera fase. La DL<sub>50</sub> se calculó mediante una media geométrica entre la dosis donde se presenta el deceso del primer animal y la última dosis donde no hay ratones muertos.

#### **4.1.4 Determinación del potencial mutagénico del extracto orgánico de *S. livida* y del gigantol (2) en la prueba de Ames**

El potencial mutagénico se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Ames. Para este ensayo se emplearon las cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100 y TA 102 con diferentes tipos de mutación en el operón de la histidina.

##### *a) Preparación de la muestra*

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: 50 mg del extracto orgánico objeto de estudio se disolvieron en 1 mL de DMSO. A partir de la solución anterior se prepararon las diluciones necesarias para que 20  $\mu$ L de la misma contengan entre 1000, 500 y 250  $\mu$ g.

##### *b) Preparación del inóculo*

100  $\mu$ L de la cepa en estudio, 20  $\mu$ L de la muestra a evaluar y 500  $\mu$ L de agua o bien de la fracción S9 se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía exactamente 2 mL de medio de inóculo, cuya composición es la siguiente: 0.6% de agar, 0.6% de NaCl, 0.5 mM de L-histidina y 0.5 mM de D-biotina. La suspensión anterior se homogeniza antes de volcarse sobre la superficie de las placas de agar.

c) *Procedimiento*

Los ensayos se realizaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro interno. Para cada muestra de prueba se transfirieron a las cajas de Petri 25 mL del medio Vogel-Bonner previamente esterilizado. Posteriormente, se realizaron los subcultivos mediante la adición del inóculo sobre la superficie de las cajas. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se procedió a contar el número de revertantes de histidina con ayuda de un contador de colonias modelo Fisher. Se trabajaron tres réplicas independientes por muestra. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de variancia seguida por una prueba de Dunnet.

## **4.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO**

### **4.2.1 Análisis cromatográfico**

El análisis cromatográfico se realizó en columna abierta siguiendo las técnicas convencionales, en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM. De manera adicional se realizaron cromatografías en columna abierta utilizando Sephadex (2.5 cm × 50 cm de sephadex LH 20, Pharmacia) y como eluyente metanol. Para efectuar la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron placas de vidrio y aluminio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck), utilizando varios sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno.



#### **4.2.2 Equipos utilizados para determinar las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas**

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono-13 (RMN-<sup>13</sup>C) se realizaron en un equipo Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico se registraron en un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

#### **4.2.3 Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de *S. livida***

##### **4.2.3.1 Material vegetal**

El material vegetal (planta entera) de *S. livida* (Lindley) Schltr se recolectó en el Ejido Ruiz Cortínes, Catemaco, Estado de Veracruz, en el mes de Mayo de 1995. La clasificación botánica estuvo a cargo del Biólogo Gustavo Carmona Díaz. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología (XAL) de Xalapa, Veracruz con el Voucher G. Carmona-Díaz 116 AMO. El proceso de desecación de la planta entera se realizó a temperatura ambiente, posteriormente se fragmentó en un molino de cuchillas Wiley Modelo 4.

#### 4.2.3.2 Obtención del extracto de *Scaphyglottis livida*

El material vegetal seco y molido (4.3 Kg) se extrajo mediante maceración con una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de manera exhaustiva. El extracto resultante se concentró a sequedad en un rotaevaporador obteniéndose un total de 360 gramos.

#### 4.2.3.3 Fraccionamiento preliminar del extracto total

El extracto total (360 g) fue sometido a un proceso de fraccionamiento primario mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando 2.6 Kg de gel de sílice como fase estacionaria. Como eluyentes se emplearon mezclas de hexano-AcOEt (1:0 → 0:1) y AcOEt-MeOH (1:0 → 1:1). Se recolectaron un total de 670 fracciones (0.5 L c/u) y se agruparon en 10 fracciones primarias de acuerdo a su similitud cromatográfica. El proceso de extracción y fraccionamiento primario se resumen en el Diagrama 2.

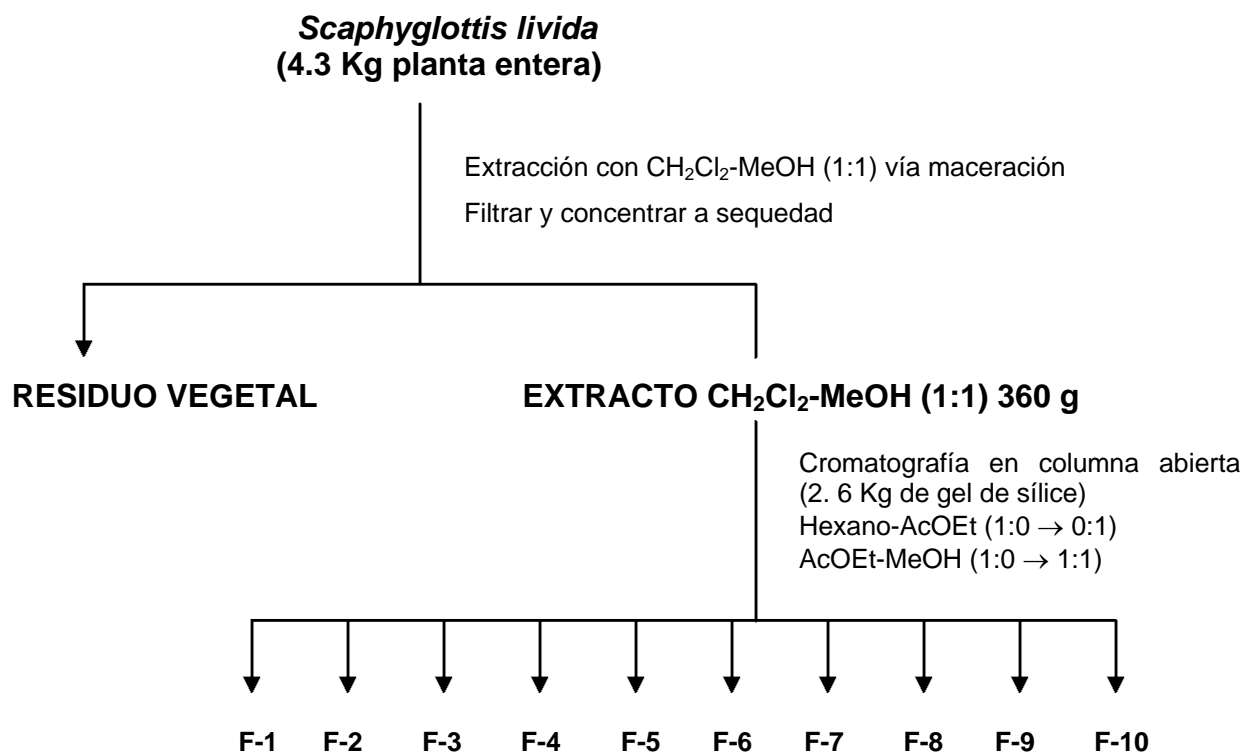
#### 4.2.4 Aislamiento y purificación del 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-9(11),25-dien-3-ona (77)

De la fracción **F-1** precipitó un sólido blanco (50 mg), con un punto de fusión de 185–186 °C. El producto resultó ser una mezcla de dos compuestos, según el análisis realizado por cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas (CG-EM), siendo uno de ellos el mayoritario (95 %). La purificación del

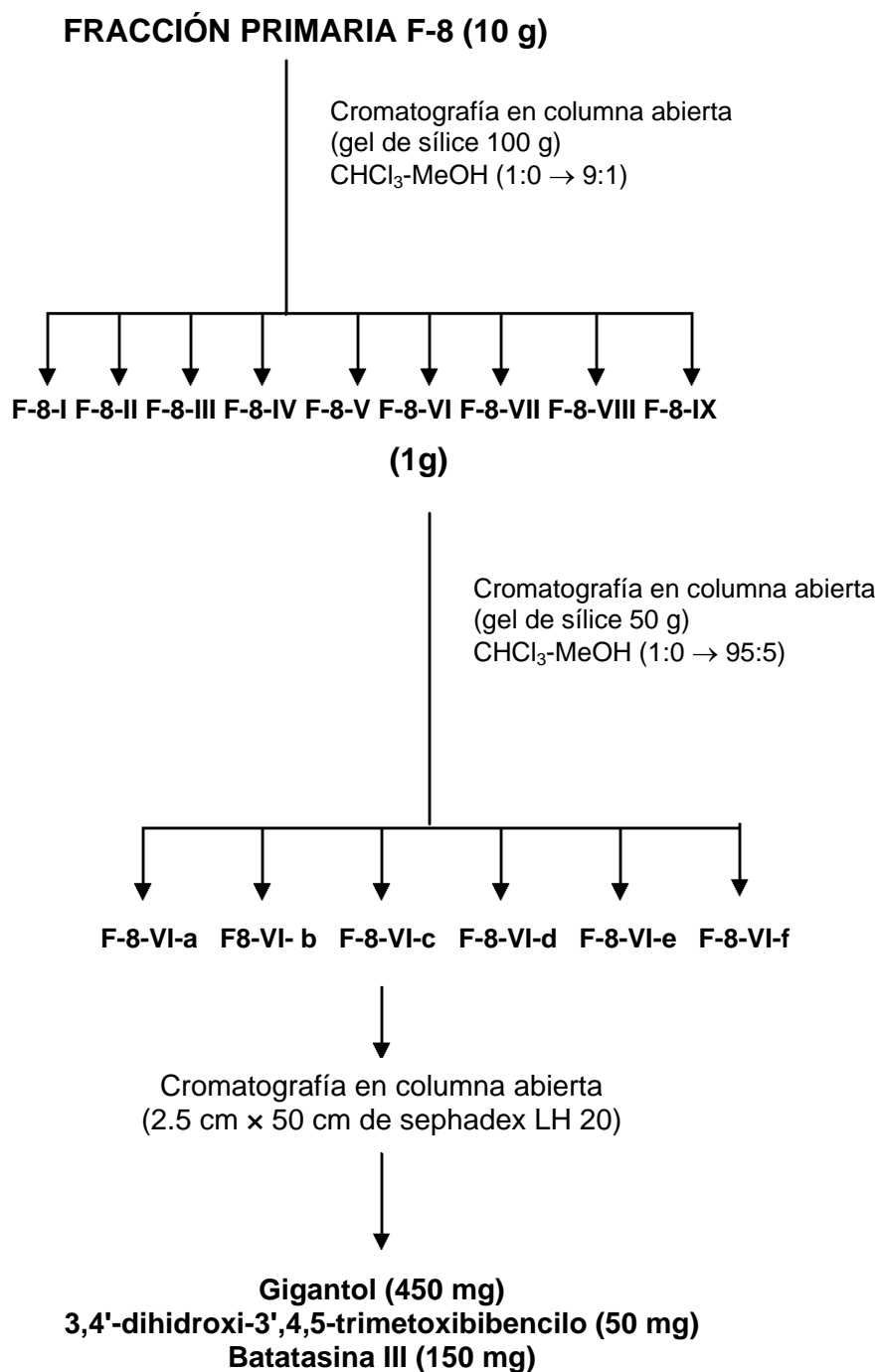
compuesto mayoritario se realizó mediante CLAR [Hex-AcoEt (9:1), flujo 0.3 mL/min, columna analítica impregnada con nitrato de plata al 5 %] (45 mg).

#### **4.2.5 Aislamiento e identificación de los bibencilos gigantol (2), batatasina III (14) y 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (78)**

La fracción activa **F-8** se procesó como se indica en el Diagrama 3, y como resultado se obtuvieron 450 mg de gigantol (2), 50 mg de 3,4'-dihidroxi-3', 4,5-trimetoxibibencilo (78) y 150 mg de batatasina III (14). Los datos espectroscópicos y espectrométricos fueron comparados con los reportados en la literatura especializada (Estrada *et al.*, 1999; Hernández-Romero *et al.*, 2003).



**Diagrama 2.** Procesos de extracción y fraccionamiento primario de *S. livida*.



**Diagrama 3.** Aislamiento y purificación de los bibencilos **2**, **14** y **78** a partir de la fracción activa **F-8**.

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La orquídea *S. livida*, fue seleccionada para la elaboración de una monografía tipo OMS debido a su amplio uso como agente espasmolítico y para eliminar ectoparásitos en las prácticas médicas populares de nuestro país (Estrada *et al.*, 1999).

Para integrar una monografía de esta naturaleza es necesario realizar una investigación multidisciplinaria de la planta medicinal orientada a determinar, su eficacia e inocuidad, pruebas de identidad y composición, así como de otros aspectos de índole histórico, etnobotánico y antropológico. Evidentemente en este trabajo se describen algunos resultados parciales, que en conjunto con los derivados de otras investigaciones permitirán la integración de la monografía. En primer lugar, se describen algunos parámetros de inocuidad y eficacia de la orquídea y enseguida se hará referencia a los compuestos marcadores y principios activos con propiedades antiinflamatorias y analgésicas de la especie.

### **5.1 Pruebas de inocuidad**

#### **5.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de *Scaphyglottis livida***

La determinación de la toxicidad aguda es el primer paso en el estudio del potencial tóxico de un extracto natural o una sustancia pura. Para evaluar sí el

extracto de *S. livida* presenta efectos tóxicos agudos se decidió aplicar el procedimiento de Lorke.

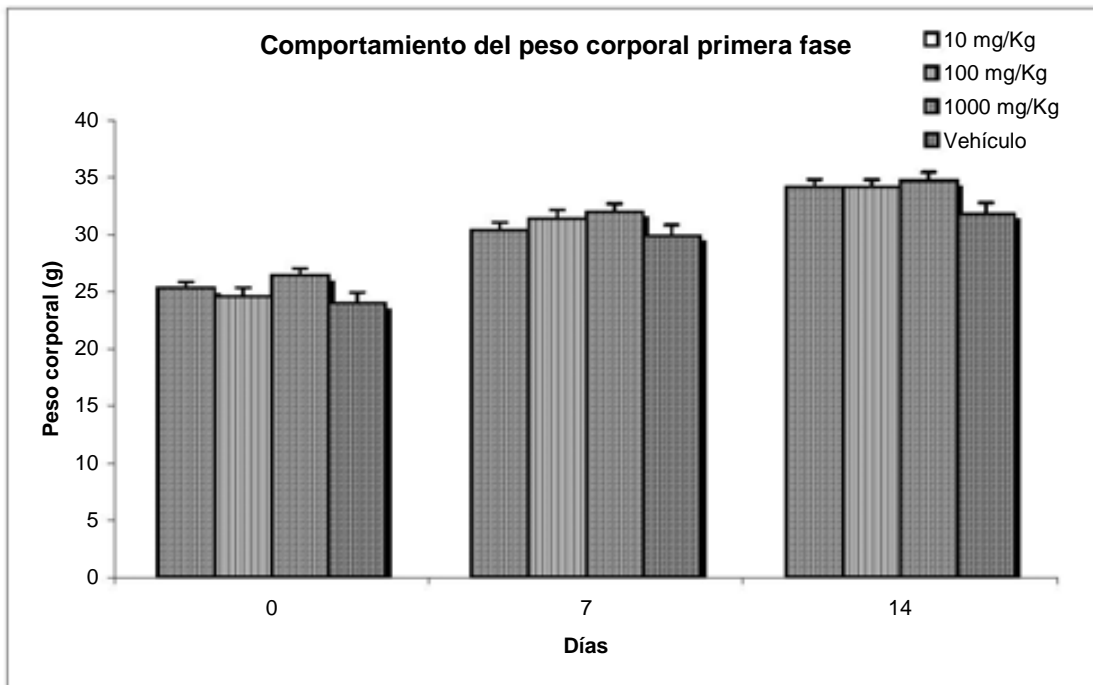
Este método tiene la ventaja de que requiere pocos animales y permite estimar fácilmente los síntomas de toxicidad más comunes. El estudio constó de dos fases como se detalló en la sección experimental (Lorke, 1983).

En la primera fase, el extracto íntegro de la especie se evaluó a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg y como se observa en los resultados resumidos en el Cuadro 7, a estas dosis no murió animal alguno, ni se apreciaron efectos tóxicos visibles en los grupos tratados. El análisis macroscópico de los órganos y tejidos de los animales no revelaron anomalías o alteraciones. Estos resultados condujeron entonces a la realización de la segunda fase del experimento. En esta segunda etapa el extracto se evaluó a las dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg. Los tratamientos de 1600 y 2900 mg/Kg no provocaron la mortalidad de los ratones ni efectos tóxicos visibles, sin embargo, a la dosis de 5000 mg/Kg se registró un animal muerto. En consecuencia, la  $DL_{50}$  se calculó estableciendo la media geométrica entre la dosis de 2900 mg/Kg y 5000 mg/Kg siguiendo los criterios de Lorke (Lorke, 1983). El valor para la  $DL_{50}$  calculado fue de 3800 mg/Kg.

Otro parámetro importante analizado en este estudio fue la variación en el peso de los animales. En las Figuras 12 y 13 se muestran las variaciones de peso de los distintos grupos de ratones utilizados en las dos fases del estudio.

