



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE LA ESPECIE
Hofmeisteria schaffneri (A. Gray) King & Robinson (ASTERACEAE)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. GUADALUPE ESTHER ÁNGELES LÓPEZ



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG
2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por todo su apoyo durante la realización de esta tesis.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 124 que me han apoyado en todo momento.

A las maestras en ciencias Isabel Rivero Cruz y Laura Acevedo Arteaga por su valiosa asesoría en el laboratorio.

A la Dra. Myrna Déciga Campos por su valiosa asesoría en los experimentos biológicos.

A CONACYT por la beca otorgada que me permitieron realizar mis estudios de maestría.

A el proyecto SALUD-CONACYT C01-018 por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

Al proyecto IDGAPA (IN208907) por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Rachel Mata Essayag por brindarme todo su apoyo para la realización de la tesis. Muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE DIAGRAMAS	VII
ÍNDICE DE ESPECTROS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	5
2.1 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS, FARMACOLÓGICOS Y FITOQUÍMICOS DE <i>Hofmeisteria schaffneri</i> (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae).	5
2.2. NOCICEPCIÓN.	9
2.2.1. Activación de los nociceptores térmicos.	11
2.2.2. Activación de los nociceptores químicos.	12
2.3. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA NOCICEPCIÓN.	13
2.3.1. Modelo de la placa caliente.	13
2.3.2. Modelo de estiramiento abdominal.	13
2.4. TOXICIDAD.	14
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
IV. HIPÓTESIS	16

V. PARTE EXPERIMENTAL	17
5.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.	17
5.1.1. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto, aceite esencial, infusión y productos puros de la especie <i>H. schaffneri</i> en ratones utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal.	17
5.1.2. Ensayo en el modelo de la placa caliente.	17
5.1.3. Determinación del efecto antinociceptivo del angelato de timilo en presencia del antagonista opioide naloxona.	18
5.1.4. Ensayo en el modelo de estiramiento abdominal.	20
5.1.5. Toxicidad aguda.	21
5.2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.	23
5.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO.	23
5.3.1. Equipos utilizados para determinar las constantes espectroscópicas y espectrofotométricas.	23
5.3.2. Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>H. schaffneri</i> (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae).	24
5.3.2.1. Obtención del extracto de las partes aéreas de <i>H. schaffneri</i> .	24
5.3.2.2. Fraccionamiento primario del extracto CH ₂ Cl ₂ - MeOH.	24
5.3.2.3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F2.	26
5.3.2.3.1. Aislamiento y purificación del angelato de timilo.	26
5.3.2.4. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3.	27
5.3.2.5. Fraccionamiento terciario de la fracción F3-95-99.	27

5.3.2.5.1. Aislamiento y purificación del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.	29
5.3.3. Obtención del aceite esencial.	29
5.3.4. Preparación del extracto acuoso.	30
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
6.1. PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA	31
6.1.1. Evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de <i>H. schaffneri</i> .	31
6.2. PRUEBAS DE EFICACIA	34
6.2.1. Evaluación del extracto orgánico CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1), infusión y aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> en los modelo de la placa caliente y estiramiento abdominal.	34
6.3. DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS MAYORITARIOS DE <i>H. schaffneri</i> .	38
6.3.1. Caracterización del angelato de timilo (11)	38
6.3.2. Caracterización del timol (10)	40
6.3.3. Caracterización del 2-[2-(acetoximetil)oxidan-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato (7).	41
6.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL TIMOL (10), 2-[2-(ACETOXIMETIL) OXIRAN-2-ILO]-5-METILFENIL (2Z)-2-METILBUT-2-ENOATO (7) Y DEL ANGELATO DE TIMILO (11).	43
VII. CONCLUSIONES	46

VIII. PERSPECTIVAS	47
IX. BIBLIOGRAFÍA	48
X. ANEXO	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos aislados de <i>H. schaffneri</i> .	8
Cuadro 2. Monoterpenoides adicionales.	10
Cuadro 3. Fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda.	21
Cuadro 4. Material vegetal.	24
Cuadro 5. Fraccionamiento primario del extracto CH ₂ Cl ₂ - MeOH.	25
Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción F2.	26
Cuadro 7. Fraccionamiento secundario de la fracción F3.	28
Cuadro 8. Fraccionamiento terciario de F3-95-99.	28
Cuadro 9. Evaluación de la toxicidad aguda de <i>H. schaffneri</i> en ratones.	32
Cuadro 10. Características físicas, espectrofotométricas y espectroscópicas del angelato de timilo.	40
Cuadro 11. Características físicas, espectrofotométricas y espectroscópicas del timol.	41
Cuadro 12. Características físicas, espectrofotométricas y espectroscópicas del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	7
Figura 2. Sistema de transmisión de la nocicepción.	11
Figura 3. Peso corporal de los ratones durante la primera fase del método de Lorke.	33
Figura 4. Peso corporal de los ratones durante la segunda fase del método de Lorke.	33
Figura 5. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico (CH ₂ Cl ₂ - MeOH) de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	35
Figura 6. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	35
Figura 7. Efecto antinociceptivo del aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	36
Figura 8. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de estiramiento abdominal.	37
Figura 9. Efecto antinociceptivo del angelato de timilo, así como angelato de timilo (1mg/Kg) + naloxona (1mg/Kg) en el modelo de la placa caliente.	44
Figura 10. Efecto antinociceptivo del timol 10 en el modelo de la placa caliente.	45

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Procedimiento para la evaluación del efecto antinociceptivo en la placa caliente.	19
Diagrama 2. Procedimiento para la evaluación del efecto antinociceptivo del angelato de timilo en presencia del antagonista opiode naloxona en la placa caliente.	19
Diagrama 3. Procedimiento de la evaluación del efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal.	20
Diagrama 4. Procedimiento para la evaluación de la toxicidad aguda.	22
Diagrama 5. Fraccionamiento primario del extracto CH ₂ Cl ₂ - MeOH.	25
Diagrama 6. Aislamiento y purificación del angelato de timilo y timol.	27
Diagrama 7. Aislamiento y purificación del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.	29

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H del compuesto 11 (CDCl ₃) 300MHz.	53
Espectro 2. RMN- ¹ H del compuesto 11 (CDCl ₃) 300MHz.	54
Espectro 3. RMN- ¹³ C del compuesto 11 (CDCl ₃) 75.5MHz.	55
Espectro 4. RMN- ¹³ C del compuesto 11 (CDCl ₃) 75.5MHz.	56
Espectro 5. RMN- ¹³ C del compuesto 11 (CDCl ₃) 75.5MHz.	57
Espectro 6. Espectroscopia de masa de modalidad IE del compuesto 11 .	58
Espectro 7. IR del compuesto 11 .	59
Espectro 8. HETCOR del compuesto 11 (CDCl ₃) 75.5MHz.	60
Espectro 9. HETCOR del compuesto 11 (CDCl ₃) 75.5MHz.	61
Espectro 10. RMN- ¹ H del compuesto 10 (CDCl ₃) 300MHz.	62
Espectro 11. RMN- ¹³ C del compuesto 10 (CDCl ₃) 75.5MHz.	63
Espectro 12. RMN- ¹³ C del compuesto 10 (CDCl ₃) 75.5MHz.	64
Espectro 13. Espectroscopia de masa modalidad IE del compuesto 10 .	65
Espectro 14. IR del compuesto 10 .	66
Espectro 15. RMN- ¹ H del compuesto 7 (CDCl ₃) 300MHz.	67
Espectro 16. Espectroscopia de masas modalidad IE del compuesto 7 .	68
Espectro 17. RMN- ¹³ C del compuesto 7 (CDCl ₃) 75.5MHz.	69
Espectro 18. RMN- ¹³ C del compuesto 7 (CDCl ₃) 75.5MHz.	70
Espectro 19. RMN- ¹³ C del compuesto 7 (CDCl ₃) 75.5MHz.	71

Espectro 20. IR del compuesto 7 .	72
Espectro 21. HSQC del compuesto 7 (CDCl ₃) 400MHz.	73
Espectro 22. HSQC del compuesto 7 (CDCl ₃) 400MHz.	74
Espectro 23. HSQC del compuesto 7 (CDCl ₃) 400MHz.	75

RESUMEN

La presente investigación describe algunos parámetros de inocuidad y eficacia de la especie medicinal *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae), ampliamente utilizada en el Distrito Federal y San Luis Potosí para el tratamiento de desórdenes estomacales incluyendo dolor de estomago y diarrea.

Con respecto a los parámetros de eficacia, se evaluó el potencial antinociceptivo de la planta en ratones utilizando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal. Los resultados demostraron que el extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (177 y 562 mg/Kg, p.o.), la infusión (10 a 316 mg/Kg, p.o.), y el aceite esencial (1 y 17.7 mg/Kg, p.o.) de la planta, evaluados separadamente, inhiben significativamente la latencia de respuesta ante el estímulo térmico en el modelo de placa caliente. Sin embargo, el extracto no afectó la respuesta de los animales con respecto al control en el modelo de estiramiento abdominal.

El estudio químico del extracto activo permitió el aislamiento del timol (**10**) y dos análogos identificados como, el angelato de timilo (**11**) y el 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato (**7**). El angelato de timilo (**11**, 0.316-17.7 mg/Kg, p.o) también presentó propiedades antinociceptivas importantes que disminuyen en presencia de naloxona, un antagonista inespecífico de los receptores opioides (μ , κ y δ). Por lo tanto, el efecto de este compuesto puede estar mediado por uno o más de estos receptores.

Se determinó la toxicidad aguda potencial del extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) mediante el método de Lorke. Los resultados permitieron comprobar que el extracto es inocuo para ratones hasta la dosis de 5000 mg/Kg de peso corporal.

ABSTRACT

The present work was undertaken to determine some safety and efficacy parameters of *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae), a medicinal plant highly valued for the treatment of stomachaches in Mexico City, and San Luis Potosi. This investigation is part of the research conducted to generate a scientific monograph following the World Health Organization (WHO) criteria.

The efficacy parameter investigated was the antinociceptive effect which was assessed in mice. A CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract (177 and 562 mg/Kg), an essential oil (1 and 17.7 mg/Kg), and an infusion (10 to 316 mg/Kg) of the aerial parts were tested using the hot plate model. The results revealed significant analgesic effect with all treatments.

Chemical investigation of the active extract allowed the isolation of 2-[2-(acetoxymethyl)oxiran-2-yl]-5-methylphenyl (2Z)-2-methylbut-2-enoate (**7**), thymol (**10**), and thymyl angelate (**11**).

Compounds **10** and **11** also showed antinociceptive effect; compound **11** was effective at doses ranging from 0.316 to 17.7 mg/Kg, while compound **10** was effective only at 100 mg/Kg. The effect of **11** was partially blocked by naloxone (1 mg/Kg, i.p) suggesting that its pharmacological action involved opioid receptors.

Acute toxicity studies in mice were performed according to the Lorke procedure. The results reveal that the plant is not toxic. The LD₅₀ is higher than 5000 mg/Kg.

“...Un sabio (tlamani), da vida,
conocedor experimental de las cosas:
que conoce experimentalmente las hierbas,
las piedras, los árboles, las raíces.
Tienen ensayados sus remedios, examina, experimenta,
alivia enfermedades...”

Fray Bernardino de Sahagún
Textos nahuas del Códice Matritense
de la Real Academia de la Historia

I. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de las civilizaciones, la humanidad ha encontrado en los productos naturales (animales, vegetales y minerales) el remedio para combatir las enfermedades y preservar la salud. El mejor testimonio de esta aseveración es el legado de la medicina tradicional de las culturas egipcia, inca, azteca, maya, china, entre otras, preservado gracias a textos o a la transmisión oral.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cerca del 80% de la población mundial depende del uso de plantas medicinales para el cuidado de su salud (Rates, 2001), sobre todo en los países en vías de desarrollo donde la fitoterapia constituye prácticamente la forma más económica de tratamiento contra casi todas las enfermedades (WHO-TRM, 1998). En estos países, generalmente, el uso de remedios herbolarios no se encuentra del todo regularizado en el marco de la ley, pues muchos de estos productos no poseen información acerca de su seguridad, calidad y eficacia.

En la mayoría de los países más industrializados ha resurgido el uso de la herbolaria medicinal, esto debido posiblemente a que se ha incrementado el interés por las terapias alternativas y el uso terapéutico de los productos naturales. Este interés se puede deber a muchos factores, tales como: la ineficiencia de la medicina convencional (e.g. efectos adversos y terapia inefectiva), abuso y/o incorrecto uso de los fármacos sintéticos dando como resultado problemas

terapéuticos así como la idea equivocada de que los “productos naturales” no son peligrosos (Rates, 2001).

En repetidas ocasiones la OMS ha recomendado a sus países miembros establecer programas conducentes a la validación de la eficacia, seguridad y criterios de calidad de las plantas de mayor uso. Estas recomendaciones de la OMS han sido bien aceptadas en países como China e India, los cuales tienen sistemas de salud integrador, y en la comunidad Europea. En esta última región, principalmente en Alemania, el 50% de los productos medicinales vegetales son vendidos bajo una prescripción médica (Rates, 2001). En Latinoamérica, donde los sistemas de salud son tolerantes, la investigación destinada a establecer la eficacia, seguridad y calidad de las plantas medicinales es escasa, y las herramientas para la regulación de estos productos son prácticamente nulas.

En el caso específico de México, las plantas medicinales han constituido desde siempre un recurso importante para el alivio de enfermedades. Las plantas medicinales no solamente se han utilizado en el medio indígena y área rural, sino también en zonas urbanas. Al igual que en otros países de América Latina, México comercializa de manera irracional muchas especies vegetales medicinales, bajo la creencia de que son inocuas. Aún más, muchos de los productos derivados de estas especies no son sujetas a estudios de control de calidad, por lo que en muchas ocasiones los usuarios consumen productos de baja o nula calidad o adulterados. A pesar de ello, hasta ahora no se han realizado de manera rigurosa monografías de las plantas medicinales comúnmente utilizadas en nuestro país.