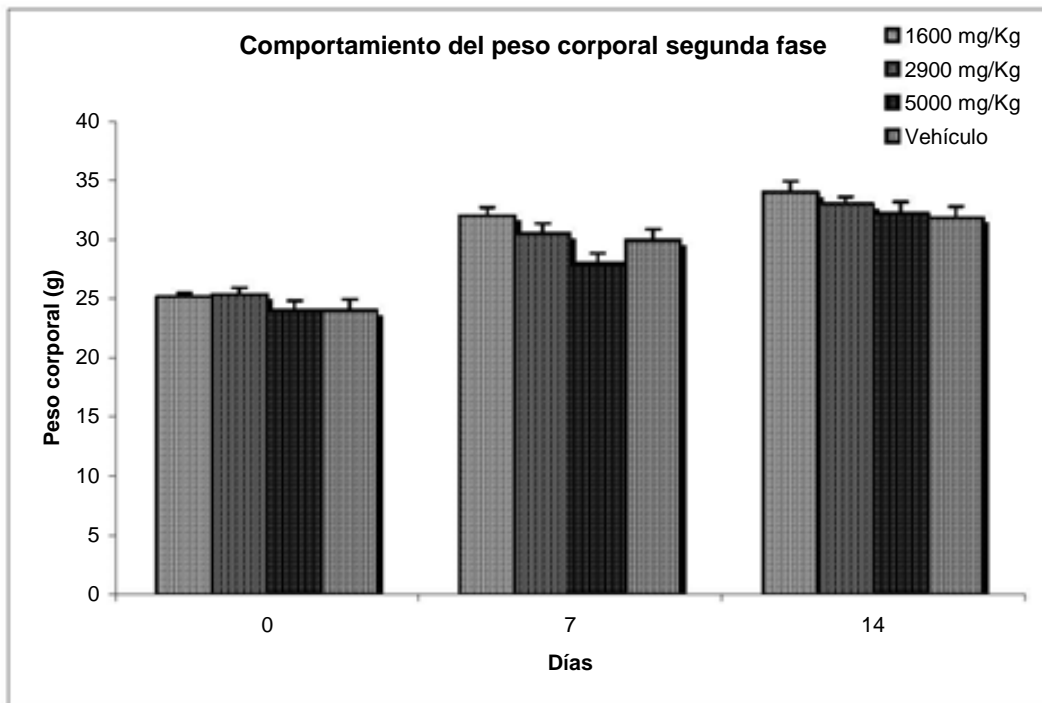
**Cuadro 7.** Evaluación de la toxicidad aguda de la especie *Scaphyglottis livida* en ratones.

| Fase 1           |             |     |      | Fase 2      |      |      |                  |
|------------------|-------------|-----|------|-------------|------|------|------------------|
| Extracto         | Dosis mg/Kg |     |      | Dosis mg/Kg |      |      | DL <sub>50</sub> |
| <i>S. livida</i> | 10          | 100 | 1000 | 1600        | 2900 | 5000 | mg/Kg            |
| Animales muertos | 0/3         | 0/3 | 0/3  | 0/3         | 0/3  | 1/3  | 3807             |



**Figura 12.** Peso corporal de los ratones durante la fase 1 de la prueba de Lorke.





**Figura 13.** Peso corporal de los ratones durante la fase 2 de la prueba de Lorke.

Como se puede observar en las Figuras 12 y 13, los ratones tratados con las diferentes dosis del extracto muestran un incremento significativo de su peso corporal y su desarrollo fue similar a los del grupo control. Estos datos, aunados al valor de la  $DL_{50}$  de 3800 mg/Kg indican que la especie *S. livida* no provoca cuadros de toxicidad aguda en animales de experimentación.

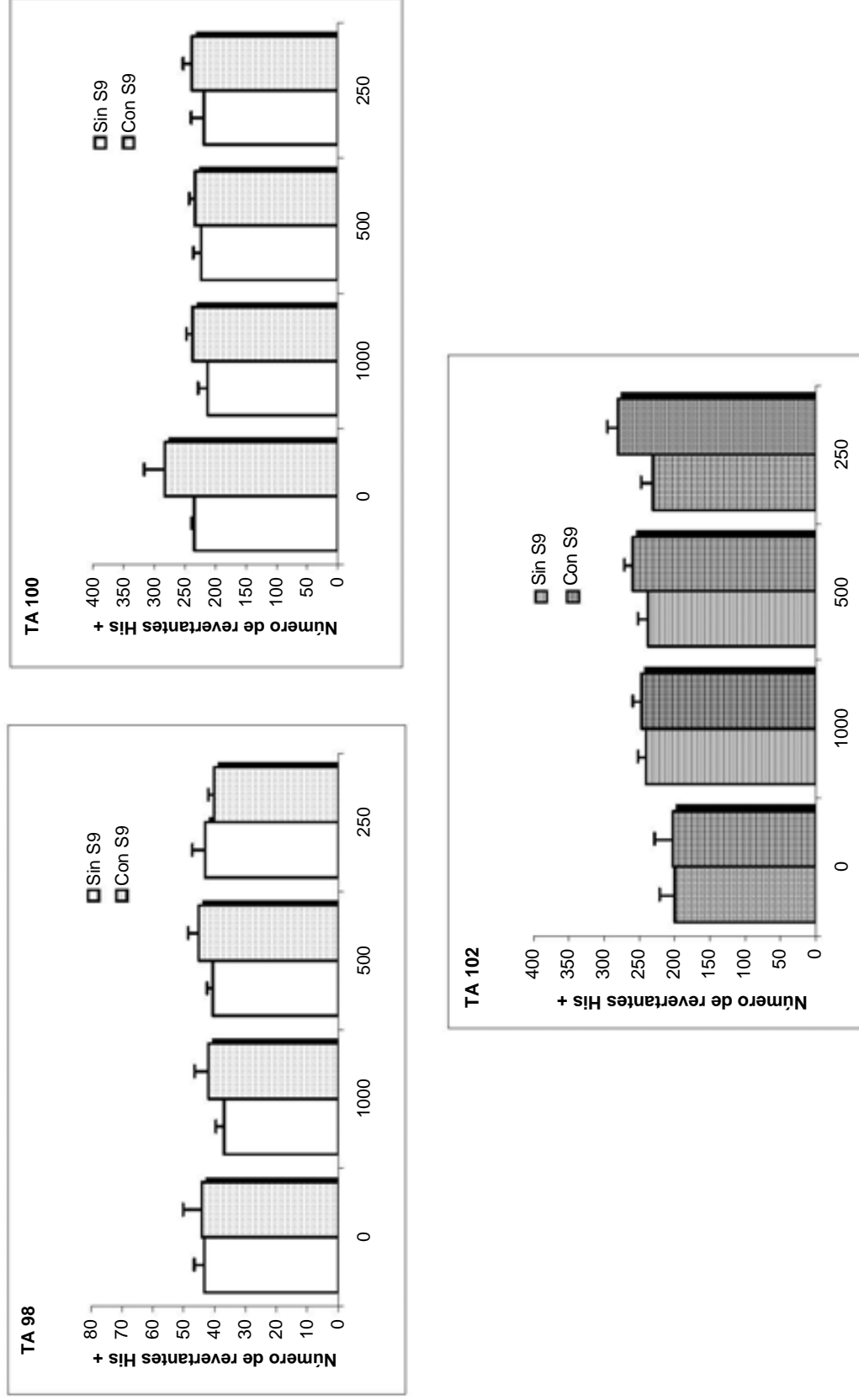
### 5.1.2 Evaluación del potencial mutagénico del extracto orgánico de *S. livida* y del gigantol (2).

El segundo ensayo de inocuidad realizado en el presente estudio fue la prueba de Ames. El ensayo se realizó siguiendo la metodología clásica de Ames (Ames *et al.*, 1975) como se indicó en la sección experimental. De acuerdo a los resultados obtenidos el extracto no provocó la reversión de la mutación de las cepas TA 98, TA 100 y TA 102, las cuales no fueron capaces de crecer en un medio mínimo sin el suplemento de histidina. Estos datos indican que el extracto no provoca efectos genotóxicos. En el caso del gigantol (2), la evaluación del potencial mutagénico, utilizando las cepas de *S. typhimurium* TA 98 y TA 100, indicó que este metabolito no presenta efectos genotóxicos significativos. Los resultados de estas evaluaciones se resumen en las Figuras 14 y 15.

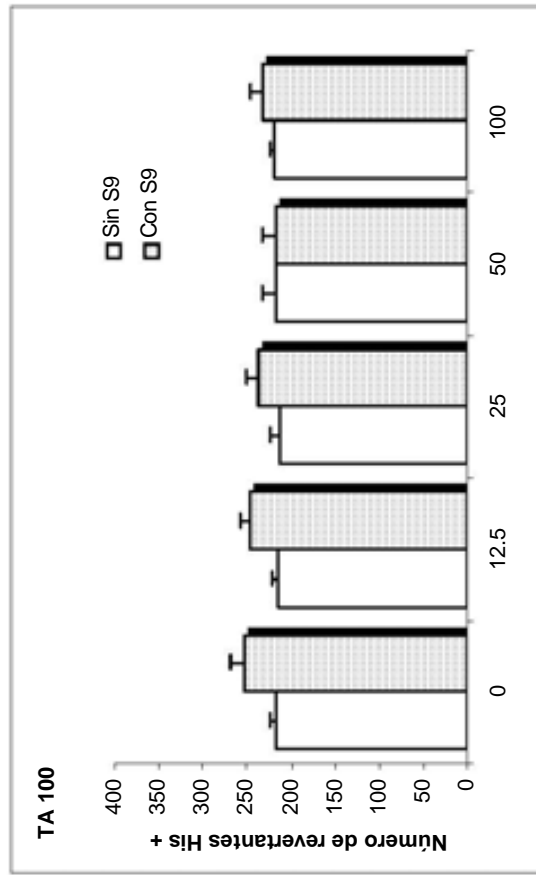
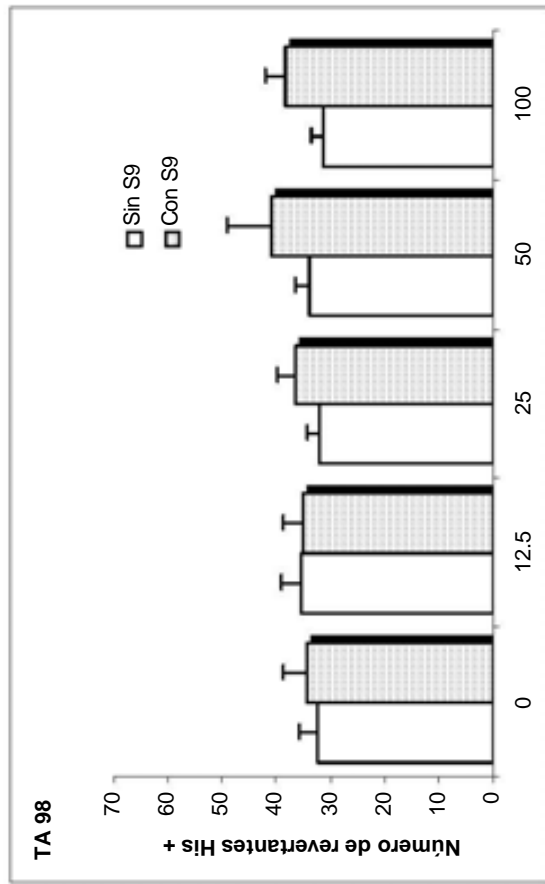
### 5.2 Pruebas de eficacia

Las pruebas de eficacia realizadas en este estudio consistieron en la determinación del potencial antinociceptivo y antiinflamatorio del extracto íntegro y compuestos derivados de la planta. Como se indicó en la sección de antecedentes, en los estudios farmacológicos anteriores se comprobó el efecto antiespasmódico *in vitro* del extracto (Estrada *et al.*, 1999). Sin embargo, es altamente probable que el uso de la planta para tratar cólicos se deba también a la presencia de sustancias analgésicas y/o antiinflamatorias en la especie.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 14.** Ensayo de mutagenicidad del extracto orgánico obtenido a partir de *S. livida* por el método de incorporación directa con y sin fracción S9 del homogenado de hígado de rata. La bacteria fue incubada con las concentraciones del extracto. El número de revertantes espontáneas (His +) sin fracción S9 fueron: TA 98  $35.7 \pm 3.6$ ; TA 100  $251.2 \pm 13.1$  y TA 102  $305.3 \pm 15.8$ . Con S9: TA 98  $39.1 \pm 4.7$ ; TA 100  $285.6 \pm 17.2$  y TA 102  $336.1 \pm 23.9$ . El número de revertantes inducidas (His +) por los distintos mutágenos fueron: TA 98:  $382 \pm 37.5$ , Ácido picrolónico;  $5416.9 \pm 726.9$ , 2-AA; TA 102:  $[3204.2 \pm 359.5$ , 2-AA;  $3873.6 \pm 187$ , Mitomicina C] y TA 100  $[826.1 \pm 47.6$ , Ciclofosfamida;  $4921.9 \pm 1877.5$ , Etilen-Nitro-Guanidina].



**Figura 15.** Ensayo de mutagenicidad del bibencilo giganteol (2) por el método de incorporación directa con y sin fracción S9 del homogenado de hígado de rata. La bacteria fue incubada con las concentraciones del extracto. El número de revertantes espontáneas (His +) sin fracción S9 fueron: TA 98  $35.7 \pm 3.6$  y TA 100  $251.2 \pm 13.1$ . Con S9: TA 98  $39.1 \pm 4.7$  y TA 100  $285.6 \pm 17.2$ . El número de revertantes inducidas (His +) por los distintos mutágenos fueron: TA 98:  $[382 \pm 37.5$ , Ácido picrolónico;  $5416.9 \pm 726.9$ , 2-AA] y TA 100  $[826.1 \pm 47.6$ , Ciclofosfamida;  $4921.9 \pm 1877.5$ , Etilen-Nitro-Guanidina].

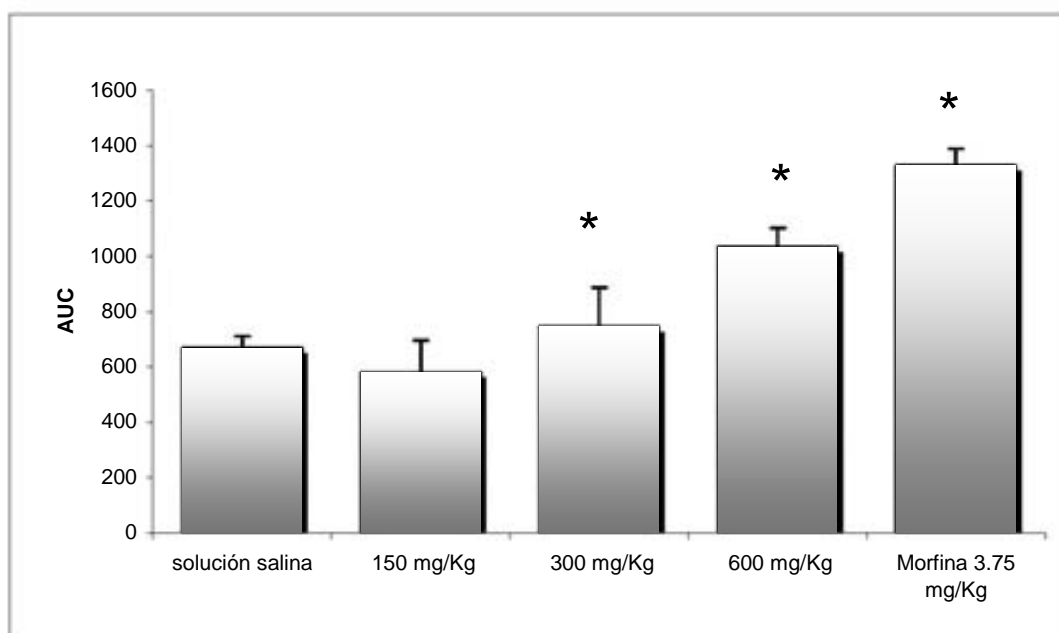
Por lo tanto, para demostrar esta hipótesis, se realizaron dos pruebas farmacológicas: en la primera se estableció el efecto antinociceptivo del extracto orgánico y los compuestos mayoritarios utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal. Posteriormente, se determinó el supuesto efecto antiinflamatorio usando el modelo de edema inducido por el polisacárido carragenina.

### **5.2.1 Determinación del efecto antinociceptivo**

#### **5.2.1.1 Modelo de la placa caliente y estiramiento abdominal**

La evaluación del efecto antinociceptivo del extracto íntegro en el modelo de la placa caliente, se realizó a las dosis de 150, 300 y 600 mg/Kg. Como se desprende de los resultados resumidos en la Figura 16, el efecto del extracto fue significativo con el tratamiento de 300 mg/Kg, a los 90 y 120 minutos (datos no mostrados). Sin embargo, a la dosis más alta ensayada (600 mg/Kg) el efecto se observó desde los 60 minutos, alcanzando un máximo a los 90 minutos, la actividad perduró por un período de 2 horas. Posteriormente, se determinó el efecto antinociceptivo del extracto a las mismas dosis en el modelo del estiramiento abdominal. Los resultados se resumen en el Cuadro 8 y la Figura 17. El efecto fue comparado con la dipirona (100 mg/Kg) utilizada como control positivo. En este caso, el extracto de la orquídea inhibió hasta en un 44 % el número de

estiramientos provocados por el estímulo químico, sin embargo, el efecto no fue dependiente de la dosis y la respuesta a las tres dosis ensayadas fue similar. Estos datos sugieren que el efecto analgésico provocado por el extracto de la planta es de utilidad también para el tratamiento del dolor inflamatorio ya que se ha descrito que el ácido acético causa un incremento en los niveles de prostaglandinas ( $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$ ) en los fluidos peritoneales (Deraedt *et al.*, 1980).