A partir del año 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) teniendo como objetivo “Establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de este tipo de productos y su uso adecuado” (FHEUM, 2001). Sin embargo, el número de monografías de especies vernáculas e introducidas resultó insuficiente, por la sencilla razón de que no se contaba con la información científica adecuada para su integración.

En consecuencia, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Secretaría de Salud, a través de un proyecto sectorial, en el cual se encuentra enmarcado el presente trabajo, otorgó fondos a un conjunto de investigadores de la UNAM y del INAH para iniciar la elaboración de monografías científicas de tipo OMS de las plantas medicinales mexicanas de mayor uso. Este proyecto de carácter multidisciplinario pretende integrar los parámetros de eficacia preclínica, inocuidad y calidad de varias especies medicinales, incluyendo *Hofmeisteria schaffneri*, una planta ampliamente utilizada en el Valle de México para tratar padecimientos gastrointestinales y que constituye el eje central de este trabajo de investigación.

II. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS, FARMACOLÓGICOS Y FITOQUÍMICOS DE *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae).

La familia Asteraceae es una de las más grandes del reino vegetal con 13 tribus, 1,160 géneros y 19,085 especies. La mayoría de las especies de esta familia son plantas herbáceas o arbustos, con hojas a menudo en roseta basal, y su distribución es cosmopolita; muchas de ellas están bien adaptadas a regiones templadas, secas o montañosas. La distribución de esta familia en México es amplia, existen alrededor de 361 géneros y 3020 especies reconocidas (Canales *et al.*, 2007).

Debido a su amplia distribución esta familia es muy importante en las prácticas médicas tradicionales de nuestro país. De tal forma que el uso medicinal de muchas especies de la familia se encuentra documentado, tanto en el Códice Florentino compilado por el monje Fray Bernardino de Sahagún, como en el Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis (escrita en Nahuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano), mal conocido como Códice Badiano. Ejemplos selectos de plantas medicinales de esta familia son *Heterotheca inuloides* (conocida comúnmente como árnica) ampliamente utilizada como antiinflamatorio; *Artemisia mexicana* (estafiate) ampliamente utilizada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y *Tanacetum parthenium* (tanaceto) utilizada contra la migraña.

Así mismo muchas especies de esta familia son comestibles. Las más conocidas son la lechuga y el girasol.

Desde el punto de vista fitoquímico, las asteráceas han sido objeto de numerosos estudios, los cuales han resultado en el aislamiento de una gran diversidad de metabolitos entre los que destacan acetilenos, (Kwon y Lee, 2001), benzofuranos, cromenos, (Proksch y Rodríguez., 1983), acetilenos, lactonas sesquiterpénicas (Merfort, 2002; Weathers *et al.*, 2006; Quan-Xiang *et al.*, 2006), isocumarinas, (Ferchichi *et al.*, 2006), diterpenoides (El-Seedi *et al.*, 2002) y monoterpenoides, incluyendo derivados del timol, por tan solo mencionar los más importantes (Tori *et al.*, 2001).

El género *Hofmeisteria*, pertenece a la tribu Eupatorieae y comprende 11 especies: *H. crassifolia*, *H. dissecta*, *H. fasciculata*, *H. filifolia*, *H. gentryi*, *H. laphamioides*, *H. pluriseta*, *H. schaffneri*, *H. sinaloenses*, *H. standleyi*, *H. urenifolia*. La especie *H. schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae) (Figura 1) se distribuye en los estados de Jalisco y San Luis Potosí. La especie es ampliamente cultivada en el Distrito Federal y se conoce comúnmente como ámbar.

La planta es un arbusto que habita en ambientes húmedos y cálidos, crece en las grietas de las rocas, en filtraciones y salientes húmedas y la mayoría de las veces en las orillas de los arroyos, florece entre los meses de febrero y abril (Bye y Linares, 2006).

En la medicina popular de México, el ámbar se utiliza para el tratamiento de heridas y la infusión de sus hojas sola, o acompañada con toronjiles (*Agastache mexicana*), se emplea como agua de uso contra padecimientos del tracto gastrointestinal como vomito, diarrea y dolor de estómago (Bye y Linares, 2006).



Figura 1. *Hofmeisteria schaffneri*.

La especie vegetal se comercializa en casi todos los mercados del DF tanto fresca como seca. La empresa Tecno Botánica de México S.A. de C.V. la comercializa como un suplemento alimenticio (Figura 1).

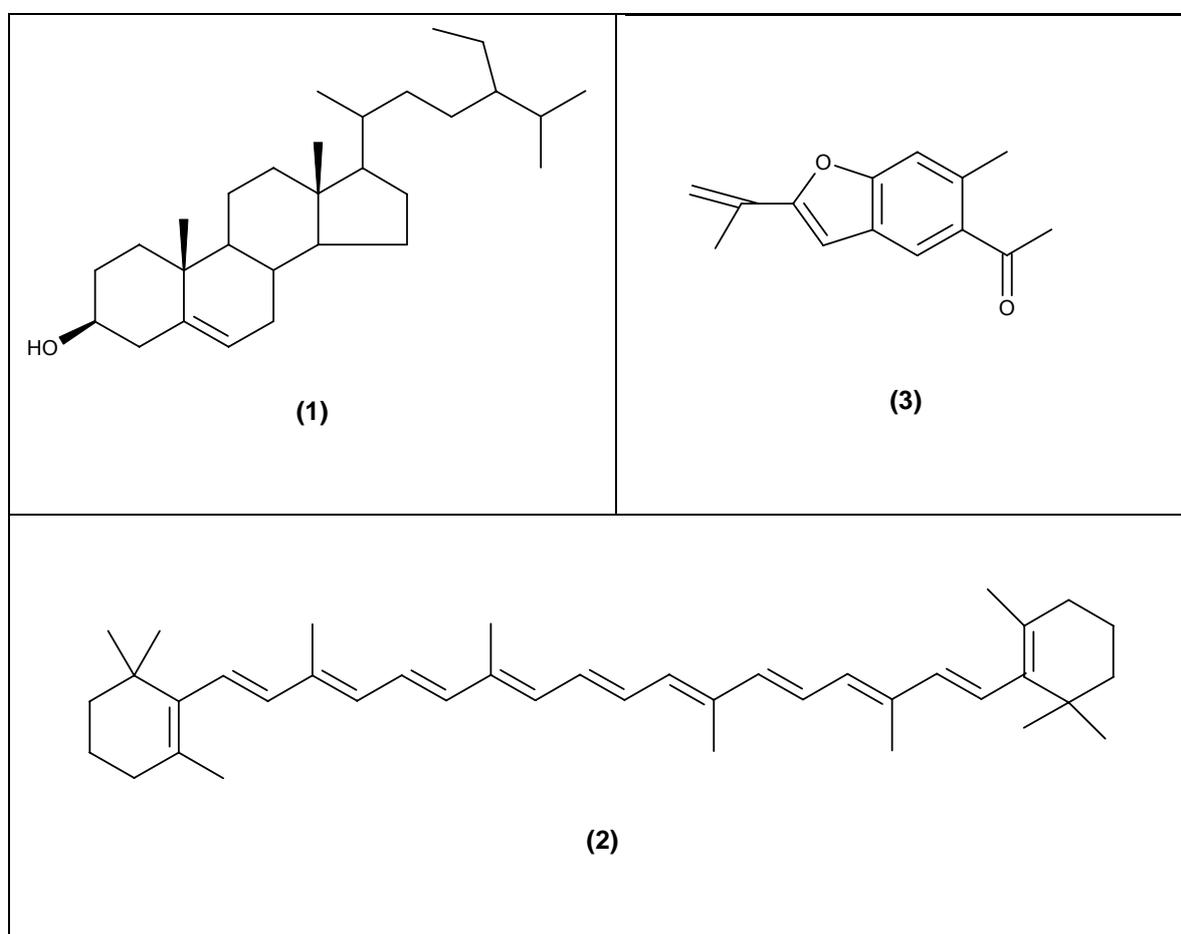
Un estudio preliminar de un extracto fitotóxico preparado a partir de las partes aéreas de la planta permitió el aislamiento y caracterización del β -sitoesterol (**1**), β -caroteno (**2**), euparina (**3**), acetato de 2'-(2'-hidroxi-4''metilfenil)-

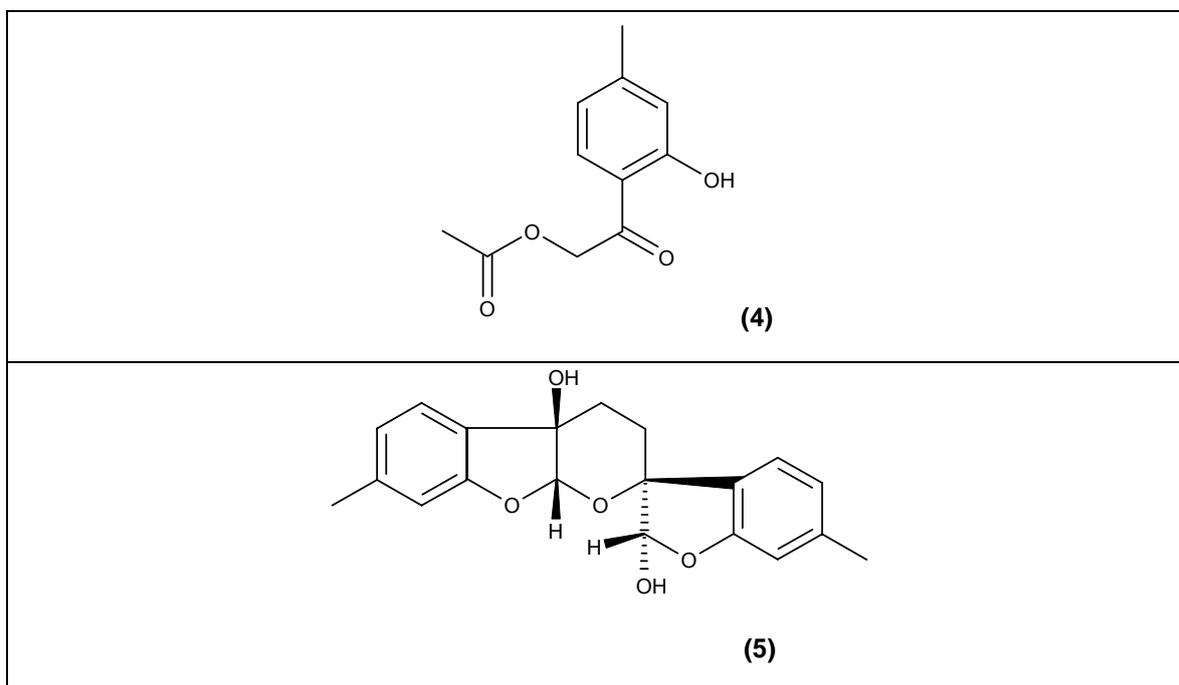
2'-oxo-etilo (**4**) y 3',4',4a',9a'-tetrahidro- 6,7'-dimetilespiro [benzofuran-3(2*H*),2' - pirano[2,3-*b*] benzofurano]-2,4a'-diol (**5**) (Pérez-Vásquez *et al.*, 2005). (Cuadro 1).

En ese estudio se estableció que los compuestos **4** y **5** poseen una notable actividad fitotóxica contra *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.

En ese trabajo también se describió una síntesis formal del producto **4**.

Cuadro 1. Compuestos aislados de *H. shaffneri*.



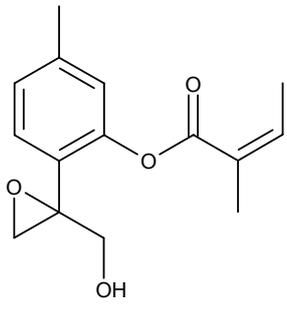
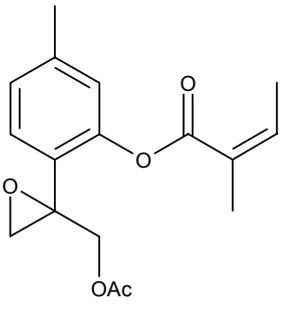
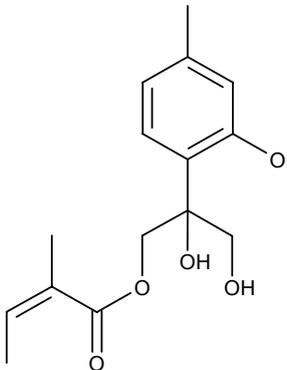
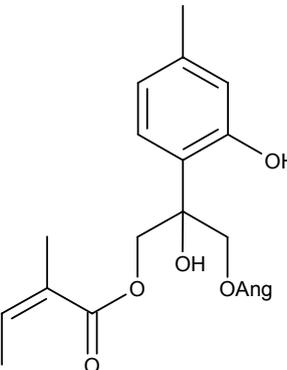
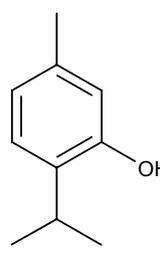
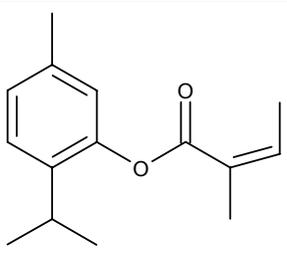
Cuadro 1. Compuestos aislados de *H. schaffneri*. (Continuación).

Posteriormente, Pérez-Vásquez *et al.*, 2007 describieron el aislamiento de ocho monoterpenoides adicionales (Cuadro 2). Los productos **6-10** se obtuvieron de la infusión de la planta en tanto que el **4** se obtuvo a partir de un extracto orgánico. Todos estos terpenoides presentaron propiedades fitotóxicas contra las malezas antes mencionadas.

2.2. NOCICEPCIÓN.

La prueba de eficacia utilizada en el presente estudio consistió en determinar el potencial antinociceptivo de preparados de la especie *H. schaffneri*, por lo tanto, en los párrafos siguientes se describirá brevemente generalidades de la nocicepción.

Cuadro 2. Monoterpenoides adicionales de *Hofmeisteria schaffneri*.

 <p>(6)</p>	 <p>(7)</p>
 <p>(8)</p>	 <p>(9)</p>
 <p>(10)</p>	 <p>(11)</p>

El dolor se manifiesta por un proceso neurofisiológico denominado nocicepción. Para percibir la nocicepción es necesario un estímulo nocivo, el cual puede ser de tipo químico, mecánico, eléctrico o térmico (Yaksh, 1997). Los

estímulos nocivos llegan a los nociceptores (receptores del dolor) localizados en piel y otros tejidos.

En el proceso nociceptivo participan varios mediadores neuroquímicos. Por ejemplo, cuando se detecta un estímulo nocivo, los nociceptores liberan sustancias tales como: prostaglandinas, serotonina y bradisinina, entre otros mediadores, que participan en la generación de potenciales de acción, que se transmiten a través de las fibras A δ y C en los nervios periféricos y sensibilizan a los nociceptores (Millan, 1999). Una vez activado el nociceptor comienza el proceso fisiológico del dolor, el cual está constituido por cuatro etapas: transducción, transmisión, modulación y percepción (Figura 2).

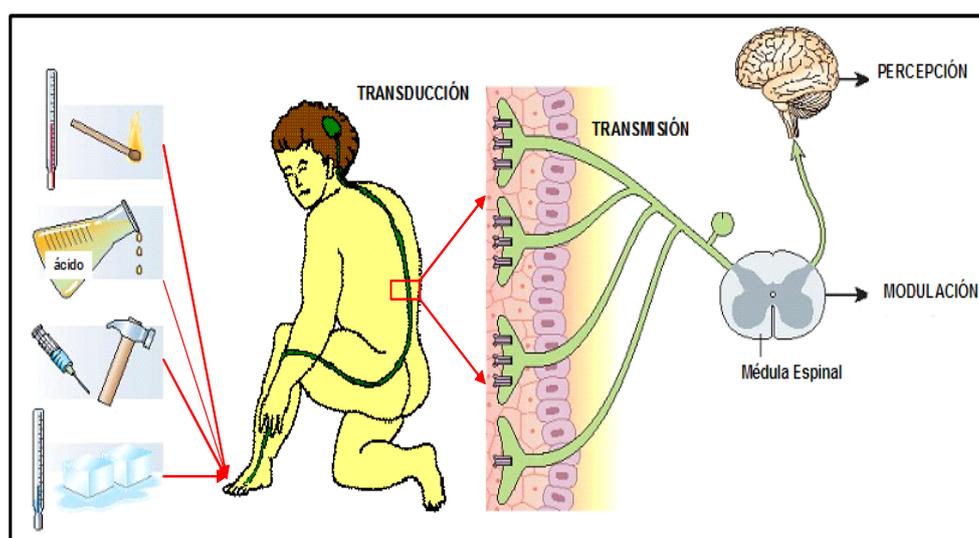


Figura 2. Sistema de transmisión de la nocicepción: Traducción, el estímulo nociceptivo (térmico, mecánico o químico) es transformado en potenciales de acción en las terminales de fibras aferentes periféricas; transmisión, los potenciales de acción viajan a través de la vía aferente primaria hasta llegar a la médula espinal; modulación, en la médula espinal se forman sinápsis con neuronas que suben a centros superiores; percepción, integración de la señal nociceptiva en la corteza somatosensorial (Wolf y Salter, 2000).

2.2.1. Activación de los nociceptores térmicos

Los nociceptores térmicos han sido identificados recientemente como parte de un sistema de receptores denominados vanilloides (Arendt-Nielsen y Chen, 2003).

Entre estos, los VR1 son activados por capsaicina a una temperatura de aproximadamente 43°C; a mayores temperaturas (i.e. 52°C) esta misma substancia estimula, una variante del receptor designado como VRL-1. Estos receptores no solo existen en los nervios periféricos, sino también en las neuronas sensoriales primarias, espina dorsal y raíz ganglio dorsal. Por lo tanto para bloquear el estímulo térmico, los fármacos utilizados deben de actuar a nivel se sistema nervioso central. Algunos de los fármacos que se han utilizado para combatir dolor a este nivel han sido los opioides, los cuales mimetizan la actividad de las endorfinas que se encuentran en nuestro organismo (Mizoguchi *et al.*, 1999).

2.2.2. Activación de los nociceptores químicos

El tracto gastrointestinal posee un sin numero de inervaciones, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los órganos que poseen una estructura hueca (estómago, vejiga y colon) y donde es posible percibir el dolor. Las innervaciones provienen tanto del nervio vago como de la espina dorsal. Existen dos clases fisiológicas de nociceptores viscerosensoriales: Los de umbral alto, que responden a un estímulo de alta intensidad, y los de umbral bajo en los que estímulos no dolorosos se convierten en dolorosos. Recientemente se han encontrado los llamados receptores silenciosos que se activan solo en presencia de un proceso inflamatorio liberándose sustancias como las prostaglandinas, leucotrienos, histamina entre algunas otras. Los receptores de umbral alto se encuentran altamente relacionados con el dolor visceral agudo y generalmente el dolor se presenta de manera irradiada, por los que muchas veces es un poco difícil su localización (Cervero y Laird, 1999).

2.3 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA NOCICEPCIÓN.

Existen varios ensayos experimentales frecuentemente utilizados para la evaluación del potencial antinociceptivo de productos naturales. Las pruebas más utilizadas involucran estímulos térmicos o químicos. Los modelos más comunes que emplean estímulos térmicos son el del golpe de cola y el de placa-caliente. Para las pruebas de nocicepción química se utilizan agentes algogénicos intradérmicos o intraperitoneales; los ensayos más comunes son los de la formalina y estiramiento abdominal, respectivamente (Williamson *et al.*, 1996).

2.3.1. Modelo de la placa caliente

Esta prueba consiste en colocar al animal en una placa caliente que tiene una temperatura que puede variar entre 45 y 56 °C. La rata o ratón ante el estímulo térmico pueden generar varios tipos de conducta anormal como son: Sacudida, lamida de la pata trasera y salto. Al menos una de estas conductas debe presentarse en un experimento. El tiempo transcurrido entre la colocación del ratón en la placa y la manifestación de la conducta anormal se conoce como latencia de respuesta (Woolfe y MacDonald, 1944; Eddy y Leimbach, 1953).

2.3.2. Modelo de estiramiento abdominal

Esta prueba consiste en administrar al animal por vía intraperitoneal una sustancia algésica como ácido acético o acetilcolina, provocando una irritación severa de las membranas, y en consecuencia, comportamientos anormales como contracciones abdominales, movimientos del cuerpo entero (particularmente de las patas traseras), torcimiento de los músculos dorso-abdominales, y una reducción de la actividad motora. Estos comportamientos son considerados como reflejos y constituyen una evidencia de dolor visceral (Koster *et al.*, 1959). Los agentes

analgésicos reducen el número de estiramientos o respuestas reflejas ante el estímulo químico.

2.4. TOXICIDAD

El objetivo de los estudios toxicológicos es "evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas". Particularmente, la toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de ese agente. La toxicidad aguda se expresa como dosis letal 50 (DL₅₀), que representa la dosis del agente que produce la muerte en el 50% de los animales (Tallarida, 1979).

Uno de los métodos más sencillos para determinar la toxicidad de una sustancia es el método de Lorke (1983). El estudio se realiza en ratones y el protocolo consiste en tratarlos, en una primera fase, con dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg del material objeto de análisis durante 14 días. A lo largo de ese período se observan las posibles reacciones adversas y el índice de mortalidad de los animales. En una segunda fase, otro grupo de animales se trata con dosis mayores. De nueva cuenta se analizan las reacciones adversas y la mortalidad provocada por los tratamientos durante catorce días. Para obtener la DL₅₀, se calcula la media geométrica con base en las dosis a las cuales se presentó la mortalidad de los animales en las dos fases. Si en ninguna de las fases se presenta la mortalidad de los roedores es necesario repetir los estudios a dosis mayores si se quiere establecer con precisión la DL₅₀.

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La especie vegetal *H. schaffneri* se comercializa ampliamente en los mercados de San Luis Potosí y Valle de México para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Bye y Linares, 2006), sin embargo, a la fecha no se cuenta con información científica relacionada con su inocuidad y eficacia. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo primordial generar algunos parámetros de inocuidad y eficacia de *Hofmesiteria schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae), de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002; WHO 1999). La información generada contribuirá a la elaboración futura de una monografía integral tipo OMS que incidirá en el uso racional de esta especie medicinal.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la toxicidad aguda en ratones de acuerdo con el método de Lorke de un extracto preparado a partir de las partes aéreas de *H. schaffneri* con el propósito de comenzar los estudios de inocuidad.
2. Determinar el potencial antinociceptivo del extracto, infusión y aceite esencial de *H. schaffneri* utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal, con la finalidad de corroborar de manera parcial la eficacia de esta planta en las prácticas médicas alternativas de México.
3. Iniciar los estudios del mecanismo de acción antinociceptivo del/ o los compuestos que resultasen activos en las evaluaciones biológicas.

IV. HIPÓTESIS

La información etnobotánica recopilada por Bye y Linares (2006) en su proyecto sobre las plantas medicinales en los mercados del centro y norte del país, conduce a proponer la siguiente hipótesis general de trabajo:

El uso popular de *H. shaffneri* permite suponer que la especie vegetal posee propiedades antinociceptivas, y/o espasmolíticas, antibacterianas y antiprotozoarias, además de presentar poca o nula toxicidad.

En el presente estudio sólo se pretende comprobar parcialmente esta hipótesis, al determinar si la especie posee propiedades antinociceptivas así como una baja o nula toxicidad aguda.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.

5.1.1. Evaluación del efecto antinociceptivo del extracto, aceite esencial, infusión y productos puros de la especie *H. schaffneri* en ratones utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal.

El efecto antinociceptivo se evaluó en los modelos de estiramiento abdominal y en placa caliente que se encuentran ampliamente reportados en la literatura. (Williamson *et al.*, 1996). Se utilizaron ratones machos de la cepa ICR (25-30g), obtenidos de Harlan México A.C. Los animales se mantuvieron a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa de 70 – 80% y un ciclo de 12 h de luz/oscuridad. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 4 días antes del experimento y permanecieron 12 h sin alimento con acceso libre al agua (*ad libitum*) antes de la evaluación.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999). Todos los animales fueron sacrificados después del experimento en una cámara de CO_2 .

5.1.2. Ensayo en el modelo de la placa caliente.

Se utilizó una placa caliente (Modelo 7250, Ugo Basile, Italia) con una temperatura constante de $55.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Los animales se colocaron en un cilindro de acrílico sobre la superficie caliente, esto genera que el ratón presente una respuesta frente al estímulo térmico (lamida de patas traseras, levantamiento de

las patas traseras o salto fuera del cilindro); el tiempo transcurrido entre la colocación del ratón en la placa y el que salta se denomina latencia de respuesta Diagrama 1. El tiempo de corte fue de 30 seg, es decir, si los ratones no presentaban la respuesta antes de 30 seg, se retira de la placa para evitarle una lesión. Los ratones son colocados a los 30, 60, 90, 120 y 150 min.

La administración del extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (10, 31.6, 56.2, 100, 177 y 562 mg/Kg), aceite esencial (1, 3.16, 17.7, 31.6 y 100 mg/Kg), extracto acuoso (10, 52.6, 100, 177 y 316 mg/Kg), angelato de timilo (0.1, 0.316, 1, 3.16, 17.7 y 31.6 mg/Kg) y timol (10, 56.2, 100, 316 y 562 mg/Kg) se realizó por vía oral (p.o) (disueltos en solución salina y con 2% de tween 80). El vehículo (solución salina isotónica (SSI) y tween 2% (p.o) y morfina como fármaco de referencia (3.16 mg/Kg, vía intraperitoneal (i.p.)).

5.1.3. Determinación del efecto antinociceptivo del angelato de timilo en presencia del antagonista opioide naloxona.

El experimento se realizó siguiendo la metodología descrita en el inciso anterior, administrando previamente el antagonista de opioides naloxona (i.p). La secuencia de administración del angelato de timilo y el antagonista en los animales de experimentación se resume en el Diagrama 2.

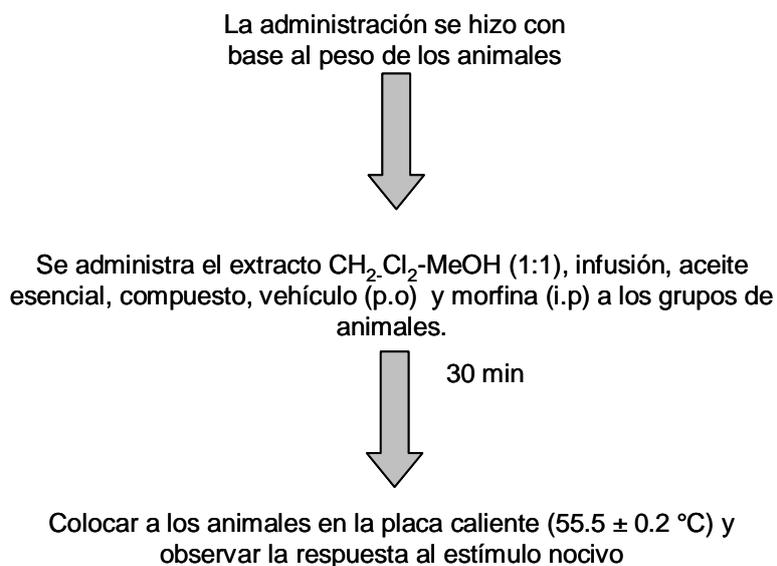


Diagrama 1. Procedimiento para la evaluación del efecto antinociceptivo en la placa caliente.