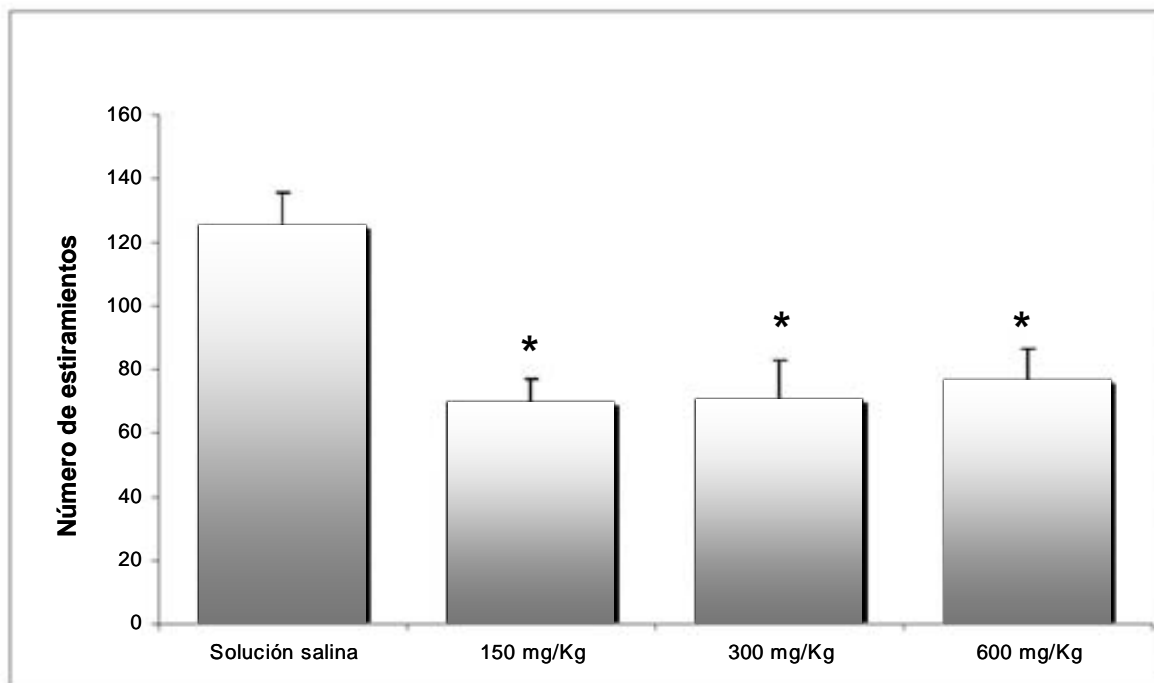


**Figura 16.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *S. livida* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media  $\pm$  E. E. de  $n=6$  animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet  $*P < 0.05$ .

**Cuadro 8.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *Scaphyglottis livida* en el modelo de estiramiento abdominal.

| Grupo           | Dosis (mg/Kg) | Número de estiramientos totales | % de inhibición |
|-----------------|---------------|---------------------------------|-----------------|
| solución salina | -             | 125.3 ± 10.4                    | 0               |
| Extracto        | 150           | 69.7 ± 7.1*                     | 44              |
| Extracto        | 300           | 70.5 ± 12.7 *                   | 44              |
| Extracto        | 600           | 76.3 ± 10.4 *                   | 40              |
| Dipirona        | 100           | 5.6 ± 1.2 *                     | 96              |

Cada valor es la media ± E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P < 0.05



**Figura 17.** Efecto antinociceptivo preliminar del extracto orgánico de *S. livida* en el modelo del estiramiento abdominal. Cada barra es la media ± E. E. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P < 0.05.

### 5.2.2 Determinación del efecto antiinflamatorio

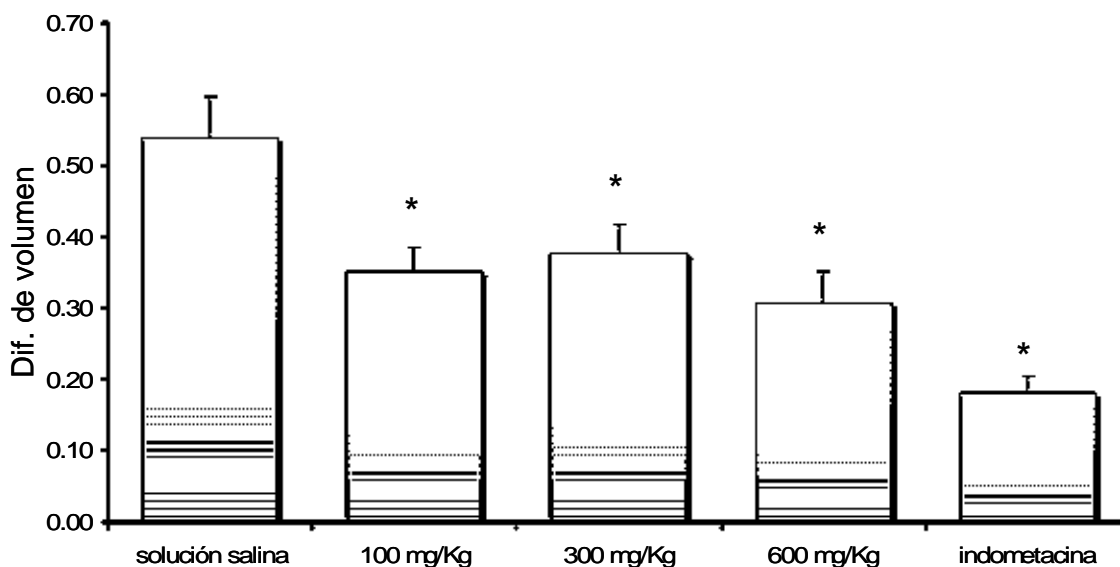
El efecto antiinflamatorio del extracto íntegro de *S. livida* se determinó a las dosis de 100, 300 y 600 mg/Kg utilizando el modelo del edema plantar inducido con carragenina en ratas. A las tres dosis ensayadas se observó un efecto antiinflamatorio significativo. A las dosis de 100 y 300 mg/Kg, la actividad se observó dos horas después de la administración de la carragenina y se mantuvo hasta cinco horas después del tratamiento. A la dosis de 600 mg/Kg, la actividad antiinflamatoria se presentó desde la primera hora y perduró durante cinco horas. Los porcentajes de reducción de la respuesta inflamatoria se muestran en el Cuadro 10. El curso del experimento se resume en el Cuadro 9 y en la Figura 18.

**Cuadro 9.** Efecto antiinflamatorio del extracto orgánico de *Scaphyglottis livida* en el modelo del edema plantar en rata inducido con carragenina.

| Grupo        | Dosis (mg/Kg) | Diferencias de volumen de las patas (mL) |            |            |            |            |            |
|--------------|---------------|--|------------|------------|------------|------------|------------|
|              |               | 1 hr                                     | 2 hrs      | 3 hrs      | 4 hrs      | 5 hrs      | 6 hrs      |
| Control      |               | 0.27±0.03                                | 0.49±0.07  | 0.59±0.08  | 0.61±0.08  | 0.66±0.09  | 0.62±0.09  |
| Extracto     | 100           | 0.21±0.03                                | 0.30±0.03* | 0.33±0.03* | 0.41±0.02* | 0.41±0.03* | 0.44±0.04  |
|              | 300           | 0.24±0.02                                | 0.31±0.01* | 0.34±0.03* | 0.38±0.02* | 0.47±0.03  | 0.52±0.02  |
|              | 600           | 0.14±0.01*                               | 0.26±0.01* | 0.27±0.03* | 0.34±0.04* | 0.40±0.02* | 0.45±0.03  |
| Indometacina | 10            | 0.12±0.01*                               | 0.24±0.02* | 0.12±0.01* | 0.17±0.02* | 0.20±0.02* | 0.25±0.03* |

Cada valor es la media ± E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P < 0.05.





**Figura 18.** Efecto antiinflamatorio del extracto orgánico de *Scaphyglottis livida* en el modelo del edema plantar inducido con carragenina en ratas. Cada barra es la media  $\pm$  E. E. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

**Cuadro 10.** Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina en ratas del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1).

| Dosis mg/Kg     | Porcentaje de inhibición, % |
|-----------------|-----------------------------|
| Solución salina | 0                           |
| 100             | 35 *                        |
| 300             | 30 *                        |
| 600             | 43 *                        |
| Indometacina 10 | 66 *                        |

### 5.3 Determinación de los principios activos antiinflamatorios y antinociceptivos de *S. livida*

Con la finalidad de establecer los principios activos antinociceptivos y antiinflamatorios se estudio un nuevo lote de la planta recolectada en el Estado de Veracruz. El estudio químico se orientó mediante la evaluación de los grupos de fracciones primarias I, II, III (F-3 a F-7), IV (F-8) y V (F-9 y F-10), a la dosis de 150 mg/Kg, en el ensayo de estiramiento abdominal. La mayor actividad se concentró en las fracciones II y IV que provocaron una disminución de los estiramientos en un 44 %. El estudio fitoquímico de estas fracciones permitió el aislamiento de los metabolitos: gigantol (**2**), 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (**78**), batasina III (**14**), 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (**77**) y 24,24-dimetil-9,19-lanosta-25-en-3-ol (**19**). Los productos **2** y **19** se obtuvieron en cantidades adecuadas para su evaluación como agentes antinociceptivos y antiinflamatorios. El 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (**78**) y el 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (**77**) se describen por vez primera en esta especie. En tanto, que el metabolito **77** se describe por segunda vez en la naturaleza. Los compuestos **2**, **14** y **19** se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las de muestras auténticas. Sin embargo, el 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (**78**) y la 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (**77**) se caracterizaron mediante el análisis de sus constantes espectroscópicas.

### **5.3.1 Caracterización de la 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (ciclobalanona) (77)**

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos **77** y **78** se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

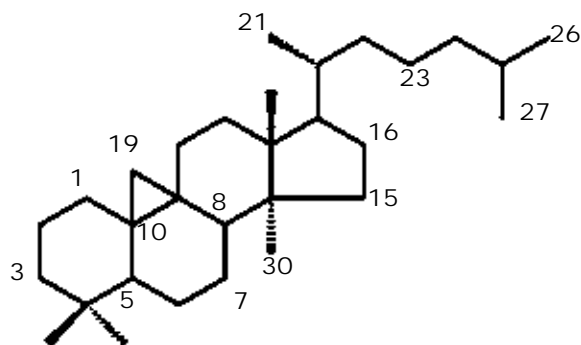
El compuesto **77** se obtuvo como un sólido blanco con un punto de fusión de 186-187 °C. El espectro en el IR presentó absorciones asociadas con la presencia de grupos carbonilo ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ), metino, metilo y metileno ( $2957$  y  $2866\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de masas generado por la técnica de impacto electrónico (EMIE) presentó un ión molecular en una relación de masa-carga ( $m/z$ ) de 452 uma (pico base). La fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}$  y permite siete grados de insaturación (Cuadro 11).

Consideraciones de tipo quimiotaxonómico, así como la información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 2 y 3) permitieron establecer que, el compuesto **77** es un triterpeno con un núcleo cicloartano (Figura 19).

Las señales más importantes de los espectros de RMN son las siguientes:

1) En  $\delta_{\text{H}}$  de 4.72 y 4.66 se aprecian dos singuletes asignables a los protones de un metileno vinílico de una doble ligadura terminal en la molécula. Esta señal correlaciona en el espectro HSQC con la absorción en  $\delta_{\text{C}}$  de 109.3.

2) En  $\delta_H$  0.89, 0.98, 1.02, 1.05, 1.10 y 1.56 se observan singuletes asignables a 6 metilos. Esta última correlaciona con la absorción en  $\delta_C$  75 en el espectro HSQC y corresponde a un metilo sobre una doble ligadura terminal. El análisis detallado de los cuadros de conectividad en el espectro COSY permitió corroborar la ubicación del metilo.

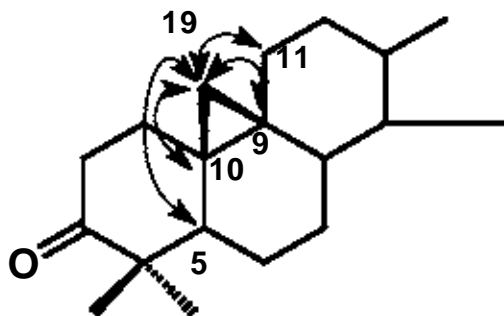


**Figura 19.** Núcleo base de tipo cicloartano.

3) En  $\delta_H/\delta_C$  2.71 y 2.32/ 37.5 se observan dos señales múltiples asignables a los hidrógenos en C-2 del núcleo base. El desplazamiento químico del conjunto de señales sugiere la presencia de un grupo carbonilo en C-3.

4) En  $\delta_H/\delta_C$  0.76 y 0.78/ 29.6 se observan los dobletes ( $J = 4$  Hz) característicos del ciclopropilo presente en el núcleo cicloartano. Las correlaciones H-19/C-9, C-10, C-11 y C-5 en el espectro HMBC confirmaron la ubicación del ciclopropilo (Figura 20).

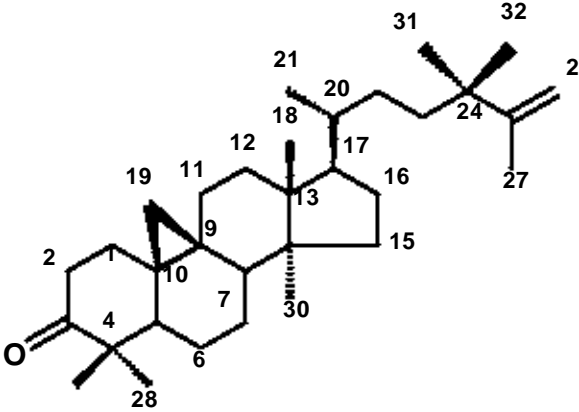
5) En  $\delta_c$  216.7 (C-3), 152.4 (C-25), 48.7 (C-4), 37.3 (C-9), 45.2 (C-10), 38.7 (C-13 y C-14) y 50.2 (C-24) se observan siete señales asignables a ocho carbonos cuaternarios, uno a un grupo carbonilo de cetona, otro a una doble ligadura y los restantes a carbonos *ipso*.



**Figura 20.** Correlaciones más importantes observadas para los protones H-19 en el espectro bidimensional HMBC del compuesto **77**.

Con base en las evidencias presentadas el producto natural se caracterizó como 24,24-dimetil-9,19-ciclolanosta-25-en-3-ona (**77**). Con el aislamiento de este triterpenoide de *S. livida*, el metabolito **77** se describe por segunda ocasión como producto natural; anteriormente se reportó su presencia en *Taxodium ascendens*. Las constantes espectroscópicas encontradas en esta investigación se encuentran en perfecta armonía con las descritas en la literatura (Ying *et al.*, 2005)

**Cuadro 11.** Características físicas y espectroscópicas de la ciclobalanona (**77**).

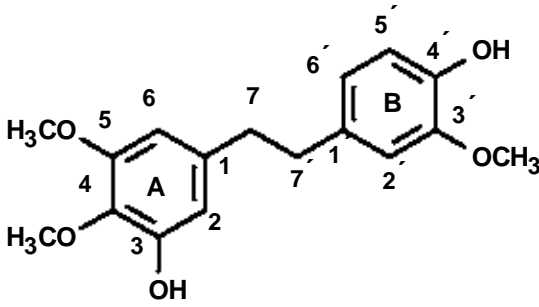
|  |   |
|--|---|
|  <p style="text-align: center;">Ciclobalanona (<b>77</b>)</p> | <p>Sólido blanco con un punto de fusión de 186-187 °C.</p> <p><b>IR (KBr):</b> 1709 (C=O), 2957 y 2866 cm<sup>-1</sup>.</p> <p><b>EIMS:</b> <i>m/z</i> (rel. int.) 452 [M<sup>+</sup> (100)], 437 [M-15 (32)].</p> <p><b><sup>1</sup>H RMN δ (ppm):</b> 0.57 (d, <i>J</i> = 4 Hz, H-19); 0.78 (s, <i>J</i> = 4 Hz, H-19); 0.89 (s, CH<sub>3</sub>-18 y 30); 0.98 (s, CH<sub>3</sub>-31 y 32); 1.02 (d, <i>J</i> = 8 Hz, CH<sub>3</sub>-21); 1.05 (s, CH<sub>3</sub>-28); 1.56 (s, CH<sub>3</sub>-27); 2.32 (m, H-2β); 2.71 (m, H-2α); 4.66 (sa, H-26α); 4.72 (sa, H-26β).</p> |
|--|---|

### 5.3.2 Elucidación estructural del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (**78**)

El producto **78** se aisló como un aceite rosado. El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con el carácter aromático de la molécula (3015, 1648 y 987 cm<sup>-1</sup>) y la presencia de grupos hidroxilo de naturaleza fenólica (3200

cm<sup>-1</sup>). La fórmula molecular del compuesto se determinó por EMIE como C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub> y permite ocho grados de insaturación (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Características físicas y espectroscópicas del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (**78**).

|  |  |
|--|--|
|  <p>3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (<b>84</b>)</p> | <p>Aceite rosado</p> <p><b>IR (KBr):</b> 3015, 1648, 987 cm<sup>-1</sup>.</p> <p><b>EIMS: <i>m/z</i> (rel. int.)</b> 304 [M<sup>+</sup> (73)], 181 [M-123 (63)], 167 [M-137 (100)], 137 (70).</p> <p><b><sup>1</sup>H RMN δ (ppm):</b> 6.46 (d, <i>J</i> = 1.8 Hz, H-2); 6.23 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, H-6); 2.8 (m, H-7 y H-7'); 6.63 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2'); 6.83 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, H-5'); 5.75 (sa, OH-3); 5.51 (sa, OH-4'); 3.81 (s, OCH<sub>3</sub>-4); 3.85 (s, OCH<sub>3</sub>-5); 3.87 (s, OCH<sub>3</sub>-3').</p> |
|--|--|

Los espectros de RMN del producto resultaron muy similares a los del gigantol (**2**), producto previamente aislado de *S. livida* (Estrada *et al.*, 1999).