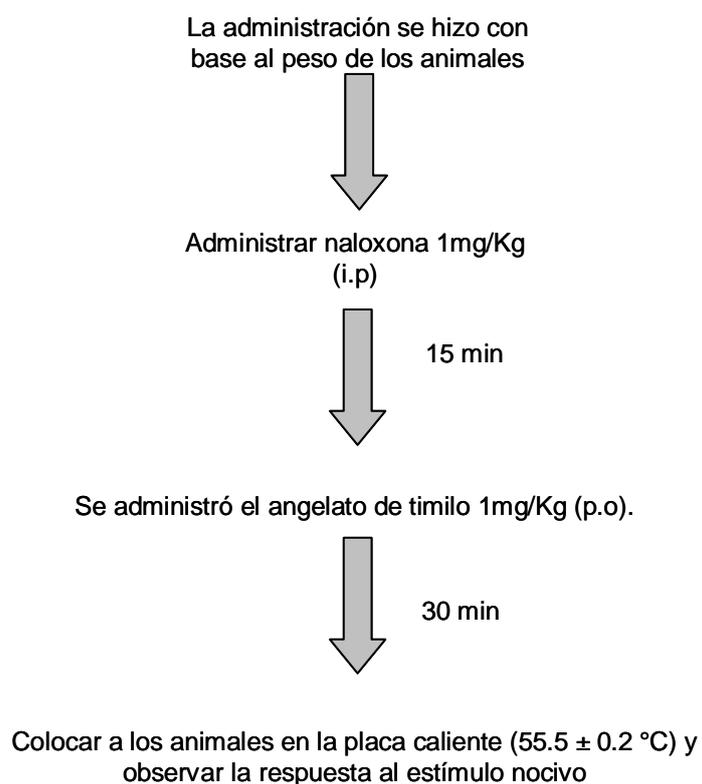


Diagrama 2. Procedimiento para la evaluación del efecto antinociceptivo en presencia del antagonista para opioides naloxona en la placa caliente.

5.1.4. Ensayo en el modelo de estiramiento abdominal.

Esta prueba de nocicepción se realizó utilizando como sustancia algésica el ácido acético al 0.6 % intraperitoneal. La dipirona 100 mg/kg, el vehículo y el extracto de *H. schaffneri* (31.6, 100 y 316 mg/kg), se administraron por vía oral 30 minutos antes del estímulo algésico. Inmediatamente después de la administración del ácido acético, se contó el número de estiramientos presentados por cada ratón, a intervalos de 5 min por un periodo de media hora. En el Diagrama 3 se describe el procedimiento realizado.

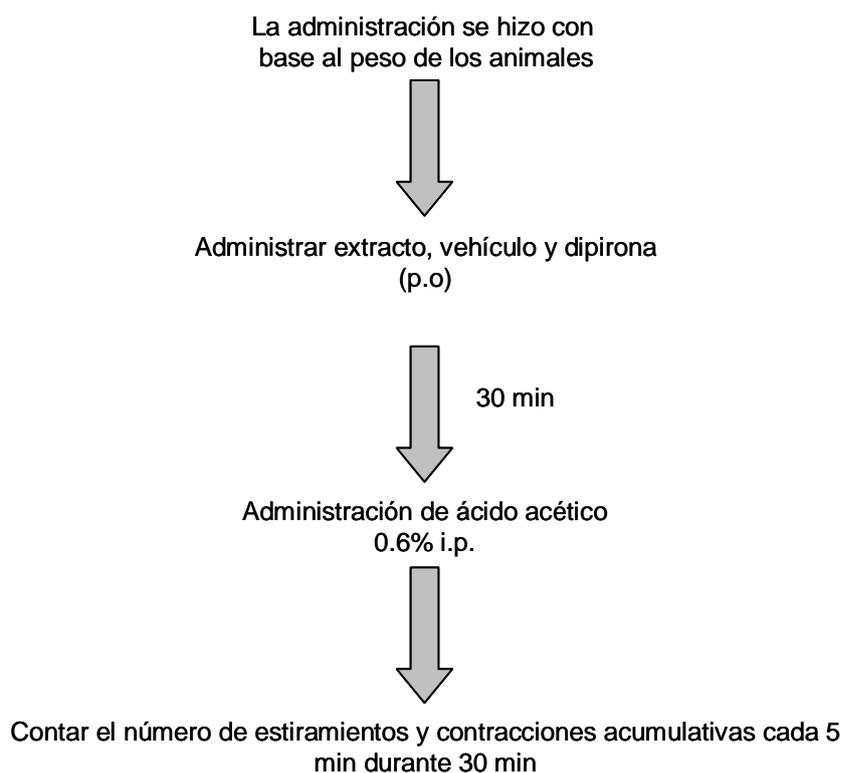


Diagrama 3. Procedimiento de la evaluación del efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal.

5.1.5. Toxicidad aguda

Para determinar la DL₅₀ se utilizó el método de Lorke (1983). Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR (20 g) adquiridos de Harlan México A.C

El experimento constó de dos fases de evaluación; en la primera fase el extracto se administró por vía oral a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, (Diagrama 4) dependiendo del número de muertes se seleccionaron las dosis para la segunda fase de acuerdo al Cuadro 3 (Lorke, 1983).

Antes de la administración de los extractos los animales fueron observados cuidadosamente para conocer su conducta normal. Para cada dosis se utilizaron tres animales, con un grupo control al cual sólo se le administró el vehículo. El parámetro a determinar es el número de muertes por cada dosis (Lorke, 1983).

Cuadro 3. Fase 1 y 2 de la determinación de la toxicidad aguda (Lorke, 1983).

DOSIS (mg/kg) RESULTADOS DE LA FASE 1			DOSIS POR ELEGIR SEGÚN EL NÚMERO DE ANIMALES MUERTOS PARA LA SEGUNDA FASE DE EVALUACIÓN			
10	100	1000				
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

* Número de animales muertos / Número de animales usados.

Después de la administración, los ratones fueron observados durante la primera hora. A todos los animales se les realizó una necropsia, con la finalidad de examinar de manera macroscópica la morfología general de los órganos como corazón, intestino, hígado, pulmón y riñón.

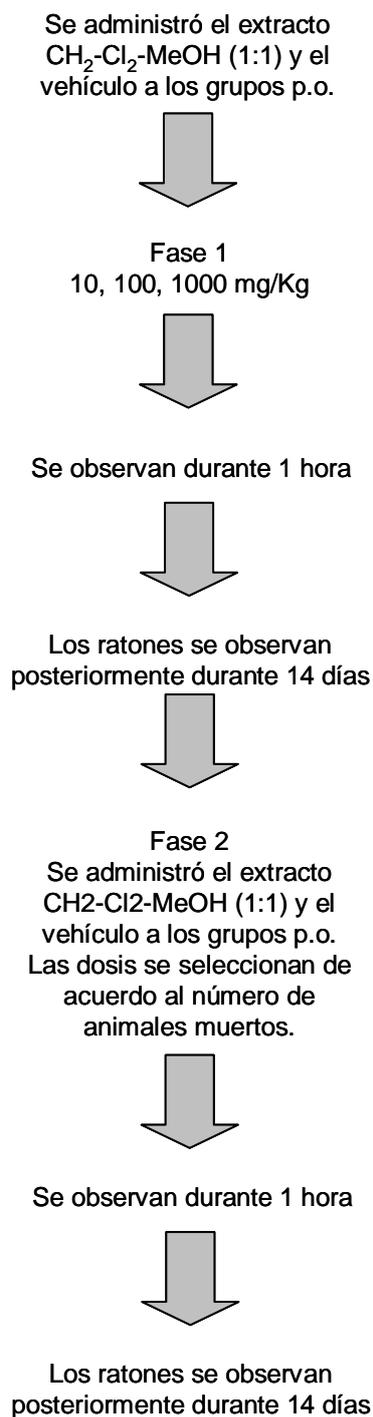


Diagrama 4. Procedimiento para la evaluación de la toxicidad aguda.

5.2. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

Se utilizó la prueba estadística ANADEVVA (análisis de variancia), seguida de la prueba *post hoc* Dunnett ($P < 0.05$). Cada barra representa la media del ABC (área bajo la curva) \pm e.e.m de $n=6$ animales.

El ABC en estiramiento abdominal representa el número de estiramientos por minuto (número de estiramientos*minuto), mientras que el ABC en placa caliente representa la latencia de respuesta por minuto (segundos*minuto).

Para el cálculo de la dosis efectiva 50 (DE_{50}), se requiere realizar una media geométrica.

5.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO.

La separación cromatográfica se realizó en columna abierta; se usaran columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice Kiesegel Merck 60, en tamaños de partícula de 0.063-0.200 mm, malla 70 a 230 ASTM. Para efectuar la cromatografía de capa fina se utilizaron placas de vidrio y aluminio recubiertas de gel de sílice (0.25mm silica gel 60 GF₂₅₄, Merck malla 3.5-7 μ m ASTM), utilizando diversos sistemas de elusión y como agente cromógeno sulfato cérico desarrollando color al calentar 110°C durante aproximadamente 1 minuto.

5.3.1. Equipos utilizados para determinar las constantes espectroscópicas y espectrofotométricas.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y se reportan sin corregir. Los espectros de RMN (¹H 300 MHz), (¹³C 75 MHz), HSQC y HETCOR se realizaron en un equipo Varian UNITY PLUS 500 utilizando CDCl₃

como disolvente y TMS como referencia interna. Los espectros de masas por impacto electrónico (IE) se registraron en un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa (70eV).

5.3.2. Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto total de *H. schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae).

Cuadro 4. Material vegetal.

Material vegetal(partes aéreas)	Lugar de colecta	Clasificación Botánica realizada por	Número de Voucher
Extracto	San Luis Potosí Febrero 2006	Bye & Linares	Herbario Nacional (MEXU) 34611
Aceite esencial	Ozumba Edo de Mex Febrero 2006	Bye & Linares	Herbario Nacional (MEXU) 34613
Infusión	Ozumba Edo de Mex Febrero 2006	Bye & Linares	Herbario Nacional (MEXU) 34613

El proceso de desecación de partes aéreas se realizó a temperatura ambiente, posteriormente se fragmentó en un molino de cuchillas Wiley Modelo 4.

5.3.2.1. Obtención del extracto de las parte aérea de *H. schaffneri*.

Las partes aéreas secas (1.6 Kg) y molidas se extrajeron mediante maceración con una mezcla de CH₂-Cl₂-MeOH (1:1) de manera exhaustiva. El extracto resultante se concentró a sequedad en un rotaevaporador, obteniéndose 350 g de extracto crudo.

5.3.3.2. Fraccionamiento primario del extracto CH₂Cl₂- MeOH.

El extracto total (350 g) fue sometido a un proceso de fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta, utilizando 818 g de gel de sílice como fase estacionaria y como eluyentes se emplearon mezclas de Hexano-

CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH. Se recolectaron un total de 272 fracciones y se agruparon en 12 fracciones primarias de acuerdo a su similitud cromatográfica (Cuadro 5). El proceso de extracción y fraccionamiento primario se resumen en el Diagrama 5.

Cuadro 5. Fraccionamiento primario del extracto CH₂Cl₂- MeOH (1:1).

Fracciones	Sistema de elusión	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave
1-48	Hex-CH ₂ -Cl ₂	50:50	1-7	F1
49-65	Hex-CH ₂ -Cl ₂	40:60	8-14	F2
66-111	Hex-CH ₂ -Cl ₂	30:70	15-29	F3
112-120	Hex-CH ₂ -Cl ₂	20:80	30-67	F4
121-131	Hex-CH ₂ -Cl ₂	10:90	68-149	F5
132-145	CH ₂ -Cl ₂	100	150-173	F6
146-159	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	99:1	174-192	F7
160-186	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	98:2	193-203	F8
187-198	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	97:3	204-243	F9
199-214	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	96:4	244-253	F10
215-229	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	95:5	254-259	F11
230-244	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	90:10	260-272	F12
245-250	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	80:20		
251-261	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	70:30		
262-266	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	60:40		
267-272	CH ₂ -Cl ₂ -MeOH	50:50		

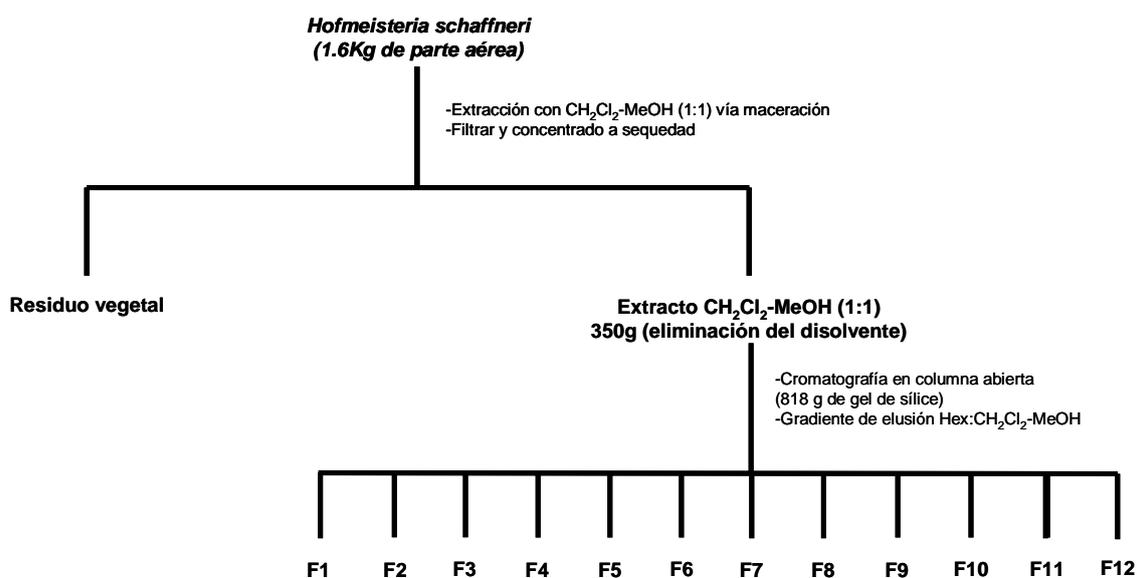


Diagrama 5. Fraccionamiento primario del extracto CH₂Cl₂- MeOH (1:1).

5.3.2.3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F2.

La fracción primaria F2 (4g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta, utilizando una columna de vidrio empacada con gel y una mezcla de Hexano-AcOEt (60:40), obteniéndose un total de 19 fracciones que se reunieron en 8 fracciones las cuales son indicadas en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción F2

Fracciones	Sistema de elusión	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-19	Hex-AcOEt	60:40	1-2	F2-1	0.081
			2-4	F2-2-4	1.500
			5	F2-5	0.431
			6-7	F2-6-7	0.102
			8	F2-8	0.162
			9-15	F2-9-15	0.317
			16	F2-16	0.083
			17-9	F2-17-19	1.002

5.3.2.3.1. Aislamiento y purificación del angelato de timilo y de timol.

La fracción F2-2-4 (1.5 g) contenía como producto mayoritario angelato de timilo y en menor cantidad timol. Parte de esta fracción (750mg) se separó por cromatografía en capa fina para obtener 300 mg de angelato de timilo como un aceite idéntico a una muestra auténtica (Pérez-Vásquez *et al.*, 2007) y 237.3 mg de timol como un sólido blanco (Diagrama 6).

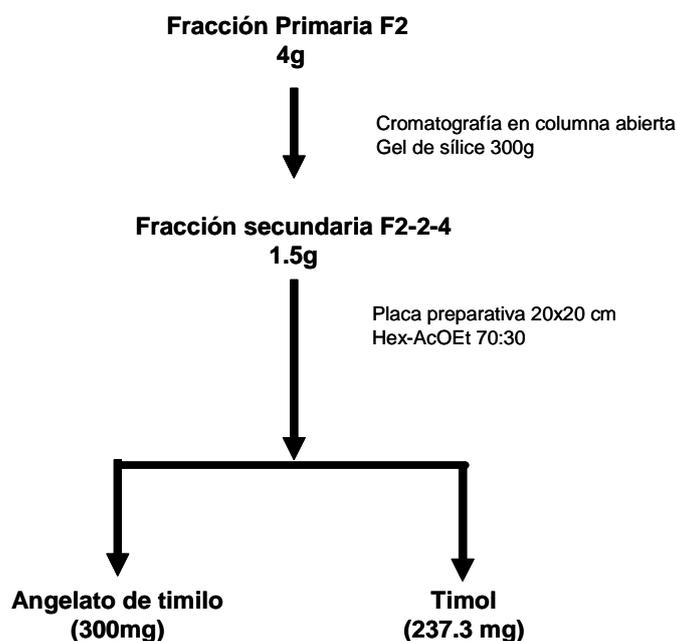


Diagrama 6. Aislamiento y purificación del angelato de timilo y timol

5.3.2.4. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3

La fracción primaria F3 (4.4 g) se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta, utilizando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (300 g) y un gradiente de elusión de Hexano-AcOEt, obteniéndose un total de 188 fracciones que se reunieron en 15 fracciones, las cuales son indicadas en el Cuadro 7.

5.3.2.5. Fraccionamiento terciario de la fracción F3-95-99

La fracción secundaria F3-95-99 se sometió a un fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta, empleando una columna de vidrio empacada con gel de sílice (50 g) que se eluyó de manera isocrática utilizando

una mezcla de Hex-AcOEt (80:20), obteniéndose un total de 23 fracciones que se reunieron en 9 fracciones, como se indican en el Cuadro 8.

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario de la fracción F3.

Fracciones	Sistema de elusión	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-12	Hex	100	1-19		
13-72	Hex-AcOEt	97:3	20-24		
73-94	Hex-AcOEt	95:5	25-38	F3-25-38	0.183
95-118	Hex-AcOEt	90:10	39-72	F3-39-72	0.6038
119-142	Hex-AcOEt	85:15	73-87	F3-73-87	0.9926
143-169	Hex-AcOEt	70:30	88-94	F3-88-94	0.1273
170-176	Hex-AcOEt	60:40	95-99	F3-95-99	0.415
177-182	Hex-AcOEt	50:50	100-122		
183-188	AcOEt	100	123-135		
			136-142		
			143-148		
			149-161		
			162-175		
			176-182		
			183-188		

Cuadro 8. Fraccionamiento terciario de F3-95-99.

Fracciones	Sistema de elusión	Proporción (%)	Fracciones reunidas	Clave	Peso (g)
1-23	Hex-AcOEt	80:20	1		
			2		
			3		
			4		
			5		
			6-7	F3-88-94 (6-7)	0.0663
			8-11	F3-95-99 (8-11)	0.2415
			12-16	F3-95-99 (12-16)	0.04800
			17-23		

5.3.2.5.1. Aislamiento y purificación del 2-[2-(acetoximetil) oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.

Una muestra de 50 mg de la fracción terciaria F3-95-99 (8-11) se purificó cromatografía en capa fina usando placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas de una capa de 0.25 mm silica gel 60 GF₂₅₄, (Merck) como eluyente una mezcla de Hex-AcOEt (70:30), para obtener 25mg del compuesto. Diagrama 7.

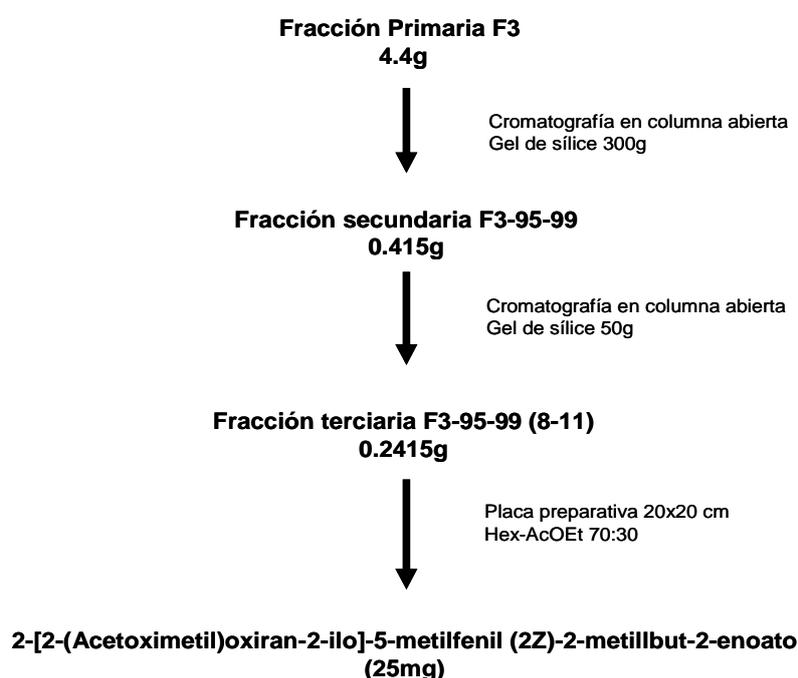


Diagrama 7. Aislamiento y purificación del compuesto 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.

5.3.3. Obtención del aceite esencial.

El aceite esencial se preparó por el método de hidrodestilación (FHUM, 2001) empleando un sistema de destilación simple. Se colocaron en un matraz de 5 L, 600 g de material vegetal y 3400 mL de agua. Al cabo del proceso, el

destilado se sometió a una partición con diclorometano, para obtener el aceite esencial.

5.3.4. Preparación del extracto acuoso

Se ocuparon 108 g de material vegetal que debe estar seco y triturado (manualmente). Se vierten sobre 3000 mL de agua en ebullición. Se deja reposar por 15 min y aun caliente se filtra sobre papel filtro o algodón (previamente lavado). Se deja por 24h en refrigeración y se particiona con CH_2Cl_2 .

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se determinaron algunos parámetros de inocuidad y eficacia de la droga cruda. En relación a la eficacia sólo se establecieron las propiedades antinociceptivas de la planta. Con respecto a su efecto tóxico potencial se determinó su toxicidad aguda por el método de Lorke (1983). Estos resultados en conjunto con los derivados de los estudios químicos, farmacológicos adicionales, toxicológicos, históricos, etnobotánicos y antropológicos correspondientes permitirán la elaboración de la monografía científica de esta especie medicinal.

En los siguientes párrafos se describirán los resultados obtenidos en el presente trabajo.

6.1 PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

6.1.1. Evaluación de la toxicidad aguda del extracto orgánico de *H. schaffneri*.

La determinación de la toxicidad aguda es una de las primeras pruebas que se realizan para determinar el potencial tóxico de una sustancia pura o de un extracto natural. Uno de los métodos más utilizados es el de Lorke (1983) que ofrece una serie de ventajas, incluyendo el hecho de que se emplean pocos animales durante el estudio y permite estimar de manera sencilla la toxicidad aguda.

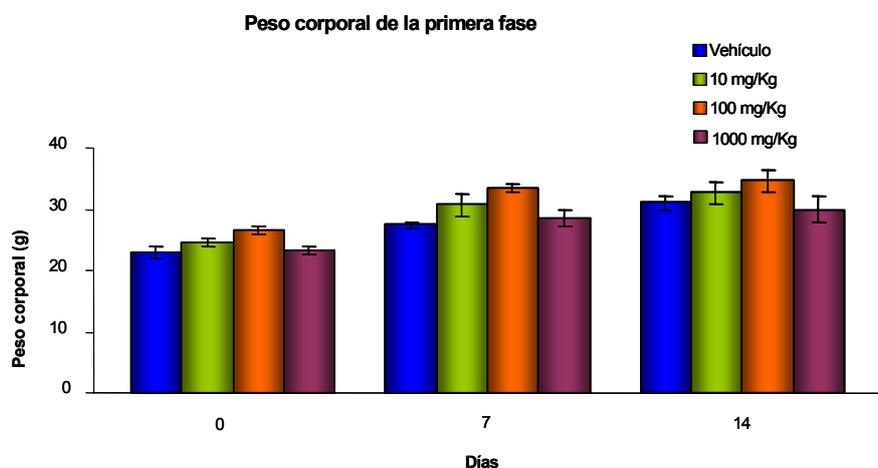


Figura 3. Peso corporal de los ratones durante la primera fase del método de Lorke. Cada barra representa la media \pm e.e de $n=3$ animales.

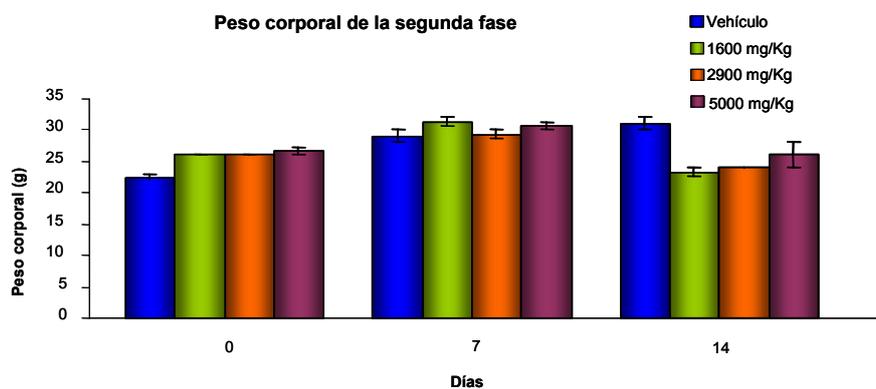


Figura 4. Peso corporal de los ratones durante la segunda fase del método de Lorke. Cada barra representa la media \pm e.e de $n=3$ animales.

En síntesis, el extracto de *H. schaffneri* no provoca efectos tóxicos agudos importantes, sin embargo, es necesario realizar pruebas de toxicidad crónica para completar los estudios de inocuidad en animales y discernir si la pérdida de peso observada en los tres últimos días de la fase 2 obedece a efectos tóxico.

6.2. PRUEBAS DE EFICACIA

6.2.1. Evaluación del extracto orgánico CH₂Cl₂-MeOH (1:1), infusión y aceite esencial de *H. schaffneri* en los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal.

La prueba de eficacia realizada en este estudio consistió en la determinación del potencial antinociceptivo utilizando los modelos de estiramiento abdominal y de la placa caliente en ratones (Williamson *et al.* 1996). Estas pruebas permiten evaluar efectos antinociceptivos asociados con dolor de tipo visceral y central, respectivamente. Los ensayos farmacológicos se seleccionaron con base en el uso de la planta para el tratamiento de cólicos estomacales. En estudios futuros, y como parte de otra propuesta de investigación, se analizarán otros efectos farmacológicos asociados al uso principal de la planta incluyendo su potencial antimicrobiano, antiprotozoario y espasmolítico.

Para establecer el efecto antinociceptivo de la planta en el modelo de placa caliente se evaluaron los extractos acuosos y CH₂Cl₂-MeOH (1:1) así como el aceite esencial preparados por los métodos de infusión, maceración, e hidrodestilación, respectivamente.

En el caso del extracto orgánico, los animales se trataron con dosis de 10, 31.6, 56.2, 100, 177 y 562 mg/Kg (p.o). Como se observa en la Figura 5, (A) el efecto analgésico del extracto fue significativo con los tratamientos de 177 mg/Kg a partir del minuto 60 y para la dosis de 562 mg/Kg el efecto comenzó al minuto 30 (B), perdurando la actividad hasta el término del experimento.