La principal diferencia observada en los espectros de RMN del gigantol (**2**) y el producto **78** (Cuadro 13) consiste en la presencia de señales para un grupo metoxilo adicional en C-4 en los espectros del estilbenoide **78**.





**Cuadro 13.** Datos espectroscópicos observados en los espectros de RMN de lo bibencilos **2** y **78**.

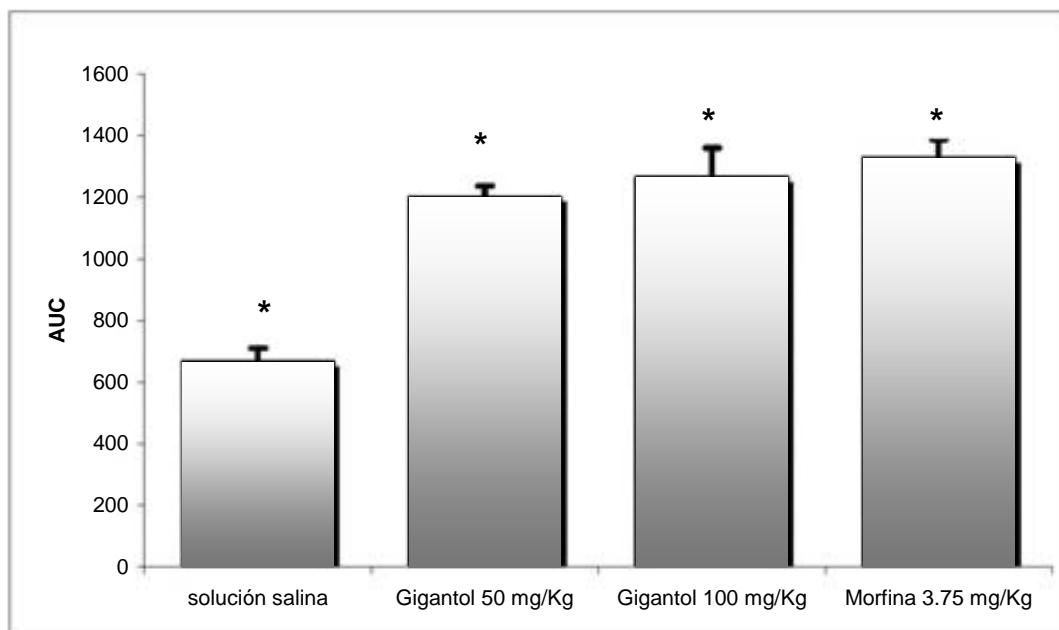
| POSICION             | Gigantol (2)            |            | Compuesto 78                    |            |
|----------------------|-------------------------|------------|---------------------------------|------------|
|                      | $\delta_H$              | $\delta_C$ | $\delta_H$                      | $\delta_C$ |
| 1                    |                         | 144.5      |                                 | 133.62     |
| 2                    | 6.29                    | 108.1      | 6.46 (d, $J = 1.8$ Hz)          | 107.87     |
| 3                    |                         | 156.7      |                                 | 143.75     |
| 4                    | 6.29                    | 99.2       |                                 | 149.04     |
| 5                    |                         | 160.9      |                                 | 149.04     |
| 6                    | 6.29                    | 106.9      | 6.23 (d, $J = 1.5$ Hz)          | 105.51     |
| 7                    | 2.83                    | 38.1       | 2.8 (m)                         | 38.33      |
| 1'                   |                         | 133.7      |                                 | 138.13     |
| 2'                   | 6.77 (dd, $J = 9.2$ Hz) | 114.3      | 6.63 (d, $J = 2.1$ Hz)          | 111.14     |
| 3'                   | 6.81 (d, $J = 9$ Hz)    | 146.3      |                                 | 152.04     |
| 4'                   |                         | 143.8      |                                 | 146.25     |
| 5'                   |                         | 111.4      | 6.83 (d, $J = 7.8$ Hz)          | 114.17     |
| 6'                   | 6.65 (d, $J = 2$ Hz)    | 121        | 6.69 (dd, $J = 8.1$ y $2.1$ Hz) | 120.98     |
| 7'                   | 2.83                    | 37.1       | 2.8 (m)                         | 37.48      |
| OH-3                 | 5.57                    |            | 5.75 (sa)                       | -          |
| OCH <sub>3</sub> -4  |                         |            | 3.81 (s)                        | 55.85      |
| OCH <sub>3</sub> -5  | 3.85                    | 55.2       | 3.85 (s)                        | 55.78      |
| OCH <sub>3</sub> -3' |                         |            | 3.87 (s)                        | 60.95      |
| OH-4'                | 5.57                    |            | 5.51 (sa)                       | -          |
| OCH <sub>3</sub> -5' | 3.77                    | 55.9       |                                 |            |

### **5.3.3 Evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del gigantol (2)**

En el modelo del estiramiento abdominal, el gigantol (2) fue evaluado a las dosis de 25, 50 y 100 mg/Kg; los porcentajes de inhibición de los estiramientos fueron del 42, 42 y 45 % (Cuadro 14), respectivamente. En el modelo de la placa caliente el producto natural se evaluó a las dosis de 50 y 100 mg/Kg, los resultados se presentan en la Figura 22. En este caso se observó también un efecto desde los 60 minutos y hasta el fin del experimento, comparable con el efecto de la morfina a la dosis de 3.75 mg/Kg. Estos resultados indican claramente el potencial analgésico del estilbenoide.

#### **5.3.3.1 Caracterización del mecanismo de acción antinociceptivo del gigantol (2) en presencia de naloxona, L-NAME y glibenclamida**

Con la finalidad de establecer el mecanismo de acción por el cual el gigantol (2) provoca su efecto analgésico, se realizaron varios experimentos en el modelo de la placa caliente. El diseño experimental utilizado consistió en el pretratamiento de los animales, en diferentes experimentos, con naloxona (antagonista no selectivo de los opioides), L-NAME (inhibidor de la sintasa del óxido nítrico) y glibenclamida (un bloqueador de canales de potasio). De esta manera se bloquearían las vías de señalización más importantes que regulan la transmisión del dolor.



**Figura 22.** Efecto antinociceptivo del gigantol (**2**) en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media  $\pm$  E. E. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

**Cuadro 14.** Efecto antinociceptivo del bibencilo gigantol (**2**) en el modelo del estiramiento abdominal.

| Grupo          | Dosis (mg/Kg) | Número de estiramientos totales | % de inhibición |
|----------------|---------------|---------------------------------|-----------------|
| Control salina | -             | 205.6 $\pm$ 10.7                | 0               |
| Gigantol       | 25            | 120.2 $\pm$ 13.7*               | 42              |
| Gigantol       | 50            | 119.5 $\pm$ 7.7 *               | 42              |
| Gigantol       | 100           | 113.9 $\pm$ 9.9 *               | 45              |
| Dipirona       | 100           | 5.6 $\pm$ 1.2 *                 | 96              |

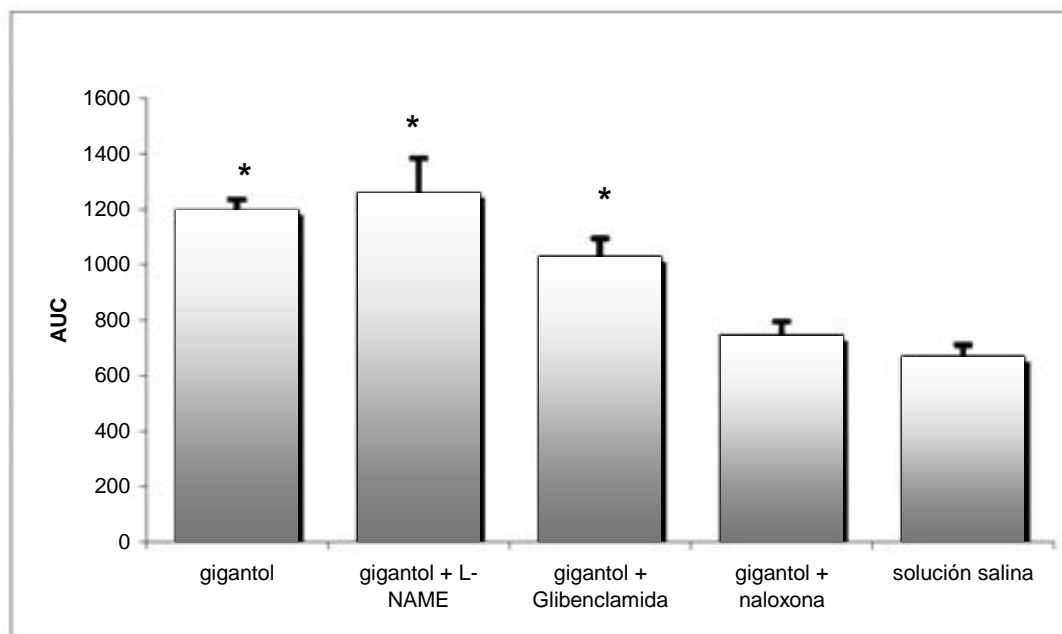
Cada valor es la media  $\pm$  E. E. de 6 ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinados por un análisis ANADEVVA seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.01.

Los resultados obtenidos (Figura 23) muestran una disminución significativa en el tratamiento previo con la naloxona, mientras que el pretratamiento con la glibenclamida y el L-NAME no disminuyeron el efecto causado por el gigantol (**2**) a la dosis de 50 mg/Kg. Por lo tanto se puede concluir que el metabolito **2** es un antagonista opioide. Posteriormente, se evaluó el efecto antiinflamatorio de **2** a las dosis de 12.5, 25, 50 y 100 mg/Kg utilizando el modelo del edema plantar inducido en rata.

En el Cuadro 15 y en la Figura 24 se muestran los resultados del experimento, en donde claramente se aprecia que el compuesto **2** exhibe un efecto antiinflamatorio significativo y dependiente de la dosis.

#### **5.3.4 Evaluación del efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del triterpenoide 24, 24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (19)**

El otro metabolito presente en las fracciones activas, 24, 24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**), presentó una actividad analgésica importante en el modelo del estiramiento abdominal. Los resultados farmacológicos están resumidos en el Cuadro 16 y en la Figura 25.

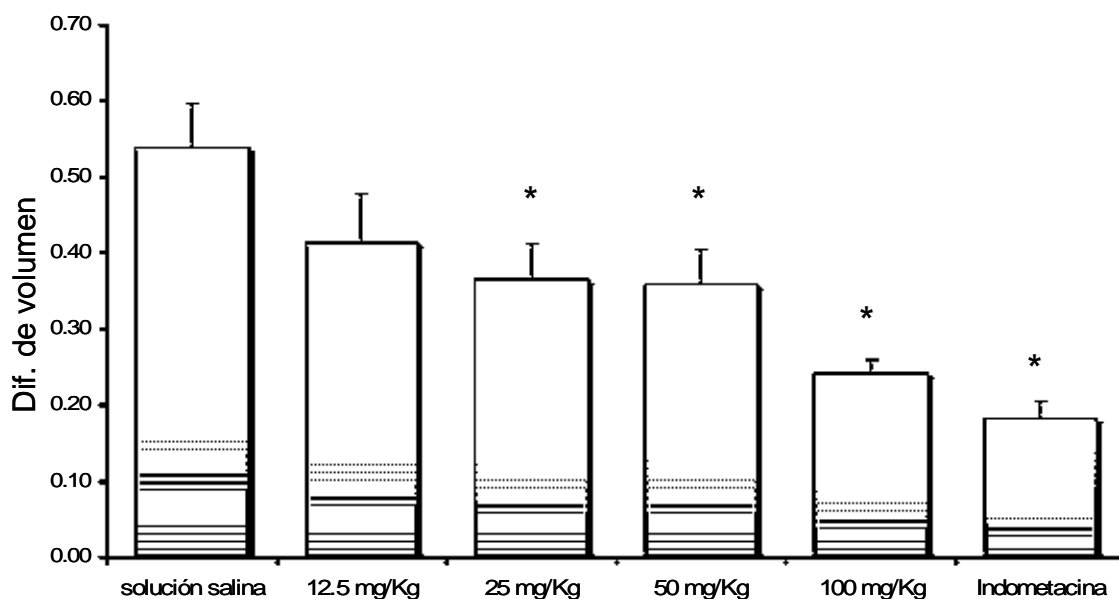


**Figura 23.** Efecto de diferentes antagonistas sobre la acción antinociceptiva del gigantol (2). Cada barra es la media  $\pm$  E. E. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

**Cuadro 15.** Efecto antiinflamatorio del gigantol (2) en el modelo del edema plantar en rata inducido con carragenina.

| Grupo        | Dosis (mg/Kg) | Diferencias de volumen de las patas (mL) |                  |                  |                  |                  |                  |
|--------------|---------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|              |               | 1 hr                                     | 2 hrs            | 3 hrs            | 4 hrs            | 5 hrs            | 6 hrs            |
| Control      |               | 0.27 $\pm$ 0.03                          | 0.49 $\pm$ 0.07  | 0.59 $\pm$ 0.08  | 0.61 $\pm$ 0.08  | 0.66 $\pm$ 0.09  | 0.62 $\pm$ 0.09  |
| Gigantol     | 12,5          | 0.12 $\pm$ 0.03*                         | 0.38 $\pm$ 0.05  | 0.46 $\pm$ 0.05  | 0.46 $\pm$ 0.05  | 0.55 $\pm$ 0.06  | 0.52 $\pm$ 0.07  |
|              | 25            | 0.15 $\pm$ 0.02*                         | 0.33 $\pm$ 0.03  | 0.40 $\pm$ 0.03  | 0.43 $\pm$ 0.04  | 0.43 $\pm$ 0.02* | 0.45 $\pm$ 0.02  |
|              | 50            | 0.13 $\pm$ 0.02*                         | 0.38 $\pm$ 0.05  | 0.40 $\pm$ 0.05  | 0.42 $\pm$ 0.07  | 0.41 $\pm$ 0.06* | 0.42 $\pm$ 0.07  |
|              | 100           | 0.17 $\pm$ 0.02*                         | 0.22 $\pm$ 0.06* | 0.25 $\pm$ 0.06* | 0.25 $\pm$ 0.04* | 0.26 $\pm$ 0.03* | 0.30 $\pm$ 0.04* |
| Indometacina | 10            | 0.12 $\pm$ 0.01*                         | 0.24 $\pm$ 0.02* | 0.12 $\pm$ 0.01* | 0.17 $\pm$ 0.02* | 0.20 $\pm$ 0.02* | 0.25 $\pm$ 0.03* |

Cada valor es la media  $\pm$  E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

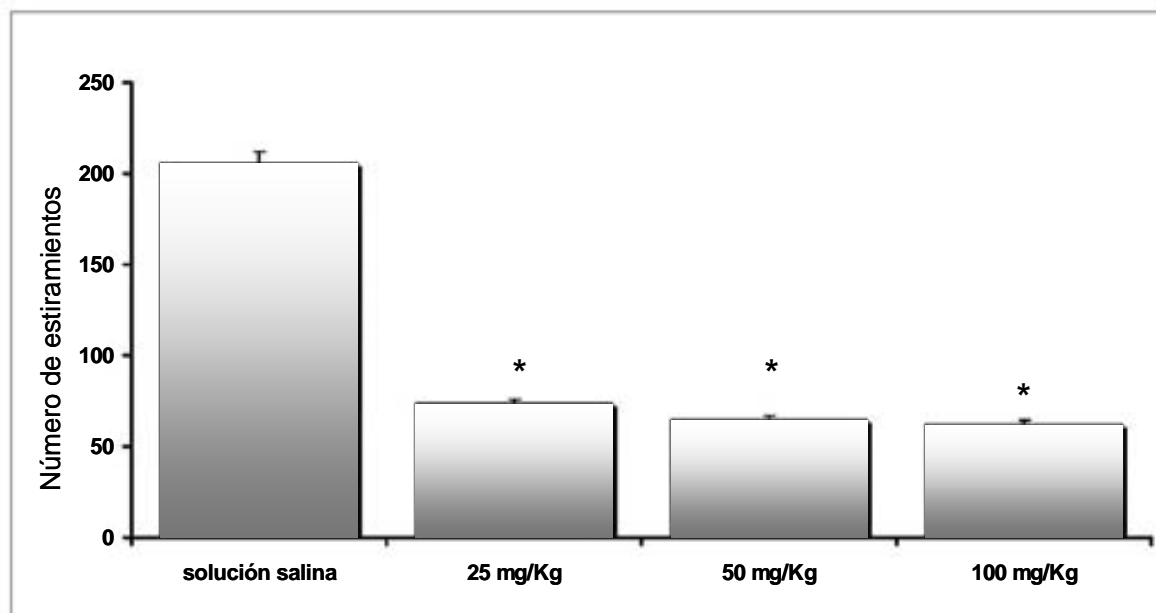


**Figura 24.** Efecto antiinflamatorio del gigantol (**2**) en el edema plantar inducido con carragenina en rata. Cada barra es la media  $\pm$  E. E. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

**Cuadro 16.** Efecto antinociceptivo del triterpenoide 24, 24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (**19**) en el modelo del estiramiento abdominal.