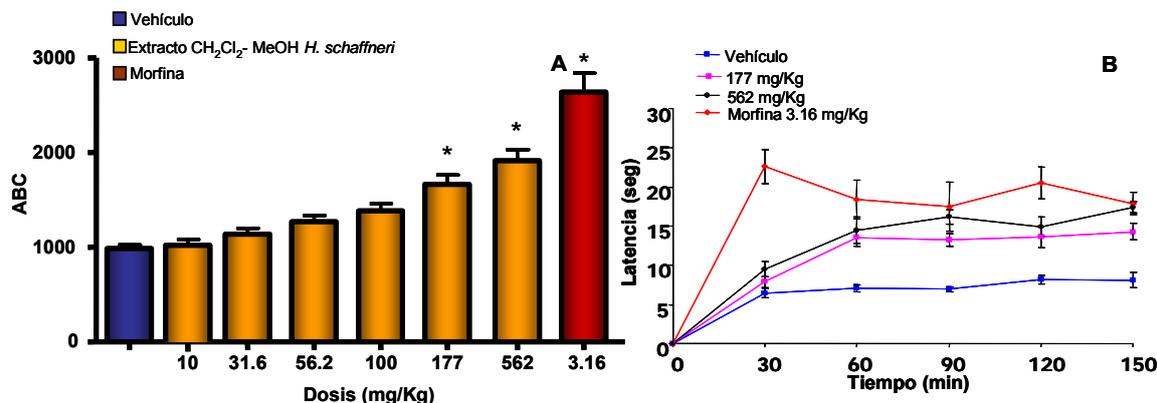


Figura 5. A. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico (CH_2Cl_2 - MeOH) de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnett $*P < 0.05$. **B.** El curso temporal representa la latencia de respuesta a través del tiempo.

En los ensayos con el extracto acuoso, los ratones fueron tratados con 10, 56.2, 100, 177 y 316 mg/Kg (p.o) (A) del mismo 30 minutos antes de aplicar el estímulo nocivo. Como se observa en la Figura 6, el extracto acuoso a todas las dosis, a partir del minuto 30, provocó un efecto analgésico significativo (B). De nueva cuenta el efecto perduró hasta el término del experimento.

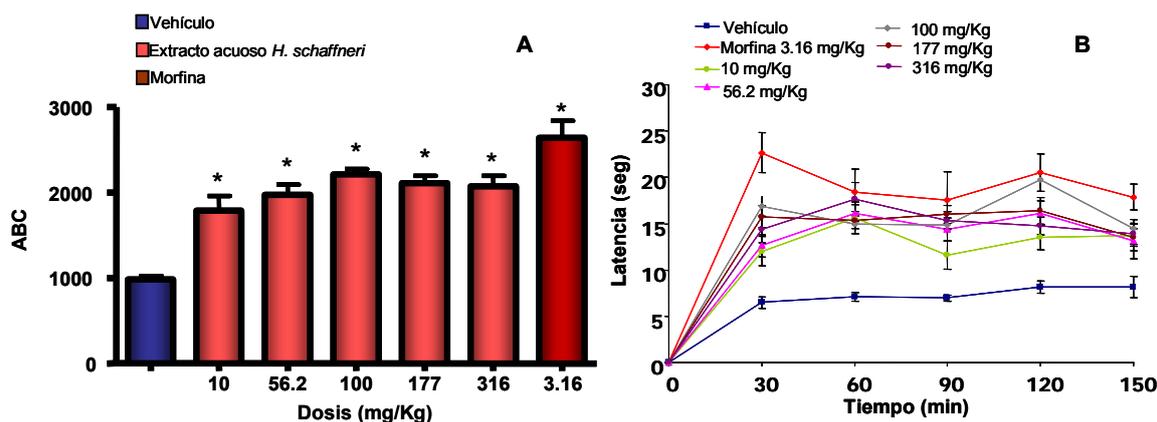


Figura 6. A. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnett $*P < 0.05$. **B.** El curso temporal representa la latencia de respuesta a través del tiempo.

La evaluación del efecto antinociceptivo del aceite esencial, se realizó a las dosis de 1, 3.16, 17.7, 31.6 y 100 mg/Kg (p.o) (A). El efecto antinociceptivo del aceite esencial (Figura 7) fue significativo con los tratamientos de 1, 3.16 y 17.7 mg/Kg a partir del minuto 30 (B), perdurando también hasta el final del experimento.

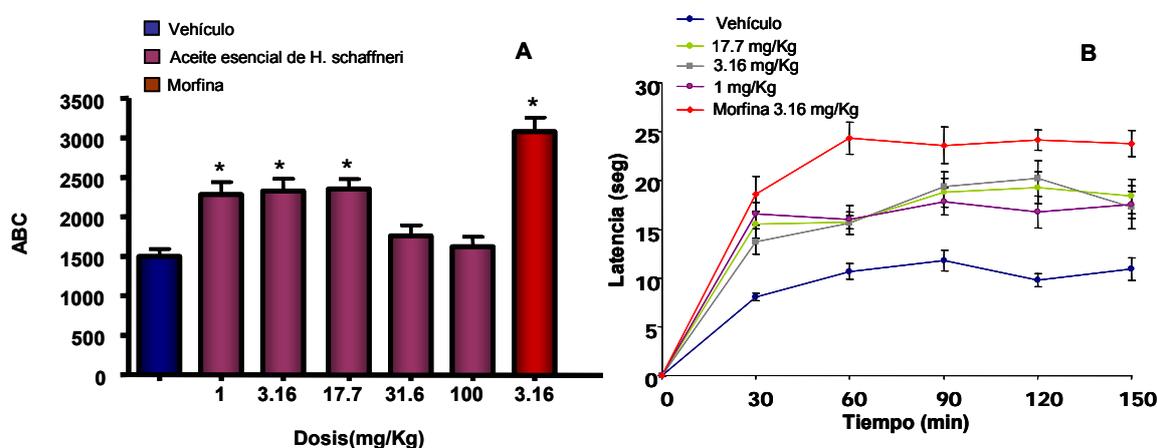


Figura 7. A. Efecto antinociceptivo del aceite esencial de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet $*P < 0.05$. **B.** El curso temporal representa la latencia de respuesta a través del tiempo.

El efecto del extracto fue dependiente de la dosis, sin embargo, este no fue el caso del aceite y el extracto acuoso. Se contempla repetir estas evaluaciones utilizando otro agente de suspensión con la finalidad de descartar que sean problemas de solubilidad los responsables de este tipo de respuesta. También es factible especular la presencia en el aceite y extracto acuoso de sustancias en diferentes proporciones con efectos contrarios.

En el caso de los experimentos con el modelo de estiramiento abdominal tan sólo se evaluó el extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (1:1); para ello los animales se

trataron con dosis de 10, 31.6, 100 y 316 mg/Kg (p.o) del extracto. Como se observa en la Figura 8 (A y B) el extracto no tiene un efecto antinociceptivo estadísticamente significativo en el modelo de dolor visceral. Con base en estos resultados no se considero pertinente evaluar ni el aceite ni la infusión en este modelo.

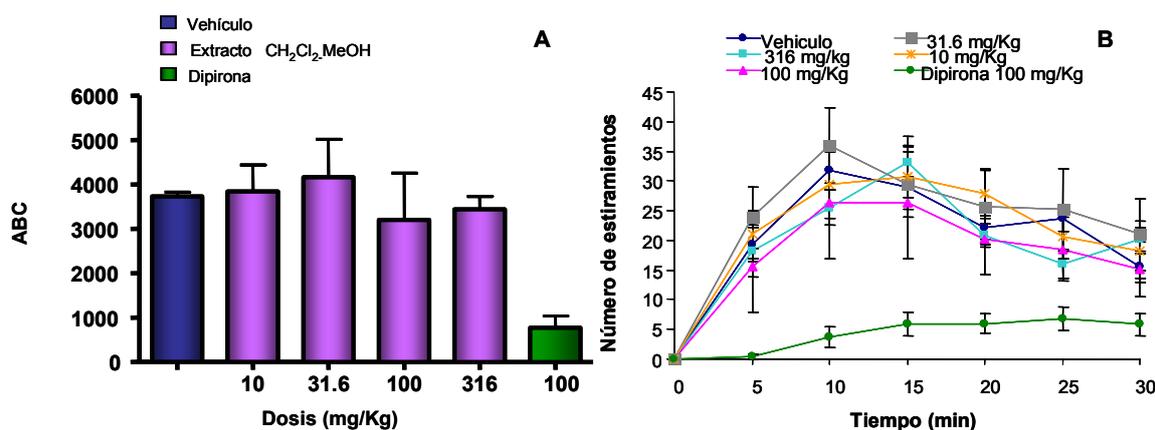


Figura 8. A. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *H. schaffneri* en el modelo de estiramiento abdominal. Cada barra es la media \pm e. e. de n=6 animales. **B.** Curso temporal representa el número de estiramientos a través del tiempo.

En resumen, los extractos y el aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas de *H. schaffneri* presentan un efecto analgésico significativo en el modelo de la placa caliente indicando su posible efectividad para el tratamiento de dolor de tipo central. Las dosis a la que resultaron efectivos los distintos tratamientos son similares a las descritas en la literatura para extractos y preparados vegetales. Sin embargo el extracto no fue efectivo contra el dolor visceral.

6.3. DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS MAYORITARIOS DE *H. schaffneri*.

Con la finalidad de iniciar la búsqueda de los principios activos responsables del efecto antinociceptivo de la planta, se fraccionó el extracto orgánico vía una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso generó doce fracciones primarias (F1-F12). Las fracciones F2 y F3 del extracto orgánico se obtuvieron en buena cantidad y presentaban la menor complejidad. De manera adicional, de acuerdo a un análisis por cromatografía en capa delgada, los compuestos mayoritarios del extracto orgánico y del aceite esencial se encontraban en estas fracciones.

La separación cromatográfica de las fracciones primarias antes señaladas condujo al aislamiento del angelato de timilo (**11**), timol (**10**) y 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato (**7**). Los tres compuestos se caracterizaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con los de muestras auténticas (Pérez Vásquez *et al.*, 2007). El producto **11** es también el constituyente principal del aceite esencial.

6.3.1. Caracterización del angelato de timilo (11).

De manera general, la elucidación estructural del compuesto **11** se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

El compuesto **11** se obtuvo como un aceite rojizo. El espectro en el IR presentó absorciones asociadas a la presencia de grupos carbonilo de éster (1734 cm^{-1}) y anillos aromáticos en $3027, 1620, 1574, 1504, 748\text{ cm}^{-1}$. El espectro de masas determinado por impacto electrónico (EMIE) presentó un ión molecular en

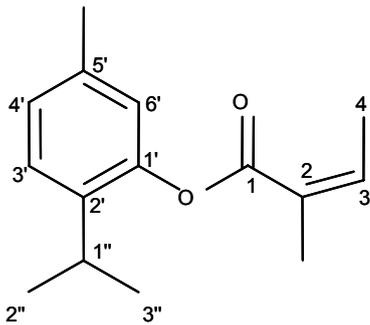
una relación masa-carga (m/z) de 232 uma. La fórmula molecular se estableció como $C_{15}H_{20}O_2$ y permite seis grados de insaturación (ANEXO X).

Los espectros de RMN presentaron señales asociadas con la presencia de un residuo de ácido angélico, un anillo aromático trisustituido y un grupo isopropilo, sugiriendo que el compuesto es un éster del ácido angélico y el timol. Las señales más relevantes son las siguientes (Pérez Vázquez *et al.*, 2007). Cuadro 10 (ANEXO X).

- 1) En la zona donde absorben los hidrógenos aromáticos se apreció un sistema ABX en δ_H 7.21 (*dd*, $J= 7.8$ Hz), 7.01 (*dd*, $J= 7.8, 3$ Hz) y 6.85 (*da*, 3Hz). Estas señales correlacionan en el espectro HETCOR con las señales en δ_C 126.3 (C-3'), 126.9 (C-4') y 122.9 (C-6'), respectivamente. Otras señales para carbonos aromáticos se observaron en δ_C 147.0 (C-1'), 136.5 (C-2') y 137.0 (C-5').
- 2) En la zona de los protones y carbonos vinílicos se observó la señal múltiple característica del único hidrógeno olefínico del ácido angélico en δ_H 6.23 (Joseph-Nathan *et al.*, 1984). Esta señal correlaciona en el espectro HETCOR con la absorción en δ_C 140.3 (C-3). Las otras señales del residuo angelato se observaron en δ_H/δ_C 2.07 *da* / 20.7 (C-4); 2.09 *da* / 15.9 (C-2-CH₃) y en δ_C 166.0 (C-1); 127.3 (C-2).
- 3) Las señales para el isopropilo se aprecian en δ_H/δ_C 2.98 *h* (6.9) / 27.2 (C-1''); 1.20 *d* / 22.9 (C-2''); 1.18 *d* / 22.9 (C-3'').

- 4) Por último, en δ_H/δ_C 2.32 s/20.8 (C-5'-CH₃) se observaron las señales para el metilo sobre anillo aromático de la unidad derivada del timol.

Cuadro 10. Características físicas, espectrofotométricas y espectroscópicas del angelato de timolo.

 <p style="text-align: center;">(11)</p>	<p>IR (max (película) 2962, 2870, 1734, 1224, 1128, 1036, 815 cm⁻¹)</p> <p>UV (max nm (log ()): 228 (4.17))</p> <p>RMNP (300 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (6H, <i>d</i>, H-3''), 1.20 (6H, <i>d</i>, H-2''), 2.07 (6H, <i>da</i>, H-4), 2.09 (6H, <i>da</i>, C-2-CH₃), 2.32 (3H, <i>s</i>, C-5'-CH₃), 2.98 (1H, <i>h</i> (6.9), H-1''), 6.23 (1H, <i>m</i>, H-3), 6.85 (1H, <i>da</i>, (2.8), H-6'), 7.01 (1H, <i>dd</i>, <i>J</i>= 7.8; 2.8 Hz, H-4') y 7.21 (1H, <i>dd</i>, <i>J</i>=7.8 Hz, H-3').</p> <p>EM-IE <i>m/z</i> (rel int): 232 [M]⁺ (9), 149 (10), 135 (12), 105 (5), 83 (100), 55 (30).</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 166 (C-1), 127.3 (C-2), 140.3 (C-3), 20.7 (C-4), 15.9 (2-CH₃), 147.0 (C-1'), 136.5 (C-2'), 126.3 (C-3'), 126.9 (C-4'), 137.0 (C-5'), 122.9 (C-6'), 20.8 (C-5'-CH₃), 27.2 (C-1''), 22.9 (C-2'') y 22.9 (C-3'')</p>
---	---

6.3.2. Caracterización del timol (10).

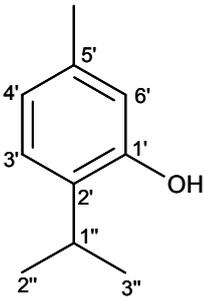
De manera general, la elucidación estructural del compuesto **10** se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos.

El compuesto **10** se obtuvo como un sólido blanco de punto de fusión 50°C. El espectro en el IR presentó absorciones asociadas a la presencia de grupos fenólicos (3228 cm⁻¹) y aromaticidad (2957, 1585, 1516 y 805 cm⁻¹). El espectro de masas determinado por impacto electrónico (EMIE) presentó un ión molecular en una relación masa-carga (*m/z*) de 150 uma. La fórmula molecular se estableció como C₁₅H₂₀O₂ y permite 4 grados de insaturación (ANEXO X).

Los espectros de RMN fueron muy similares a los del compuesto **11**; la principal diferencia consistió en la ausencia de las señales asociadas con el residuo del ácido angélico en los espectros de **10**. En su lugar se apreciaron las

señales asociadas a un grupo hidroxilo de carácter fenólico [δ_H 4.7 sa (OH); δ_C 152.4 (C-1')]. La señal en δ_H 4.7 desaparece al añadir agua deuterada a la muestra. Las asignaciones de las señales se resumen en el Cuadro 11 (ANEXO X).

Cuadro 11. Características físicas y espectroscópicas del timol.

 <p style="text-align: center;">(10)</p>	<p>IR (max (pastilla) 3228, 2957, 1585, 1516 805cm⁻¹)</p> <p>RMNP (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (6H, <i>d</i>, H-3''), 1.24 (3H, <i>d</i>, H-2'') 2.24 (3H, <i>s</i>, C-5'-CH₃), 3.20 (1H, <i>h</i>, H-1''), 4.7 (1H, <i>sa</i>, C-1'-OH), 6.5 (1H, <i>da</i>, C-6'), 6.7 (1H, <i>dd</i>, H-4'), 7.1 (1H, <i>dd</i>, H-3')</p> <p>RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 152 (C-1'), 136.5 (C-5'), 131.3 (C-2'), 126.2 (C-3'), 121.6 (C-4'), 116 (C-6'), 26.68 (C-1''), 22.64 (C-2'' y 3'') y 20.7 (C-5'-CH₃).</p> <p>EM-IE <i>m/z</i> (rel int): 150 [M]⁺ (9), 90 (10), 135 (100).</p>
---	---

6.3.3. Caracterización del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato (7).

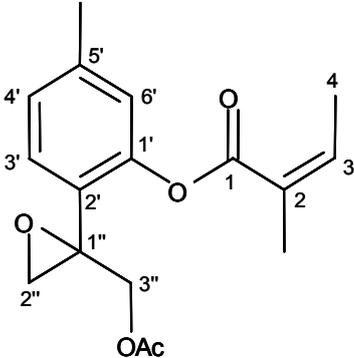
El compuesto **7** se obtuvo como un aceite amarillo ópticamente activo. El espectro en el IR presento absorciones asociadas a la presencia de grupos carbonilo (1739 cm⁻¹) y aromaticidad (3467, 1224 cm⁻¹). El espectro de masas realizado por impacto electrónico (EMIE) presento un ion molecular en una relación masa- carga (*m/z*) de 304 uma. La fórmula molecular se estableció como C₁₇H₂₀O₅ y permite 7 grados de insaturación (ANEXO X).

Los espectros de RMN fueron similares a los del angelato de timilo (**11**) difiriendo en las señales atribuibles al grupo isopropilo. De tal manera que en el compuesto **7** estas señales están ausentes Cuadro 12. En su lugar se observan señales para un grupo hidroximetileno esterificado con un residuo de ácido acético y un grupo

metileno base de un epóxido (ANEXO X). Las características más importantes de estas señales se describen a continuación:

- a) Un sistema AB en δ_H 4.20 (*d*, $J=12$ Hz) y 4.53 (*d*, $J=12$ Hz) asignables a un grupo metileno unido a una función oxigenada. A juzgar por el desplazamiento químico este grupo forma parte de un éster. Estas señales presentan correlación en el espectro HSQC con la señal en δ_C 65.6 (C-3").
- b) En δ_H / δ_C 2.01/15.9 y δ_C 170.3 aparecen señales típicas para un grupo acetato. Este residuo entonces corresponde al grupo esterificante del hidroximetileno descrito en el inciso anterior.
- c) En δ_H 2.83 (*d*, $J=5.1$ Hz) y 3.04 (*d*, $J=5.1$ Hz) se aprecia otro sistema AB atribuible grupo metileno que forma parte de un epóxido. Esta señales correlacionan en el espectro HSQC con la señal en δ_C 126 (C-2"). La presencia de un carbono cuaternario en δ_C confirma la presencia del epóxido.

Cuadro 12. Características físicas, espectrofotométricas y espectroscópicas del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.

 <p style="text-align: center;">(7)</p>	<p>$[\alpha]_D^{25}$ 13.66° (C-1) IR (max (fil) 3467, 1739, 1224cm⁻¹ RMNP (300 MHz, CDCl₃) δ 2.01 (3H, s, OCOCH₃), 2.07 (3H, <i>da</i>, H-4) 2.09 (3H, <i>da</i>, C2-CH₃), 2.36 (3H, s, C-5'-CH₃), 2.83 (1H, <i>d</i>, $J=5.1$Hz, H-2''-α), 3.04 (1H, <i>d</i>, $J=5.1$, H-2''-β), 4.20 (1H, <i>d</i>, $J=12$ Hz, H-3''-α), 4.53 (1H, <i>d</i>, $J=12$ Hz, H-3''-β), 6.31 (1H, m, H-3), 6.94 (1H, s, H-6'), 7.05 (1H, <i>dd</i>, H-4') y 7.38 (1H, <i>d</i>, H-3') RMN-¹³C (CDCl₃, 75 MHz) δ 139.8 (C-5'), 123.1 (C-6'), 148.4 (C-1'), 128.9 (C-3'), 126.7 (C-4'), 21.1 (5'-CH₃), 56.6 (C-1''), 65.6 (C-3''), 50.9 (C-2''), 165.5 (C-1), 126.0 (C-2 y C-2''), 141.5 (C-3), 15.9 (C-4), 20.6 (2-CH₃), 15.92 (OCOCH₃) y 170.3 (OCOCH₃).</p>
--	---

6.1.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DEL TIMOL (10), 2-[2-(ACETOXIMETIL) OXIRAN-2-IL]O-5-METILFENIL (2Z)-2-METILBUT-2-ENOATO (7) Y DEL ANGELATO DE TIMILO (11).

Una vez realizada la caracterización de los compuestos mayoritarios se procedió a la evaluación de su potencial antinociceptivo en el modelo de la placa caliente. En esta ocasión sólo fue posible evaluar los productos **10** y **11** ya que la cantidad aislada de **7** resultó insuficiente para su evaluación farmacológica. En investigaciones futuras se contempla el estudio del efecto antinociceptivo de **7**.

El angelato de timilo (**11**) se evaluó a las dosis de 0.1, 0.316, 1, 3.16, 17.7 y 31.6 mg/Kg (p.o) (**A**). Como se observa en la Figura 9, su efecto fue significativo a las dosis de 0.316, 1, 3.16 y 17.7 mg/Kg a partir del minuto 30 (**B**); la acción duró hasta el final del experimento.

Con la finalidad de establecer si el efecto del producto **11** podría estar mediado por receptores opioides se realizó un experimento adicional. Este consistió en el pretratamiento de los animales con naloxona (1 mg/Kg), un antagonista no selectivo de los receptores opioides. Los resultados indicaron una disminución de la actividad del angelato de timilo a la dosis de 1 mg/Kg (Figura 9). Esta observación permite concluir *a priori* que el efecto farmacológico del compuesto **11** está mediado por receptores opioides. (Andrade *et al.*, 2007; ElHabazi *et al.*, 2006; Ojewole, 2005; Oweyele *et al.*, 2005) Es importante mencionar que los resultados del presente estudio no permiten descartar la participación de otros mecanismos de acción. Actualmente se realizan experimentos adicionales para confirmar o descartar estas

posibilidades. El producto **11** indudablemente es un principio activo antinociceptivo importante de la planta aunque posiblemente no el único.

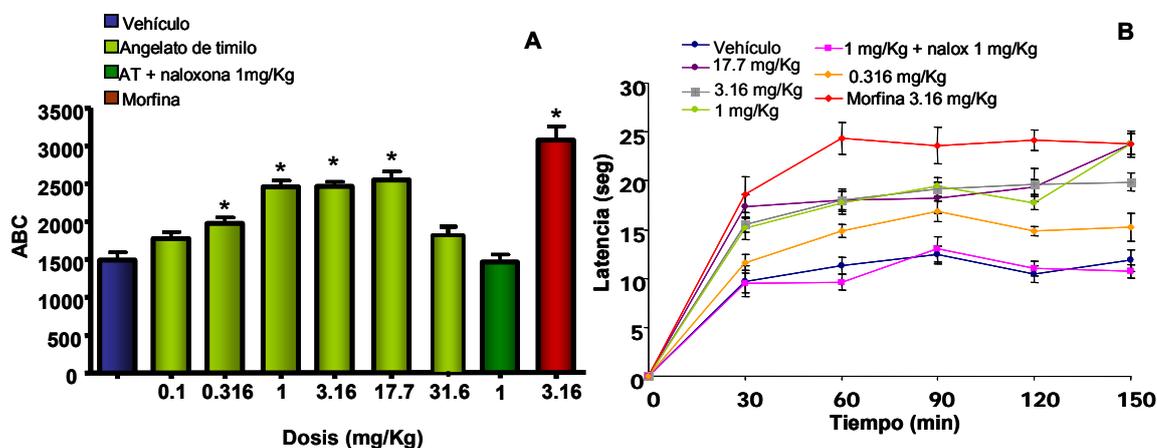


Figura 9. A. Efecto antinociceptivo del angelato de timilo, así como angelato de timilo (1mg/Kg) + naloxona (1mg/Kg) en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de n=6 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet $*P < 0.05$. Además se muestra el curso temporal de las dosis que fueron estadísticamente significativas. **B.** El curso temporal representa la latencia de respuesta a través del tiempo.

La evaluación del efecto antinociceptivo del timol (**10**) se realizó a las dosis de 10, 56.2, 100, 316 y 562 mg/Kg (p.o) (**A**). Como se observa en la Figura 13, el efecto del timol fue significativo sólo a la dosis de 100 mg/Kg a partir del minuto 30 (**B**), perdurando la actividad hasta el término del experimento. Por lo tanto este compuesto es menos eficaz que el producto **11** (Figura 10). Por último, cabe destacar que recientemente se comprobó que tanto el timol (**10**) bloquea los canales de sodio con una potencia comparable a la del anestésico local lidocaina (Haeseler., *et al.* 2002). Este efecto podría estar relacionado con la moderada acción antinociceptiva demostrada para el producto en el presente estudio.

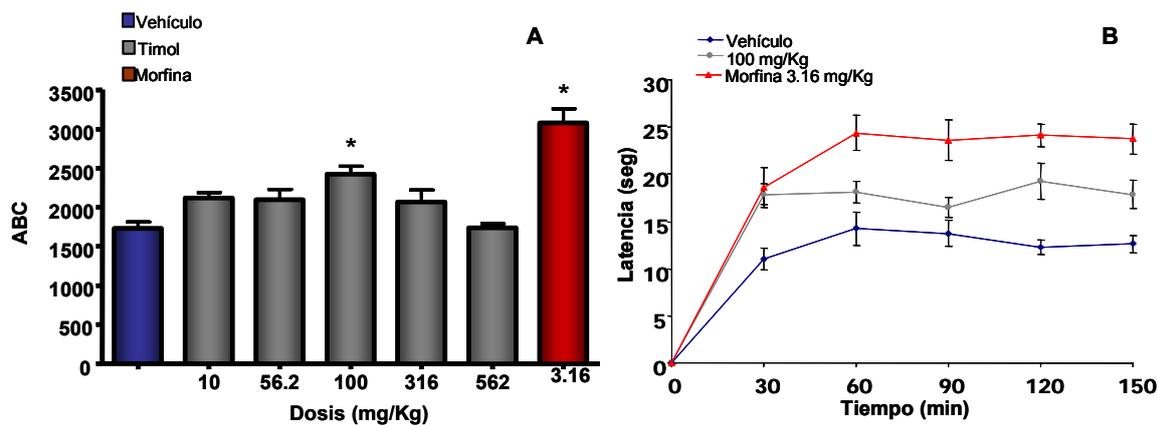


Figura 10. A. Efecto antinociceptivo del timol 10 en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet $*P < 0.05$. **B.** El curso temporal representa la latencia de respuesta a través del tiempo.

VII. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió comprobar parte de la hipótesis general al determinar mediante la experimentación farmacológica apropiada que los extractos, esencia y algunos compuestos mayoritarios (timol y angelato de timilo) de *Hofmeisteria schaffneri*, presentan propiedades analgésicas en ratones de acuerdo al modelo de la placa caliente. Este efecto farmacológico puede contribuir a la eficacia terapéutica de esta planta medicinal ampliamente comercializada en los mercados de San Luís Potosí y de la zona metropolitana de la Ciudad de México para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, incluyendo cólicos.

El mecanismo de acción mediante el cual el angelato de timilo (**11**) ejerce su actividad antinociceptiva involucra la participación de receptores de tipo opioide (μ , δ o κ) ya que el efecto del producto fue antagonizado por la naloxona.