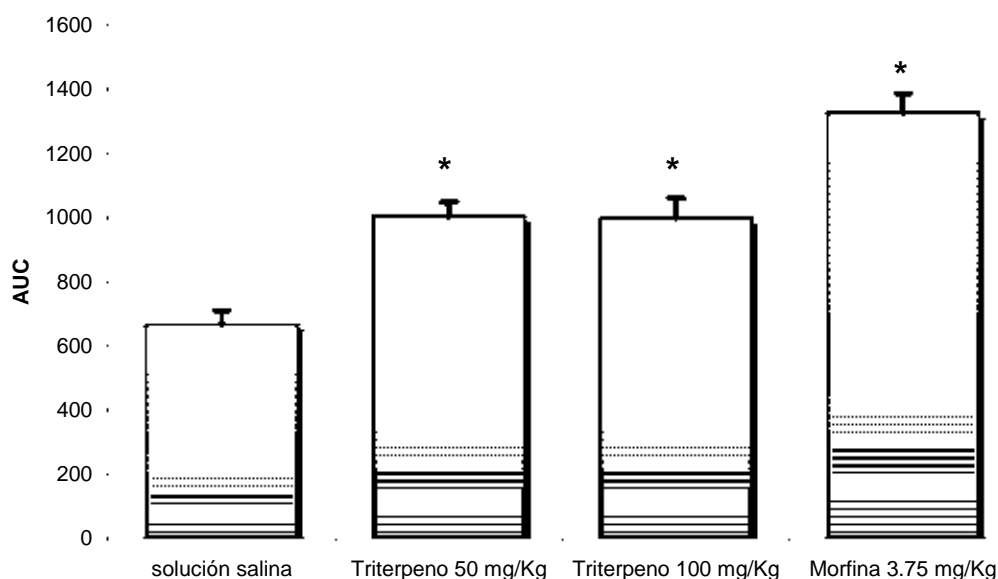
| Grupo           | Dosis (mg/Kg) | No. de estiramientos totales | % de inhibición |
|-----------------|---------------|------------------------------|-----------------|
| Solución salina | -             | 205.6 $\pm$ 10.7             | 0               |
| Triterpenoide   | 25            | 73.2 $\pm$ 12.7*             | 63              |
| Triterpenoide   | 50            | 64.83 $\pm$ 6.7*             | 68              |
| Triterpenoide   | 100           | 47.8 $\pm$ 25.4*             | 77              |
| Dipirona        | 100           | 5.6 $\pm$ 1.2*               | 96              |

Cada valor es la media  $\pm$  E. E. de 6 ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.



**Figura 25.** Efecto antinociceptivo del 24,24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (19) en el modelo del estiramiento abdominal. Cada barra representa la media  $\pm$  E. E. de n=6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet \*P<0.05.

En el modelo de la placa caliente, sin embargo, y como era de esperarse, el efecto antinociceptivo del triterpeno fue moderado. En consecuencia el mecanismo de acción de este producto debe involucrar la inhibición de la ciclooxigenasa u otra enzima involucrada en el metabolismo del ácido araquidónico (Franzotti *et al.*, 2000; Peana *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004). Los resultados de la actividad antiinflamatoria del triterpeno se indican en los Cuadros 17, 18 y en la Figura 26.



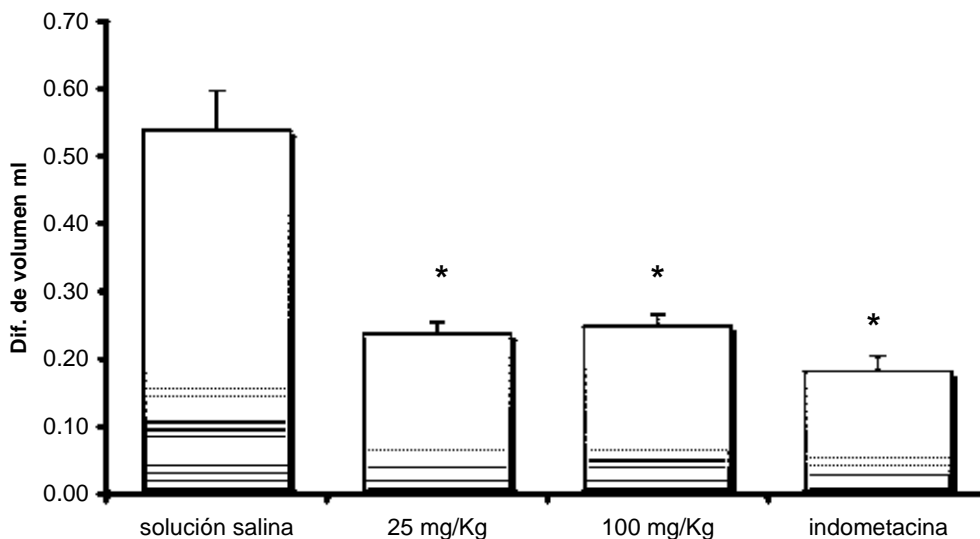
**Figura 26.** Efecto antinociceptivo del 24, 24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (19) en el modelo de la placa caliente. Cada barra representa la media  $\pm$  E. E. de n=6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet \*P<0.05.

**Cuadro 17.** Efecto antiinflamatorio del 24, 24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11), 25-dien-3 $\beta$ -ol (19) en el modelo del edema plantar inducido con carragenina en rata.

| Grupo        | Dosis (mg/Kg) | Diferencias de volumen de las patas (mL) |                  |                  |                  |                  |                  |
|--------------|---------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|              |               | 1 hr                                     | 2 hrs            | 3 hrs            | 4 hrs            | 5 hrs            | 6 hrs            |
| Control      |               | 0.27 $\pm$ 0.03                          | 0.49 $\pm$ 0.07  | 0.59 $\pm$ 0.08  | 0.61 $\pm$ 0.08  | 0.66 $\pm$ 0.09  | 0.62 $\pm$ 0.09  |
| Compuesto    | 25            | 0.21 $\pm$ 0.02                          | 0.21 $\pm$ 0.03* | 0.20 $\pm$ 0.04* | 0.24 $\pm$ 0.05* | 0.31 $\pm$ 0.07* | 0.26 $\pm$ 0.08* |
|              | 50            | 0.26 $\pm$ 0.01                          | 0.21 $\pm$ 0.01* | 0.21 $\pm$ 0.01* | 0.23 $\pm$ 0.02* | 0.32 $\pm$ 0.02* | 0.26 $\pm$ 0.02* |
| Indometacina | 10            | 0.12 $\pm$ 0.01*                         | 0.24 $\pm$ 0.02* | 0.12 $\pm$ 0.01* | 0.17 $\pm$ 0.02* | 0.20 $\pm$ 0.02* | 0.25 $\pm$ 0.03* |

Cada valor es la media  $\pm$  E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba Dunnet \*P< 0.05





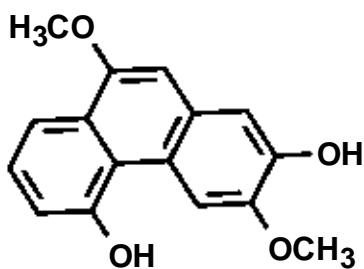
**Figura 27.** Efecto antiinflamatorio del 24,24-dimetil-5 $\alpha$ -lanosta-9(11),25-dien-3 $\beta$ -ol (19) en el modelo del edema plantar inducido con carragenina en rata. Cada barra representa la media  $\pm$  E. E. de n=6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet \*P<0.05.

**Cuadro 18.** Porcentaje de inhibición del edema plantar inducido con carragenina en ratas del metabolito (19).

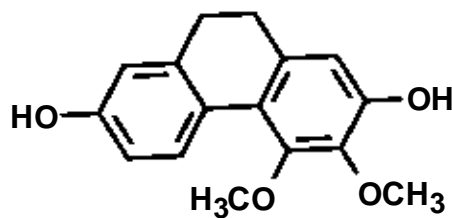
| Dosis mg/Kg     | Porcentaje de inhibición % |
|-----------------|----------------------------|
| Solución salina | 0                          |
| 25              | 56 *                       |
| 100             | 54 *                       |
| Indometacina 10 | 66 *                       |

### 5.3.5 Determinación del efecto antinociceptivo de los fenantrenos 75 y 76.

Con la finalidad de establecer si los estilbenoides de tipo fenantreno, tan comunes en las orquídeas, incluyendo a *S. livida*, presentan también efecto analgésico se decidió evaluar el fimbriol A (**75**) y la eriantridina (**76**), metabolitos previamente aislados de *M. densa* y disponibles en gran cantidad. En esta ocasión fue imposible evaluar los fenantrenos presentes (Coelonina (**15**), 3,7-dihidroxi-2,4,8-trimetoxifenantreno (**16**) y 3,7-dihidroxi-2,4-dimetoxifenantreno (**17**)) en *S. livida*, debido al bajo rendimiento en que se obtuvieron. De acuerdo a los resultados de estas evaluaciones (Cuadros 19 y 20 y Figuras 28 y 29) los fenantrenos presentaron un efecto analgésico significativo a las dosis ensayadas.



(75)

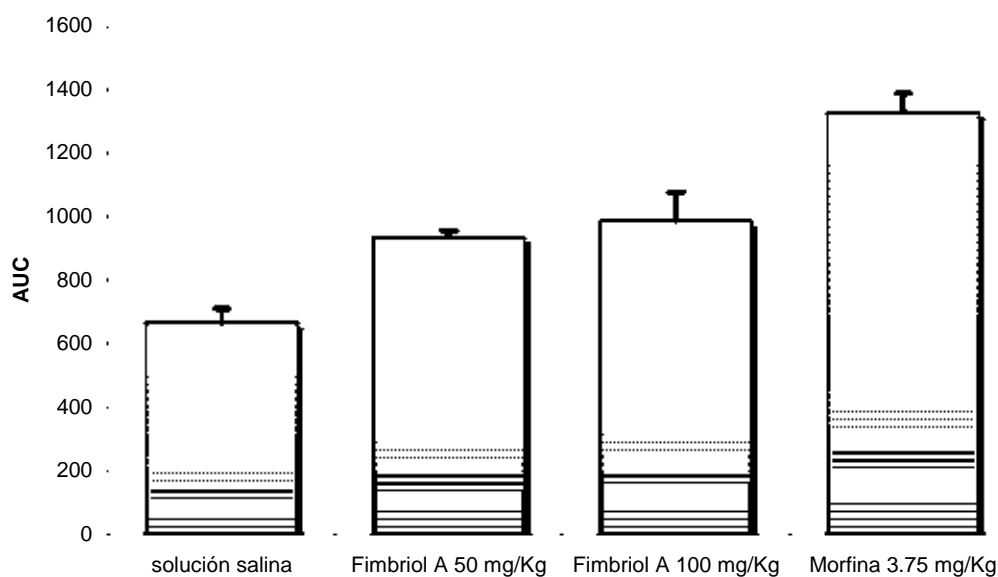


(76)

**Cuadro 19.** Efecto antinociceptivo del fenantreno fimbriol A (75) en el modelo del estiramiento abdominal.

| Grupo           | Dosis (mg/Kg) | No. de estiramientos totales | % de inhibición |
|-----------------|---------------|------------------------------|-----------------|
| Solución salina | -             | 205.6 ± 10.7                 | 0               |
| Fimbriol A      | 25            | 64 ± 8.4*                    | 69              |
| Fimbriol A      | 50            | 88.5 ± 12.5*                 | 57              |
| Fimbriol A      | 100           | 96.8 ± 13.7*                 | 53              |
| Dipirona        | 100           | 5.6 ± 1.2*                   | 96              |

Cada valor es la media ± E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P< 0.05.

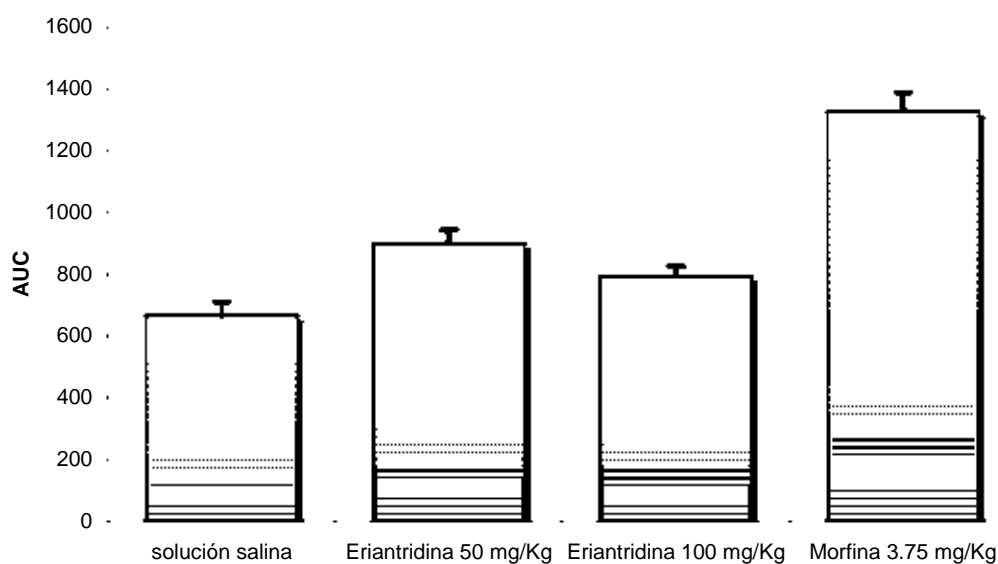


**Figura 28.** Efecto antinociceptivo del fimbriol A (75) en el modelo de la placa caliente. Cada barra representa la media ± E. E. de n=6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet \*P<0.05.

**Cuadro 20.** Efecto antinociceptivo del fenantreno eriantridina (76) en el modelo de estiramiento abdominal.

| Grupo           | Dosis (mg/Kg) | No. de estiramientos totales | % de inhibición |
|-----------------|---------------|------------------------------|-----------------|
| Solución salina | -             | 205.7 ± 10.7                 | 0               |
| Eriantridina    | 25            | 72.3 ± 10.6*                 | 65              |
| Eriantridina    | 50            | 96.8 ± 13.7*                 | 53              |
| Eriantridina    | 100           | 86.8 ± 14.7*                 | 58              |
| Dipirona        | 100           | 5.6 ± 1.2*                   | 96              |

Cada valor es la media ± E. E. de n = 6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet \*P < 0.05.



**Figura 29.** Efecto antinociceptivo de la eriantridina (76) en el modelo de la placa caliente. Cada barra representa la media ± E. E. de n=6. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de salina fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet \*P < 0.05.

## VI. CONCLUSIONES

- El presente trabajo de investigación contiene la información científica relacionada con la seguridad y eficacia de la especie *Scaphyglottis livida* Lindley (Orchidaceae), planta medicinal ampliamente utilizada en la medicina tradicional del Estado de Veracruz para el tratamiento de cólicos y para evitar el aborto, entre otros problemas de salud. Los resultados obtenidos en los ensayos de mutagenicidad y de toxicidad aguda sugieren la inocuidad del extracto orgánico íntegro de la planta. Las pruebas farmacológicas a las cuales se sometió el extracto y metabolitos mayoritarios de la especie permitieron establecer sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias, mismas que posiblemente contribuyen al efecto terapéutico de *S. livida* para el tratamiento de cólicos estomacales.
- Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con la finalidad de establecer el mecanismo de acción mediante el cual el gigantol (**2**), metabolito activo mayoritario de la especie, ejerce su actividad antinociceptiva sugiere la participación de los receptores de tipo opioide.
- En el presente trabajo, además de los constituyes descritos por Estrada *et al.*, (1999, 2000) se aislaron dos compuestos novedosos en la especie, la ciclobalanona (**77**) y el 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibencilo (**78**). La ciclobalanona (**77**) puede constituir el compuesto marcador de la especie ya que se detectó en dos colectas diferentes de *S. livida* y tiene una distribución taxonómica restringida.

## VII. PERSPECTIVAS

1. Realizar experimentos adicionales con la finalidad de establecer el mecanismo de acción antiinflamatorio tanto del extracto como de los metabolitos secundarios activos.
2. Determinar el tipo de receptores opioides con los cuales el gigantol (2) interactúa para ejercer su acción antinociceptiva.
3. Realizar las pruebas de identidad microscópica de tipo etnobotánica de la especie.
4. Establecer y validar el método analítico para la cuantificación del o de los compuestos marcadores y activos de la especie.

**VIII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ahn, K. S., Kim, J. H., Oh, S. R., Ryu, S.Y. y Lee, H. K. (2000). Inhibitory activity of stilbenes from medicinal plants on the expression of cell adhesion molecules on THP1 cells. *Planta Med.* **66**, 641-644.
2. Allison, A. C., Cacabelos, R., Lombardi, V. R. M., Álvarez, X. A. y Vigo, C. (2001). Celastrol, a potent antioxidant and anti-inflammatory drugs, as possible treatment for Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **25**, 1341-1357.
3. Ames, B. N., Lee, F. D. y Durston, W. E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **70**, 782-786.
4. Ames, B.N., McCann, J. y Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364.
5. Ames, O. y Correl, D. (1952). Orchids of Guatemala. Fieldiana Botany Chicago Natural History Museum, **26**, 12.
6. An, S. J., Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Jeong, S., Jang, S. I., Oh, H., Kwon, T. O., Song, C. E. y Chung, H. T. (2002). Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 productions and NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1173-1181.

7. Aria, Y., Shiojima, K. y Ageta, H. (1989). Fern Constituents: Cyclopodmenyl acetate, a cycloartanoid having a new 33-carbons skeletons, isolated from *Polypodium vulgare*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 560-562.
8. Asongalem, E. A., Foyet, H. S., Ekobo, S., Dimo, T. y Kamtchouing, P. (2004). Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acathus montanus* (Ness) T. Anderson. *J. Ethnopharmacol.* **95**, 63-68.
9. Atwood, J. T. (1986). The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana*, **9**, 171-186.
10. Bai, L., Yamaki, M., Inoue, K. y Takagi, S. (1990). Blestrin A and B, bis (dihydrophenanthrene) ethers from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **29**, 1259-1260.
11. Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Yamaki, M. y Takagi, S. (1991). Blestrianol A, B and C, biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **30**, 2733-2735.
12. Bai, L., Kato, T., Inoue, K., Yamaki, M. y Takagi, S. (1993). Stilbenoids from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **33**, 1481-1483.
13. Bai, L., Yamaki, M., Yamagata, Y. y Takagi, S. (1996). Shanciol, a dihydrophenanthropyran from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **41**, 625-628.
14. Bai, L., Yamaki, M. y Takagi, S. (1996). Stilbenoids from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **42**, 853-856.
15. Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. y Takagi, S. (1997). Two bibenzyl glucosides from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **44**, 1565-1567.



16. Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. y Takagi, S. (1998). A polyphenol and two bibenzyls from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **47**, 1637-1640.
17. Bai, L., Masukawa, N., Yamaki, M. y Takagi, S. (1998). Four stilbenoids from *Pleione bulbocodioides*. *Phytochemistry*, **44**, 1565-1567.
18. Baxter, H. (1994). Stilbenoids. En: *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Ed. Taylor and Francis. London, 509-518.
19. Behbehani, M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* **46**, 575-605.
20. Belvisi, M. G., Brown, T. J., Wicks, S. y Foster, M. L. (2001). New glucocorticosteroids with an improved therapeutic ratio. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**, 221-227.
21. Benson, D. M. (1997). Analgesia in renal colic. *Ann. Emerg. Med.* **29**, 297-299.
22. Bergstrom, G., Birgersson, G., Groth, I. y Nilsson, A. (1992). Floral fragrance disparity between three taxa of lady's slipper *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae). *Phytochemistry*, **31**, 2315-2319.
23. Bhandari, S. R. y Kapadi, A. H. (1983). A 9, 10-dihydrophenanthrene from tuber of *Eulophia nuda*. *Phytochemistry*, **22**, 747-748.
24. Bhandari, S. R., Kapadi, A. H., Majumder, P. L., Joardar, M. y Shoolery, J.N. (1985). Nudol, a phenanthrene of the Orchids *Eulophia nuda*, *Eria carinata* and *Eria stricta*. *Phytochemistry*, **24**, 801-804.

25. Block, L. C., Santos, A. R. S., de Souza, M., Scheidt, C., Yunes, R. S., Santos, M. A., Delle Monache, F. y Filho, V. C. (1998). *J. Ethnopharmacol.* **61**, 85-89.
26. Bodnar, R. J., Williams, C. L., Lee, S. J. y Pasternak, G. W. (1988). Role of mu1-opiate receptors in supraspinal opiate analgesia: a microinjection study. *Brain Res.* **447**. 25-34.
27. Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy. Phytochemistry medicinal plants. Second edition. Lavoisier Publishing, París.
28. Burstein, S. H., Karst, M., Schneider, U. y Zurier, R. B. (2004). Ajulemic acid: A novel cannabinoid produces analgesia without "high". *Life sci.* **75**, 1513-1522.
29. Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R. S., Cechinel, F. V. y Yunes, R. A. (2000). Review article: Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* **14**, 401-418.
30. Calixto, J. B., Otuki, M. F. y Santos A. R. S. (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). *Planta Med.* **69**, 973-983.
31. Calixto, J. B., Campos. M. M., Otuki. M. F. y Santos A. R. S. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* **70**, 93-103.
32. Carmona, G. (1995 y 1996) Comunicación personal.

33. Chen, Y-C., Shen, S-C., Chen, L-G., Lee, T. J. F. y Yang, L. L. (2001). Wogonin, baicalin and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1417-1427.
34. Chien-Chih, C., Yu-Ling, H., Young-Ji, S., Ray-Ling, H., Tail-Ti, F. y Chien-Chang, S. (2003). Synthesis of antioxidative moscatilin and its bibenzyls derivatives. *Chin. Pharm. J.* **55**, 381-390.
35. Chiou, W. F., Peng, C. H., Chen, C. F. y Chou, C. J. (2003). Anti-inflammatory properties of piperolactam S: modulation of complement 5a-induced chemotaxis and inflammatory cytokines production in macrophages. *Planta Med.* **69**, 9-14.
36. Chiu, J. H., Lay, I. S., Su, M. Y., Chiu, S. N., Lui, W. Y. y Wu, C. W. (2002). Tumor necrosis factor-producing activity of wogonin in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Planta Med.* **68**, 1036-1039.
37. Cho, J. Y., Park, J., Yoo, E. S., Yoshikawa, K., Baik, K.U., Lee, J. y Park, M. H. (1998). Inhibitory effect of lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* var. *Dissecta* on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 12-16.
38. Cho, J. Y., Baik, K. U., Yoo, E. S., Yoshikawa, K. y Park, M. H. (2000). In vitro anti-inflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. *J. Nat. Prod.* **63**, 1205-1209.

39. Cho, J. Y., Park, J., Kim, P. S., Yoo, E. S., Baik, K. U. y Park, M. H. (2001a). Savinin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 167-171.
40. Cho, J. Y., Kim, A. R. y Park, M. H. (2001b). Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles. *Planta Med.* **67**, 312-316.
41. Choi, J., Shin, K. M., Park, H. J., Jung, H. J., Kim, H. J., Lee, Y-S., Rew, J-H. y Lee, K. T. (2004). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin. *Planta Med.* **70**, 1027-1032.
42. Christrup, L. L. (1997). Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **41**, 116-122.
43. Clarck, W. G. y Jonson, A. (1997). Farmacología Médica. 13ª edición, Editorial Mosby. España. 156-158.
44. Crunkhorn, P. y Meacock, S. C. R. (1971). Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *Brit. J. Pharmacol.* **42**, 392-402.
45. Dawson, W. (1987). Theories of mechanism of action of anti-inflammatory compounds. In: Williamson WRN, editor: anti-inflammatory compounds. New York, Marcel Dekker. 109-119.
46. Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F. y Flahaut, M. (1980). Release of prostaglandins E and F an algogenic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* **61**, 17-24.

47. Devillier, P. (2001). Pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and ENT pathology. *Presse Med.* **30**, 70-79.
48. Devor, M., Govrin-Lippmann, R. y Angelides, K. (1993). Na<sup>+</sup> channel immunolocalization in peripheral mammalian axons and changes following nerve injury and neuroma formation. *J. Neurosci.* **13**, 1976-1992.
49. Dewick, P. M. (1997). Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach. Second edition. John Wiley and Sons, England.
50. Dolphin, A. C. (1990). G protein modulation of calcium currents in neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 243-255.
51. Dray, A. y Perkins, M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* **16**, 99-104.
52. Dressler, L. R. (1981). The orchis. Natural history and classification. Harvard University Press. London, 50-159.
53. Dressler, L. R. (1993). Phylogeny and classification of the Orchid family. Discorides Press. 13-57.
54. Duarte, I. D. y Ferreira, S. H. (1992). The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **221**, 171-174.
55. Duarte, I. D., Lorenzetti, B. B. y Ferreira, S. H. (1990). Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **186**, 289-293.

56. Eddy, N. B. y Leimbach, D. (1953). Synthetic analgesics, II. Dithienylbutenyl and dithienylbutenylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **107**, 385-393.
57. Elenkov, I. J. y Chrousos, G. P. (2002). Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **966**, 290-303.
58. Estrada, S., Toscano, R. A. y Mata, R. (1999a). New Phenanthrene derivatives from *Maxillaria densa*. *J. Nat. Prod.* **62**, 1175-1178.
59. Estrada, S., Rojas, A., Mathison, Y., Israel, A. y Mata, R. (1999b). Nitric oxide/cGMP mediates the spasmolytic action of 3,4'-dihydroxy-5,5'-dimethoxybibenzyls from *Scaphyglottis livida*. *Planta Med.* **65**, 109-114.
60. Estrada, S., Acevedo, L., Rodríguez, M., Toscano, R. y Mata, R. (2002) New triterpenoids from the orchids *Scaphyglottis livida* and *Nidema boothii*. *Nat. Prod. Lett.* **16**, 81-86.
61. Estrada, S., López-Guerrero, J., Villalobos-Molina, R. y Mata, R. (2004) Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*. *Fitoterapia*, **75**, 690-695.
62. Evans, W. C. (1991). Trease y Evans, Farmacognosia. 13a edición, Interamericana. McGraw Hill, USA.
63. Ferreira, J., Floriani, A. E. O., Filho, V. C., Delle Monache, F., Yunes, R. A., Calixto, J. B. y Santos, A. R. S. (2000) Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* Stems (Orchidaceae). *Life Sci.* **66**, 791-802.

64. Ferreira, S. H., Duarte, I. D. y Lorenzetti, B. B. (1991). The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* **201**, 121-122.
65. Ferreira, S. H. y Nakamura, M. (1979). I-Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. *Prostaglandins*, **18**, 179-190.
66. Ferreira, S. H. y Nakamura, M. (1979). II-Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonist. *Prostaglandins*. **18**, 191-200.
67. Ferreira, S. H. y Nakamura, M. (1979). III-Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. *Prostaglandins*. **18**, 201-208.
68. Fields, H. L., Heinricher, M. M. y Mason, P. (1991). Neurotransmitters in nociceptive circuits. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**, 219-245.
69. Filho, V. C, Schlemper, V., Santos, A., Pinheiro, T., Yunes, R., Mendes, G., Calixto, J. y Delle-Monache, F. (1998). Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *J. Ethnopharmacol.* **62**, 223-227.
70. Fozard, J. R. (1984). Neuronal 5-HT receptors in the periphery. *Neuropharmacology*, **23**, 1473-1486.
71. García, M. D., Fernández, M. A., Álvarez, A. y Saenz, M. T. (2004) Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). *J. Ethnopharmacol.* **91**, 69-73.

72. Gehlert, R. y Kindl, H. (1991). Induced formation of dihydrophenanthrenes and bibenzyls synthase upon destruction of Orchid mycorrhiza. *Phytochemistry*, **30**, 457-460.
73. Gillman, A. G., Rall, T. W., Niles, A. S. y Taylor, P. (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª. edición. Ed. Panamericana. México, D.F.
74. Gorham, J. (1995). The biochemistry of the stilbenoids. First edition. Chapman and Hall, London.
75. Harborne, J. B. y Williams, C. A. (1994). Recent advances in the chemosystematics of monocotyledons. *Phytochemistry*, **37**, 3-18.
76. Haw-Yaw Y., Yen-Lin L., Hao-Yuan Ch., Wen-Chiuan H., Jung-Chun L., Wen-Huang P. (2005). Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 207-210.
77. Heinricher, M. M., Morgan, M. M. y Fields, H. L. (1992). Circuitry linking opioid-sensitive nociceptive modulatory systems in periaqueductal gray and spinal cord with rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*, **47**, 863-871.
78. Hernández-Romero, Y., Rojas, J., Castillo, R., Rojas, A y Mata, R. (2004). Spasmolytic effects, mode of action and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *J. Nat. Prod.* **67**, 160-167.
79. Hietz, P. y Hietz-Seifert, V. (1994). Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y los Tuxtlas, Ver. Instituto de Ecología A. C. 1ª edición.



80. Hong, J. J., Jeong, T. S., Choi, J. H., Park, J. H., Lee, K. Y., Oh, S. R. y Oh, G. T. (2001). Hematein inhibits tumor necrotic factor-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 and NF-kappa B-dependent gene expression in human vascular endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 1127-1133.
81. Huang, F. C., Chan, W. K., Moriarty, K. J., Zhang, D. C., Chang, M., He, W., Yu, K. T. y Zilberstein, A. (1998). Novel cytokine release inhibitors. Part I: triterpenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1883-1886.
82. Hunter, M. S., Corley, D. G., Carron, C. P., Rowold, E., Kilpatrick, B. F. y Durley R. C. (1997). Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* wich inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. *J. Nat. Prod.* **60**, 894-899.
83. Ingólfssdóttir, K. (2002). Molecules of interest: Usnic acid. *Phytochemistry*, **61**, 729-736.
84. Ishiwa, J., Sato, T., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. e Ito, A. (2000). A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblast. *J. Rheumatol.* **27**, 20-25.
85. Jeong, H. J., Koo, H. N., Na, H. J., Kim, M. S., Hong, S. H., Eom, J. W., Kim, K. S., Shim, T. Y. y Kim, H. M. (2002). Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 mast cells. *Cytokine*, **18**, 252-259.

86. Juneja, R. K., Sharma, S. C y Tandon, J. S. (1985). A substituted 1, 2-diarilethane from *Cymbidium giganteum*. *Phytochemistry*, **24**, 321-324.
87. Juneja, R. K., Sharma, S. C y Tandon, J. S. (1987). Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium*. *Phytochemistry*, **26**, 1123-1125.
88. Kadota, S., Shima, T. y Kikuchi, T. (1987). Studies on the constituents of Orchidaceous plants VII. The C-24 stereochemistry of cyclohomonervilol and 24-isopropenylcholesterol, non-conventional side chain triterpene and sterol, from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 200-210.
89. Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. y Namba, T. (1981). New triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter, and Orchidaceous plant structures of cyclonervilol and cyclohomonervilol and chemical correlation with cycloeucalenol. *Tetrahedron Lett.* **22**, 465-468.
90. Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H. y Shima, T. (1985). Studies on the constituents of Orchidaceous plants II. Isolation, structures and stereochemistry of cyclohomonervilol and dihydrocycloeucalenol C-24 epimer, new triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1914-1929.
91. Kim, Y. K., Kim, R. G., Park, S. J. y Lee, K. T. (2002). In vitro anti-inflammatory activity of kalopanaxsaponin A isolated from *Kalopanax pictus* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 72-76.

92. Kimura, Y., Matsushita, N., Yokoi-Hayashi, K. y Okuda, H. (2001). Effects of baicalein isolated from *Scutellaria baicalensis* on adhesion molecule expression induced by thrombin and thrombin receptor agonist peptide in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Planta Med.* **67**, 331-334.
93. Kong, J. M., Goh, N. K., Chia, L. S. y Chia, T. F. (2003). Recent advances in traditional plants drugs and orchids. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 7-21.
94. Koster, R., Anderson, M. y De Beer, J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **18**, 412-417.
95. Krakauer, T., Li, B. Q. y Young, H. A. (2001). The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. *FEBS Lett.* **500**, 52-55.
96. Kubo, M., Matsuda, H., Tanaka, M., Kimura, Y., Okuda, H., Higashino, M., Tani, T., Namba, K. y Arichi, S. (1984). Studies on *Scutellariae radix*: VII. Anti-arthritic and anti-inflammatory actions of methanolic extract and flavonoids components from *Scutellariae radix*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 2724-2729.
97. Le Bars, D., Gozariu, M. y Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* **53**, 597-652.
98. Lee, Y. H., Park, J. D., Baek, N. I., Kim, S. I. y Ahn, B. Z. (1995). *In vitro* and *in vivo* antitumoral phenanthrenes from the aerial parts of *Dendrobium nobile*. *Planta Med.* **61**, 178-180.
99. Levine, J. D., Fields, H. L. y Basbaum, A. I. (1993). Peptides and the primary afferent nociceptor. *J. Neurosci.* **13**, 2273-2286.

100. Li, B. Q., Fu, T., Gong, W. H., Dunlop, N., Kung, H. F., Yan, Y., Kang, J. y Wang, J. M. (2000). The flavonoids baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharm.* **49**, 295-306.
101. Lin, N., Sato, T., Takayama, Y., Mimaki, Y., Sashida, Y., Yano, M. e Ito, A. (2003). Novel anti-inflammatory actions of nobiletin, a citrus polimethoxy flavonoid, on human synovial fobroblast and mouse macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 2065-2071.
102. Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **54**, 275-287.
103. Majumder, P. L. y Pal A. (1985). 24-methylene cycloartanyl p-hydroxycinnamate from the orchid *Cirrhopetalum elatum*. *Phytochemistry*, **24**, 2120-2122.
104. Majumder, P. L. y Sen, R. C. (1987). Moscatilin, a bibenzyl derivative from the orchid *Dendrobium moscatum*. *Phytochemistry*, **26**, 2121-2124
105. Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173-215.
106. Matsumoto, K., Horie, S., Ishikawa, H., Takayama, H., Aimi, N., Ponglux, D. y Watanabe, K. (2004). Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. *Life Sci.* **74**, 2143-2155.

107. McVaugh, R. (1985). Orchidaceae. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western México. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, USA., **16**, 1–363.
108. Miño, J., Moscatelli, V., Hnatyszyn, O., Gorzalczany., C. y Ferraro, G. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. *Pharmacol. Res.* **50**, 59-63.
109. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. I. y Kameoka, H. (1997). Antimutagenic activity of gigantol from *Dendrobium nobile*. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2849-2853.
110. Miyazawa, M., Shimamura, H., Nakamura, S. I., Sugiura, W., Kosaka, H. y Kameoka, H. (1999). Moscatilin from *Dendrobium nobile*, a naturally occurring bibenzyl compound with potential antimutagenic activity. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2163-2167.
111. Nageswara, R. A. (2004). Medicinal orchids wealth of arunachal pradesh. *Indian medicinal plants of conservation concern.* **1**, 1-5.
112. Nance, P. W. y Sawynok, J. (1987). Substance P-induced long-term blockade of spinal adrenergic analgesia: reversal by morphine and naloxone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**, 972-977.
113. Noda, N., Kobayashi, Y., Miyahara, K. y Fukahori, S. (1995). 2, 4-Bis(4-hidroxybenzyl) phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochemistry.* **39**, 1247-1248.

- 
114. Oh, S. R., Kim, D. S., Lee, I. S., Jung, K. Y., Lee, J. J. y Lee, H. K. (1998). Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*. *Planta Med.* **64**, 456-458.
115. Oh, G. T., Choi, J. H., Hong, J. J., Kim, D. J., Lee, S. B., Kim, J. R., Lee, C. H., Hyun, B. H., Oh, S. R., Bok, S. H. y Jeong, T. S. (2001). Dietary hematein ameliorates fatty streak lesions in the rabbit by the possible mechanism of reducing VCAM-1 and MCP-1 expression. *Atherosclerosis.* **159**, 17-26.
116. Okabe, S., Sukanuma, M., Imayoshi, Y., Taniguchi, S., Yoshida, T. y Fijiki, H. (2001). New TNF-alpha releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-Ki. *Biol. Pharm. Bull.* **10**, 1145-1148.
117. Okamoto, T., Natsume, M., Onaka, T., Uchimaru, F. y Shimizu, M. (1996). The structure of dendroxine. The third alkaloid from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.* **14**, 672-675.
118. Okuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M., Kinoshita, Y. y Yamamoto, Y. (1995). Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med.* **61**, 113-115.
119. Onaka, T., Kamata, S., Maeda, T., Kawazoe, Y., Natsume, M., Okamoto, T., Uchimaru, F. y Shimizu, M. (1965). The structure of nobilonine. The second alkaloid from *Dendrobium nobile*. *Chem. Pharm. Bull.* **13**, 745-747.
120. Park, K. Y., Lee, S. H., Min, B. K., Lee, K. S., Choi, J. S., Chung, S. R., Min, K. R. y Kim, Y. (1999). Inhibitor effect of luteolin 4'-O-glucoside from

- Kummerowia striata* and other flavonoids on interleukin-5 bioactivity. *Planta Med.* **65**, 457-459.
121. Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Chessa, M. L., Moretti, M. D. L., Serra, G. y Pippia, P. (2003). (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur. J. Pharmacol.* **460**, 37-41.
122. Peana, A. T., De Montis, M. G., Sechi, S., Sircana, G., D'Aquila, P. S and Pippia P. (2004). Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Eur. J. Pharmacol.* **497**, 279-284.
123. Pitzalis, C., Pipitone, N. y Perretti, M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **966**, 108-118.
124. Qing-Gao M., Wen-Zi L., Xiao-Yun W., Tian-Xi Z. y Guo-Wei Q. (1997). Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*, **44**, 663-666.
125. Reyes-López, M., Villa-Treviño, S., Arriaga-Alba, M., Alemán-Lazarini, Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Fattel-Fazenda, S. y De La Garza, M. (2005). The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicol. In vitro*, **19**, 91-97.
126. Robbins, S., Cotran, R. y Kumar, V. (1990). Patología estructural y funcional, Vols. I y II. 4ª edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Madrid, España.

127. Roerig, S. C., Fujimotoi, J. M. y Tseng, L. F. (1988). Comparisons of descending pain inhibitory pathways activated by beta-endorphin and morphine as characterized by supraspinal and spinal antinociceptive interactions in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**, 1107-1113.
128. Sachdev, K. y Kulshreshtha, K. (1986). Phenolic constituents of *Coelogyne ovalis*. *Phytochemistry.* **25**, 499-502.
129. Saklatvala, J. (2002). Glucocorticoids: do we know how they work?. *Arthritis Res.* **4**, 146-150.
130. Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Curie, M. G. y Needleman, P. (1992). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7240-7244.
131. Sato, J. y Perl, E. R. (1991). Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science*, **251**, 1608-1610.
132. Schnyder, B., Schnyder-Candrian, S., Panski, A., Bömmel, H., Heim, M., Duschl, A. y Moser, R. (2002). Phytochemical inhibition of interleukin-4-activated Stat6 and expression of VCAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 841-847.
133. Shimizu, M., Shogawa, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N., Ferro, E., Basualdo, I. y Berganza, L. H. (1988). Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs III. Constituents and anti-inflammatory effect of paraguayan crude drug "Tamandá cuná" (*Catasetum barbatum* Lindley). *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 4447-4452.



134. Slaytor, M. B. (1997). The distribution and chemistry of alkaloids in the Orchidaceae. En: Orchids biology reviews and perspectives I. Cornell University press. **4**, 96-114.
135. Smith, C. M. y Reynard, A. M. (1992). Textbook of Pharmacology. Editorial Saunders College Co. Philadelphia, U.S.A. 401-430.
136. Steen, K. H., Reeh, P. W., Anton, F. y Handwerker, H. O. (1992). Proton selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J. Neurosci.* **12**, 86-95.
137. Stein, A., Yassouridis, A., Szopko, C., Helmke, K. y Stein, C. (1999). Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain*, **83**, 525-532.
138. Stermitz, F. R., Suess, T. R., Schauter, C. K. y Anderson, P. O. (1983). New and old phenanthrenes derivatives from *Oncidium cebolleta*, a peyote-replacement plant. *J. Nat. Prod.* **63**, 417-423.
139. Stoessl, A. y Arditti, J. (1984). Orchids phytoalexins. En: Orchids biology reviews and perspective III. Cornell University Press., **3**, 152-175.
140. Sylvester, J., Liacini, A., Li, W. Q., Dehnade, F. y Zafarullah, M. (2001). *Tripterygium wilfordii* Hook F extract suppresses proinflammatory cytokine-induced expression of matrix metalloproteinase genes in articular chondrocytes by inhibiting activating protein-1 and nuclear factor kB activities. *Mol. Pharmacol.* **59**, 1196-1205.

141. Syntex, Simposium. (1987). Inflamación y antiinflamatorios: actualizaciones. 23:29, 61-83, 97:99.
142. Takagi, S., Yamaki, M. y Inoue, K. (1983). Antimicrobial agents from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*, **22**, 1011-1015.
143. Tanaka, S., Sakata, Y., Morimoto, K., Tambe, Y., Watanabe, Y., Honda, G., Tabata, M., Oshima, T., Masuda, T., Umesawa, T., Shimada, M., Nagakura, N., Kamisako, W., Kashuwada, Y. e Ikeshiro, Y. (2001). Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. *Planta Med.* **67**, 108-113.
144. Tatsuzawa, F., Saito, N., Seli, H., Hara, R., Yokio, M., y Honda, T. (1997). Acylated cyanidin glycosides in the red-purple flowers of *Phalaenopsis*. *Phytochemistry*. **45**, 173-177.
145. Teixidor, J. R. y Massó J. G. Medicina Interna. Tomo I. Ed Masson. 1997. Cap XII: 1804-1805.
146. Tezuka, Y., Ueda, M. y Kikuchi, T. (1989). Studies on the constituents of Orchidaceous plants VIII. Constituents of *Spiranthes sinensis* (PERS.) AMES var. Amoena (M. BIEBERSON) HARA. (1). Isolation and structure elucidation of spiranthol-A, spiranthol-B and spirasienol-A, new isopentenldihydrophenanthrenes. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3195-3199.
147. Yamaki, M., Bai, L., Inoue, K. y Takagi, S. (1989). Biphenanthrenes from *Bletilla striata*. *Phytochemistry*. **28**, 3503-3505.

148. Ying, S., Xi-hua, Y., Can-Kuia, Z. y Zhi-Ben, T. (2005). C-32 triterpenes from *Taxodium ascendens*. *Biochem. Syst. Ecol.* **33**, 211-214.
149. Valencia-Islas, N. A., Paul, R. N., Shier, W. T., Mata, R. y Abbas, H. K. (2002). Phytotoxicity and ultrastructural effects of gymnopusin from the orchid *Maxillaria densa* on duckweed (*Lemna pausicostata*) frond and root tissues. *Phytochemistry*, **61**, 141-148.
150. Vane, J. R. inhibition of prostaglandins synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* **231**, 232-235.
151. Weinreich, D. y Wonderlin, W. F. (1987). Inhibition of calcium-dependent spike after-hyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurones. *J. Physiol.* **394**, 415-427.
152. Williams, C. A. (1979). The leaf of flavonoids of the orchidaceae. *Phytochemistry*, **18**, 803-813.
153. Williams, C. A., Toscano de Brito, A. L., Harborne, J. B., Eagles, J. y Waterman, P.G. (1994). Methylated C-glycosylflavones as taxonomic markers in Orchids of the subtribe Ornithocephalinae. *Phytochemistry*, **37**, 1045-1053.
154. Williamson, E. M., Okpako, D. T. y Evans, F. J. (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. Volume 1. Ed. Jonh Wiley & Sons. New York.
155. Winter, C. A. y Risley, E. A. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Biol. Med.* **111**, 544-547.

156. Wrigley, T. C. (1960). Ayapin, scopoletin and 6, 7-dimethoxy-coumarin from *Dendrobium thyrsiflorum*. *Nature*, **188**, 1108-1115.
157. Wu, Ch. R., Itsich, M. T., Huang, S. Ch., Peng, W. H., Chang, Y. S. y Chem, C. F. (1996). Effects of *Gastrodia elata* and its constituents on scopolamine induced amnesia in rats. *Planta Med.* **62**, 317-321.
158. Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T. y Roussos, C. (2001). Luteolin inhibits and endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 181-187.
159. Yaksh, T. L. (1997). Pain after injury: some basic mechanisms. *J. Fla. Med. Assoc.* **84**, 16-19.
160. Ying, S., Yao, X-H., Zhang, C. K. y Tu, Z. B. (2005). C-32 triterpenes from *Taxodium ascendens*. *Biochem. Sist. Ecol.* **33**, 211-214.
161. Zimmemann, A. y Dougoud, R. C. (1959). Eds. Orchidées Exotiques, Deelachaux, Neuchatel; *Beautes de la nature*.

# ANEXOS

## MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRUEBA DE AMES

Medio de Vogel-Bonner:

*Composición por litro:*

|   |        |
|---|--------|
| Agua destilada (45 °C)  | 670 mL |
| Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )                            | 10 g   |
| Ácido Cítrico monohidratado   | 100 g  |
| Fosfato dibásico de Potasio anhidro ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                              | 500 g  |
| Fosfato de Sodio y Amonio ( $\text{NaH}_2\text{NH}_4\text{PO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) | 175 g  |
| Sulfato de Magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ )                            | 10 g   |

Adicionar las sales en el orden indicado al agua destilada con agitación constante, permitiendo que cada compuesto se disuelva. Ajustar el pH a 7.4 con HCl concentrado. Aforar al volumen final de 1 L. Filtrar y guardar en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

Solución de Histidina-Biotina

*Composición por 250 mL*

|                 |         |
|-----------------|---------|
| D-Biotina       | 30.9 mg |
| L-Histidina-HCl | 24.0 mg |
| Agua destilada  | 250 mL  |

Disolver la D-biotina y la L-histidina en el volumen de agua indicado. Esterilizar la solución en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Guardar en refrigeración a 4 °C.

Agar suave

*Composición por litro*

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Agar bacteriológico     | 6 g     |
| Cloruro de sodio (NaCl) | 5 g     |
| Agua destilada          | 1000 mL |

Verter el agar y el cloruro de sodio en el agua destilada. Posteriormente, esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121 °C.

**Soluciones para la preparación de la fracción S9.**

Solución de cloruros

*Composición por 500 mL :*

|   |        |
|---|--------|
| Cloruro de Potasio (KCl)                      | 61.5 g |
| Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ ) | 40.7 g |
| Agua destilada                                | 500 mL |

Disolver las sales en la mitad de agua, ajustar al volumen final y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121 °C.

Buffer de Fosfatos 0.2 M, pH 7.4

*Composición por 500 mL:*

|  |        |
|--|--------|
| Fosfato monobásico de sodio ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) | 13.8 g |
| Fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ )   | 14.2 g |

Disolver las sales en 500 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121 °C, guardar en refrigeración a 4 °C.

Solución de NADP (Nicotin Adenin dinucleótido fosfato)

*Composición por 5 mL:*

|                 |        |
|-----------------|--------|
| NADP (PM 765.4) | 383 mg |
| Agua destilada  | 5 mL   |

Disolver y esterilizar por filtración utilizando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Solución de Glucosa-6-Fosfato

*Composición por 10 mL:*

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Glucosa-6-Fosfato | 2.82 g |
| Agua destilada    | 10 mL  |

Disolver y esterilizar por filtración utilizando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

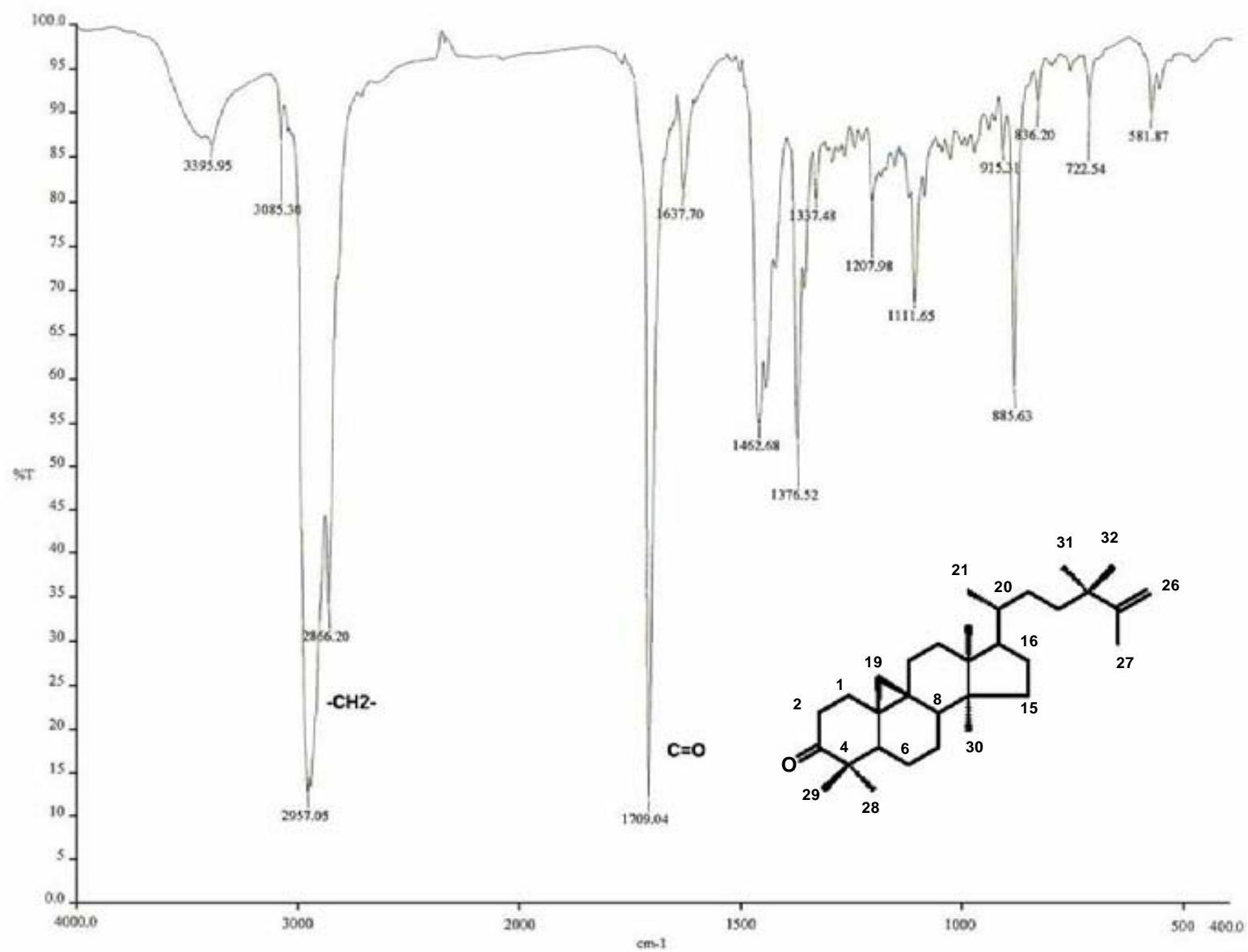
Fracción S9 con cofactores

*Composición por 50 mL:*

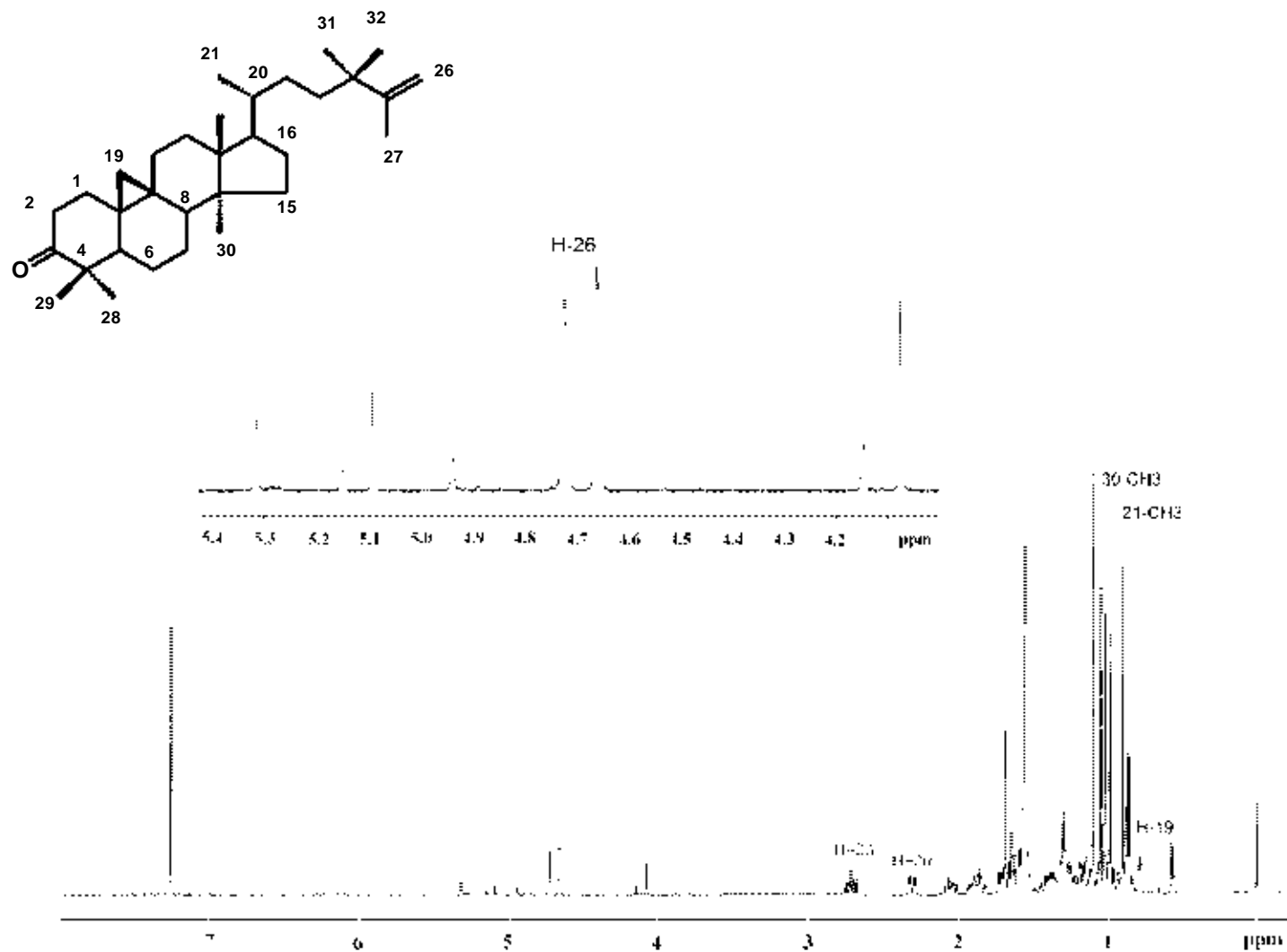
|                               | Mezcla estándar | Mezcla alta   |
|-------------------------------|-----------------|---------------|
| Fracción S9 de hígado de rata | 2.0 mL (4%)     | 5.0 mL (10 %) |
| Solución de cloruros          | 1.0 mL          | 1.0 mL        |
| Solución de Glucosa-6-fosfato | 0.25 mL         | 0.25 mL       |
| Solución de NADP              | 2.0 mL          | 2.0 mL        |
| Buffer de fosfatos            | 25.0 mL         | 25.0 mL       |
| Agua destilada                | 75 mL           | 16.75 mL      |

Homogenizar y esterilizar la solución por filtración a través una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ .

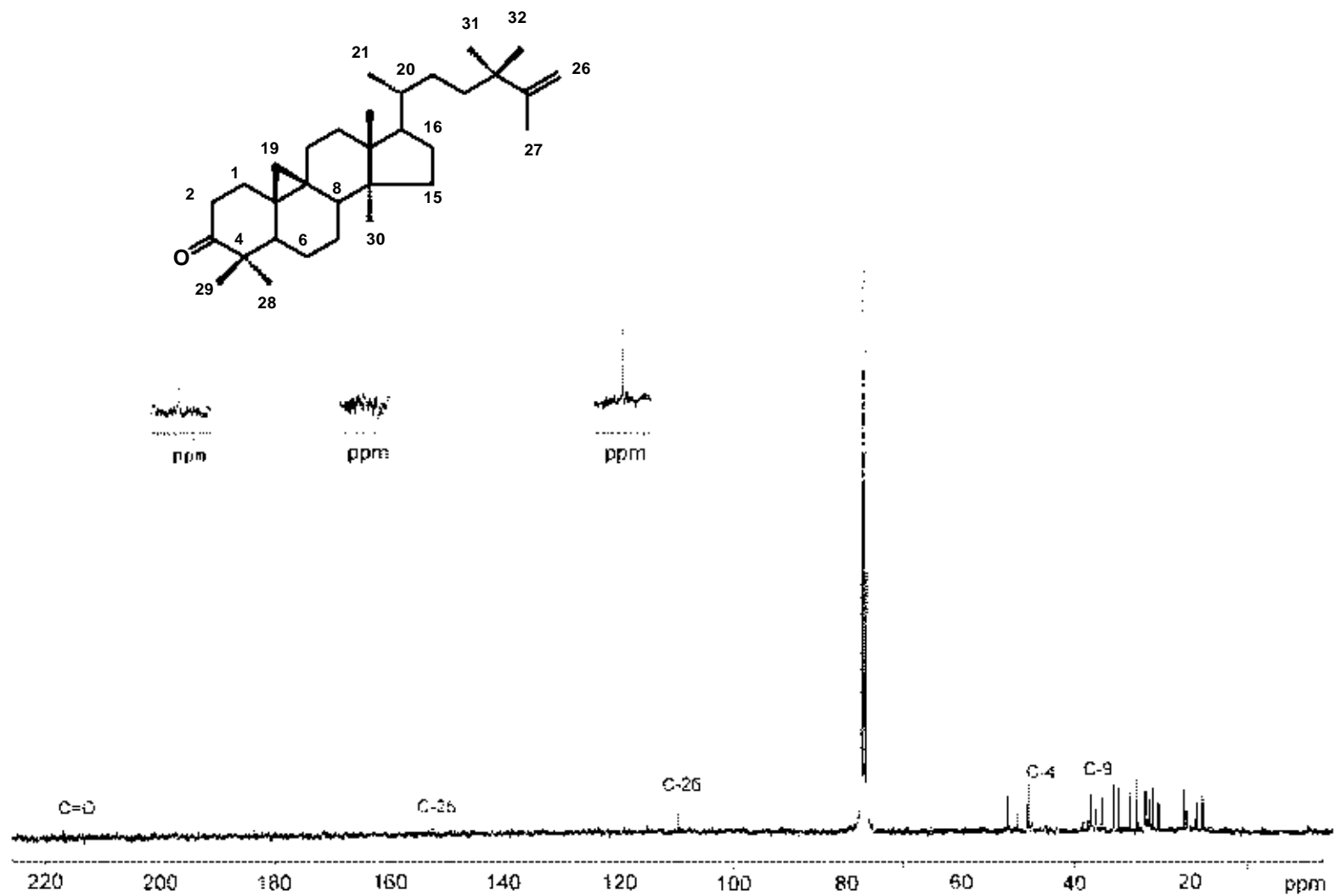




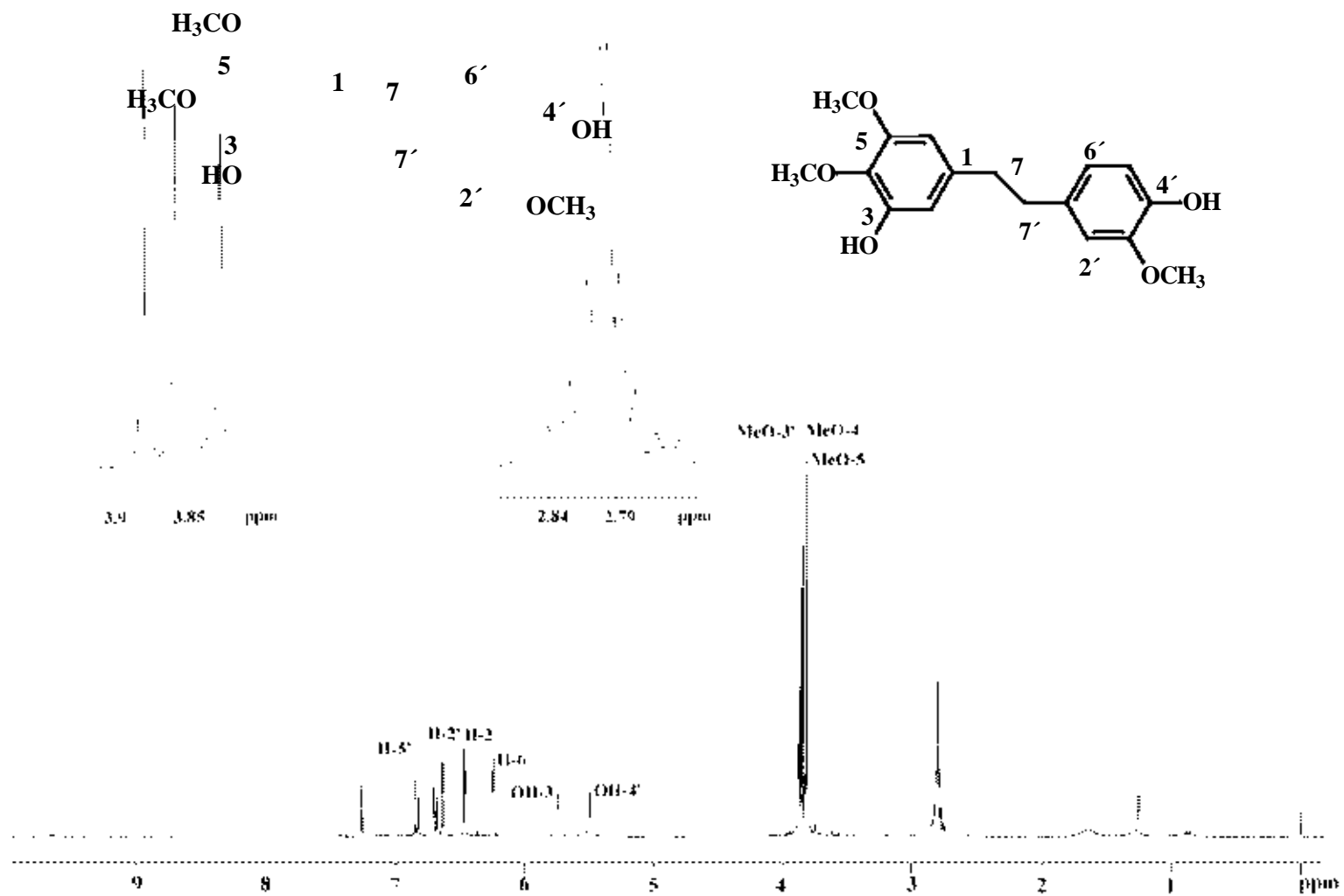
**Espectro 1.** Espectro en el IR de la ciclobalanona (77)



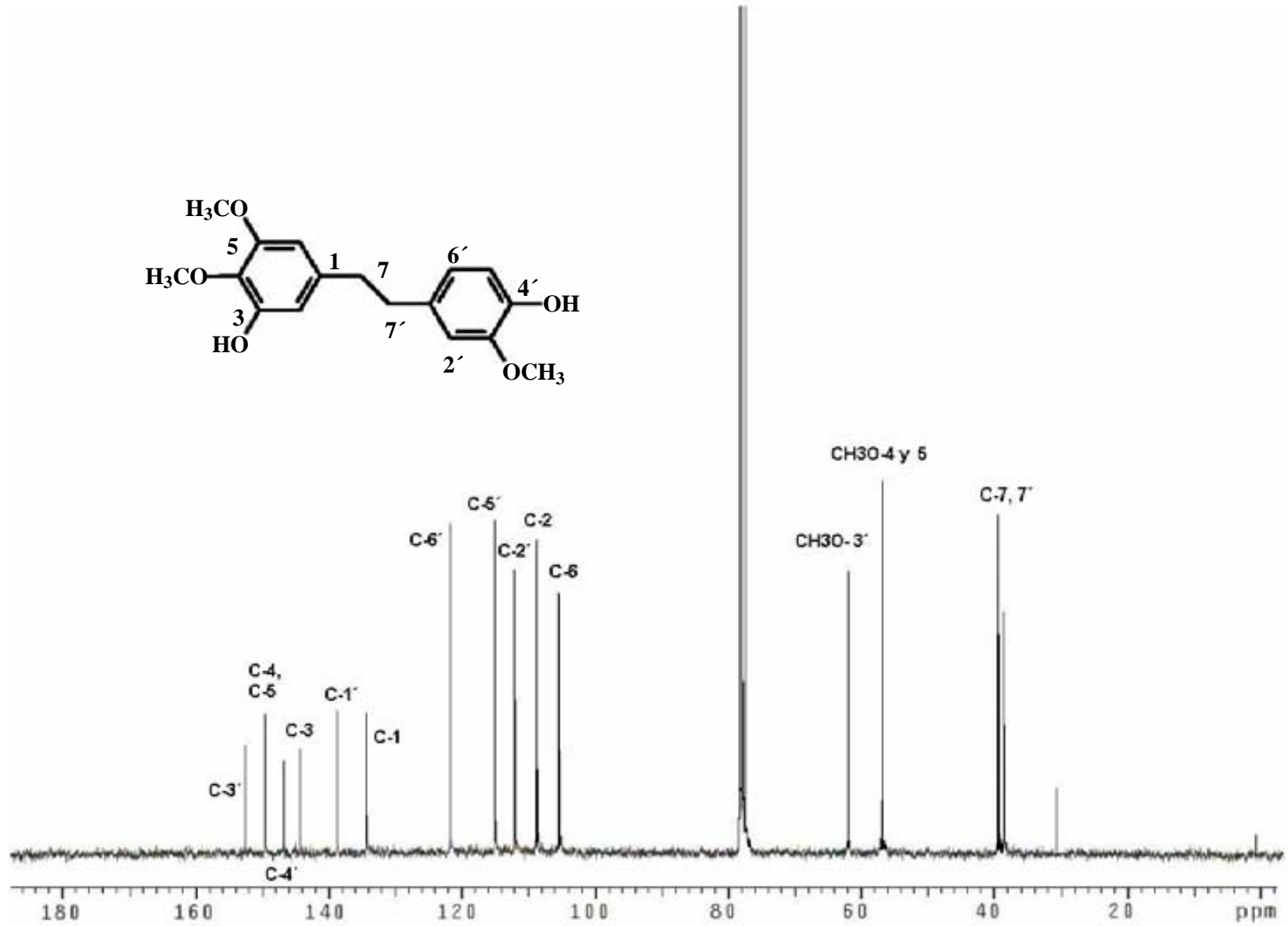
**Espectro 2.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de la ciclobalanona (77)



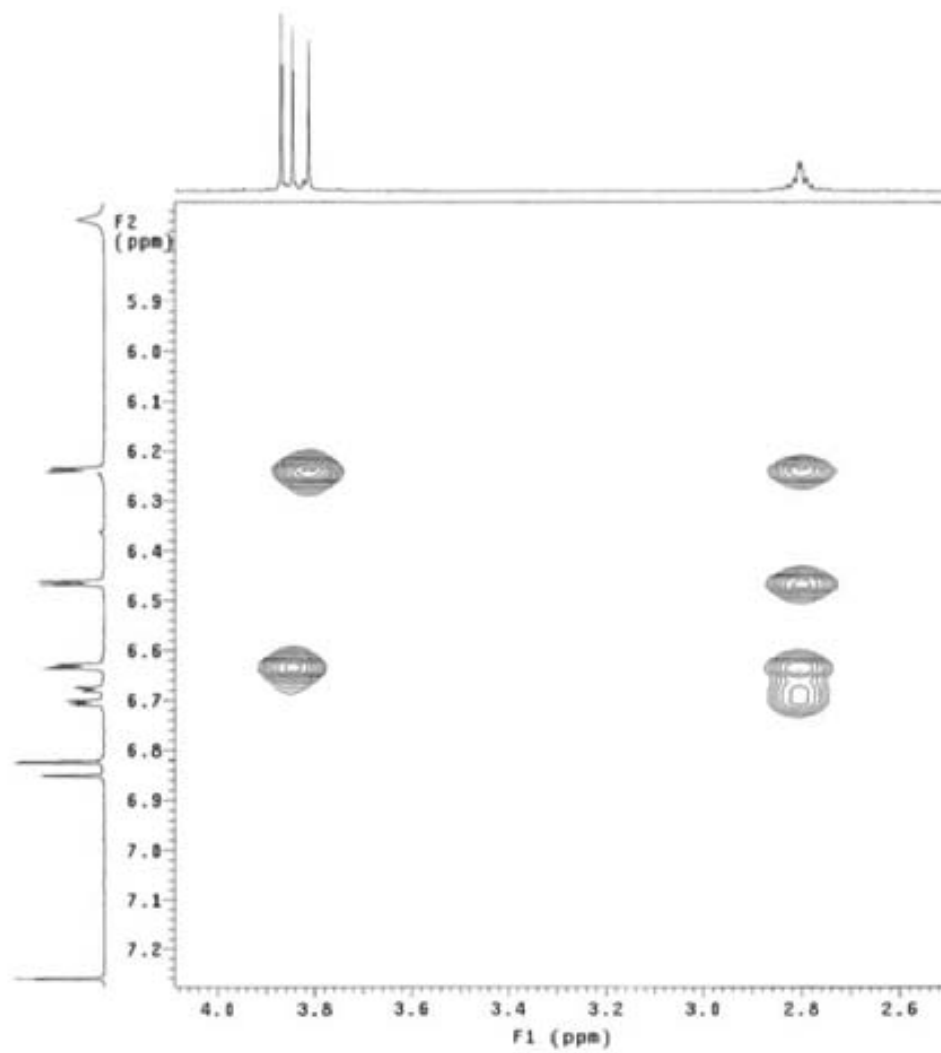
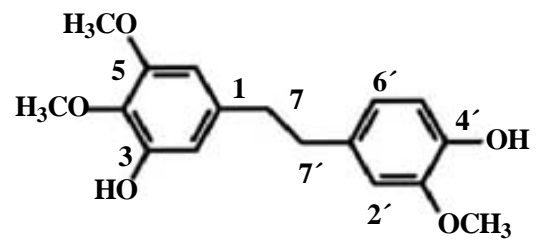
**Espectro 3.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la ciclobalanona (77)



**Espectro 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (**78**)



**Espectro 5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (78)



**Espectro 6.** Experimento COSY del 3,4'-dihidroxi-3',4,5-trimetoxibibencilo (**78**)