Los resultados preliminares de la toxicidad aguda sugieren la inocuidad del extracto orgánico íntegro de la planta hasta la dosis de 5 g/Kg.

El cumplimiento de los objetivos particulares formulados permiten alcanzar la meta esperada ya que se generó información relevante relacionada con la eficacia e inocuidad de la planta para la futura integración de su monografía.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Determinar el efecto antinociceptivo del 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.
2. Realizar experimentos adicionales con la finalidad de establecer el mecanismo de acción del angelato de timilo y de 2-[2-(acetoximetil)oxiran-2-ilo]-5-metilfenil (2Z)-2-metilbut-2-enoato.
3. Realizar las pruebas de toxicidad crónica.
4. Determinar el potencial antiprotozoario, antibiótico y espasmolítico de la especie medicinal con la finalidad de completar los estudios de eficacia preclínica.
5. Establecer y validar un método analítico para la cuantificación de compuestos marcadores y activos de la especie vegetal.

IX. BIBLIOGRAFÍA

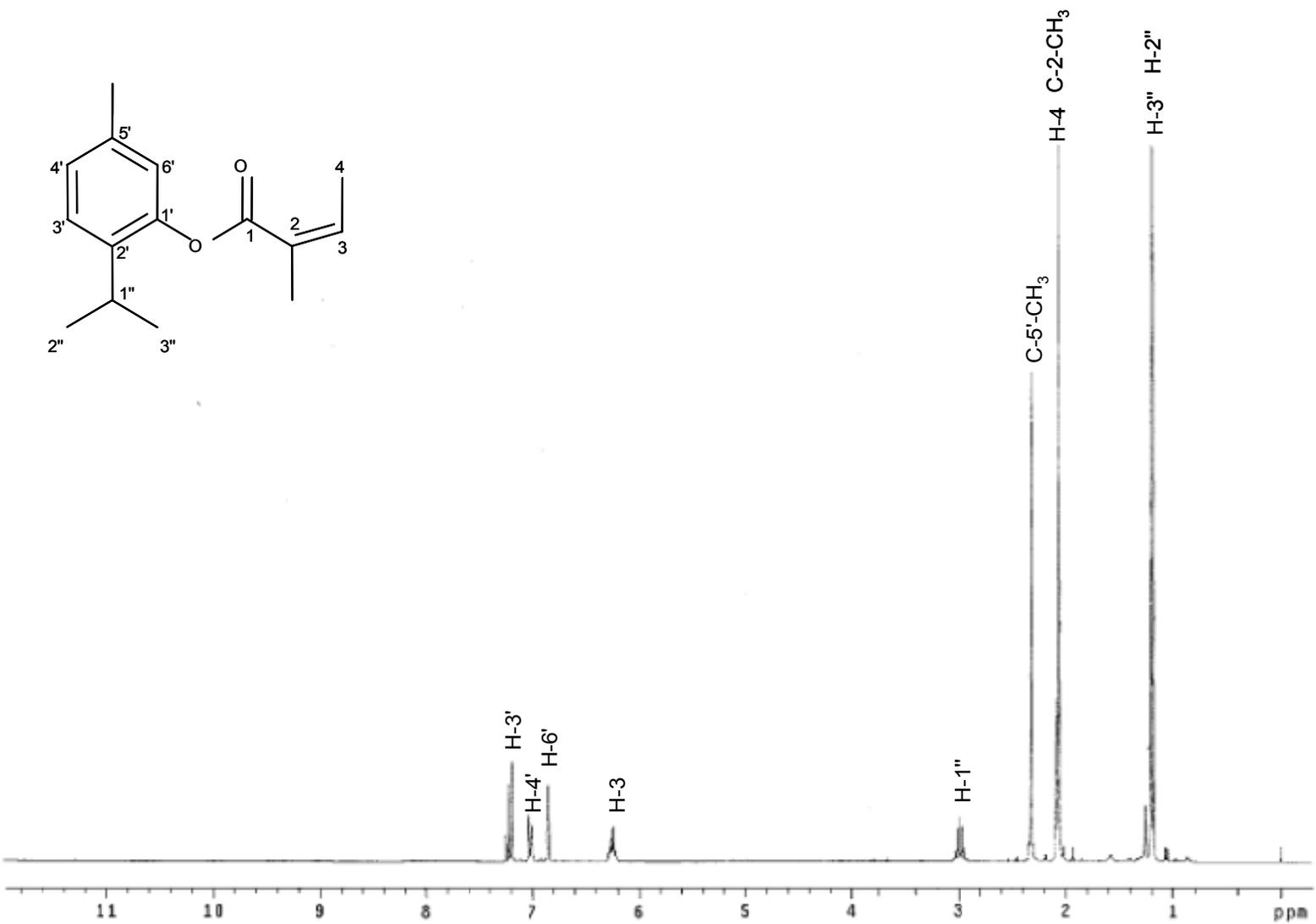
1. Andrade, S., Cardoso, L., Carvalho y Bastos, J. 2007. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J. Ethnopharmacol.* **109**. 464-471.
2. Arendt-Nielsen, L y Chen, A. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptors in humans. 2003. *Neurophysiol clin.* **33**. 259-268.
3. Bye, R. y Linares, E. 2006. Comunicación personal.
4. Canales, M., Hernández, T., Serrano, R., Hernández, L., Duran, A., Ríos, V., Sigrist, S., Hernández, H., García, A., Ángeles-López, O., Fernandez-Araiza, M. y Avila, G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* **110**. 343-347.
5. Cervero, F y Laird, J. 1999. Visceral pain. *The Lancet.* **353**. 2145-2148.
6. Eddy, D. y Leimbach, D. 1953. Synthetic analgesic.II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **107**. 385-393.
7. ElHabazi, K., Aboufatima, R., Benharref, A., Ziad, A., Chait, A. y Dalal, A. 2006. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **107**. 406-411.
8. El-Seedi, H., Ohara, T., Sata, N. y Nishiyama, S. 2002. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **81**. 293-296.

9. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2001. Secretaria de Salud. 1ª Edición. México, D.F.
10. Ferchichi, L., Merza, J., Landreau, A., Le Ray, A., Legseir, B., Seraphin, D. y Richomme, P. 2006. Occurrence of isocoumarinic and phenolic derivatives in *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. *Biochem. System. Ecol.* **34**. 829-832.
11. Haeseler, G., Maue, D., Grosskreutz, J., Bufler, J., Nentwing, B., Piepenbrock, S., Dengler, R. y Leuwer, M. 2002. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur J Anaesthesiol.* **19**. 571-579
12. Joseph-Nathan, P., Wesener, J. y Günther, H. 1984. A two-Dimensional NMR study of Angelic and Tiglic Acid. *Org. Mag. Res.* **22**, 190–191.
13. Koster, R., Anderson, M. y De Beer, E. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* **18**. 412.
14. Kwon, H. y Lee, K. 2001. An acetylene and monoterpene glycoside from *Adenocaulon himalaicum*. *Planta Med.* **67**. 482-484.
15. Lorke, D. 1983. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch. Toxicol.* **54**. 275-287.
16. Merfort, I. 2002. Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatogr.* **967**. 115-130.
17. Millan, M. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* **57**. 1-169.

18. Mizoguchi, H., Narita, M., Wu, H., Narita, T., Suzuki, H., Nagase y Tseng, L. 2000. Differential involvement of μ_1 -opioid in endomorphin and β endorphin induced G-protein activation in the mouse pons/medulla. *Neuroscience*. **100**. 835-839.
19. Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaria de Salud. México.
20. Ojewole, J. 2005. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *J Ethnopharmacol*. **99**. 13-19.
21. Owoyele, V., Oloriegbe, Y., Balogun, E. y Soladoye, A. 2005. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Nelsonia canescens* leaf extract. *J Ethnopharmacol*. **99**. 153-156.
22. Pérez-Vásquez, A., Linares, E., Bye., Cerda-García-Rojas, C. y Mata, R. 2007. **IN PRESS**. Phytotoxic activity and conformational analysis of thymol analogs from *Hoffmeisteria schaffneri*. *J. Nat. Prod.*
23. Pérez-Vasquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R. y Mata, R. 2005. Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and Síntesis of 2'-(2''-Hydroxy-4''-methylphenyl)-2'-oxoethyl Acetate. *J. Nat. Prod.* **68**. 959-962.
24. Proksch, P. y Rodriguez, E. 1983. Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and Biological Significance. *Phytochemistry*. **22**. 2335-2348.

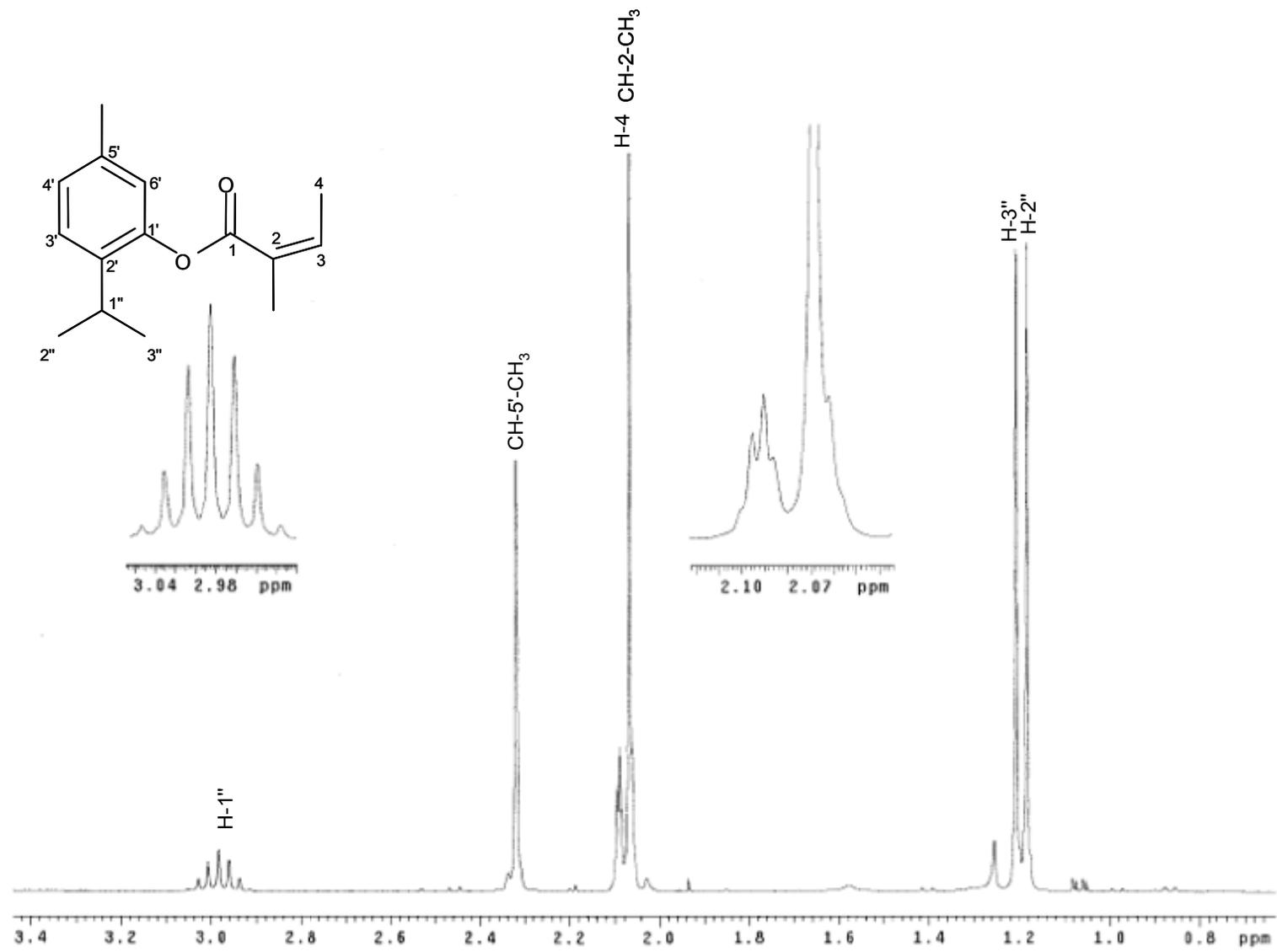
-
25. Quan-Xiang, W., Yan-Ping S. y Zhong-Jian, J. 2006. [Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family](#). *Nat. Prod. Rep.* **23**. 699 – 734.
26. Rates, S. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon*. **39**. 603-613.
27. Tallarida, R. y Leonard, S. 1979. The dose-response relation in pharmacology. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 1-48
28. Tori, M., Ohara, Y., Nakashima, K. y Sono, M. 2001. Thymol Derivatives from *Eupatorium fortunei*. *J. Nat. Prod.* **64**. 1048-1051.
29. Weathers, P., Elkholy, S. y Wobbe, K. 2006. Artemisinin: the biosynthetic pathway and its regulation in *Artemisia annua*, a terpenoid-rich species. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Plant.* **42**. 309-317.
30. Williamson, E., Okpako, D. y Evans, F. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Wiley. Inglaterra. Capítulo 8. Anti-inflammatory and Analgesic Activity. 142-147.
31. Wolf, C. y Salter, M. 2000. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science*. **288**. 1765-1768.
32. Woolfe, G. y MacDonald, A. 1944. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *J Pharmacol Exp Ther.* **80**. 300-307.
33. World Health Organization-Traditional Medicine. 1998. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. WHO, Geneva, Switzerland. 1-5.
34. Yaksh, T. 1997. Biologic foundations; an introductory perspective on the study of nociception and its modulation. *Anaesthesia*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia USA, 471-482.

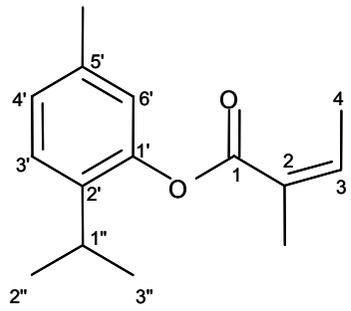
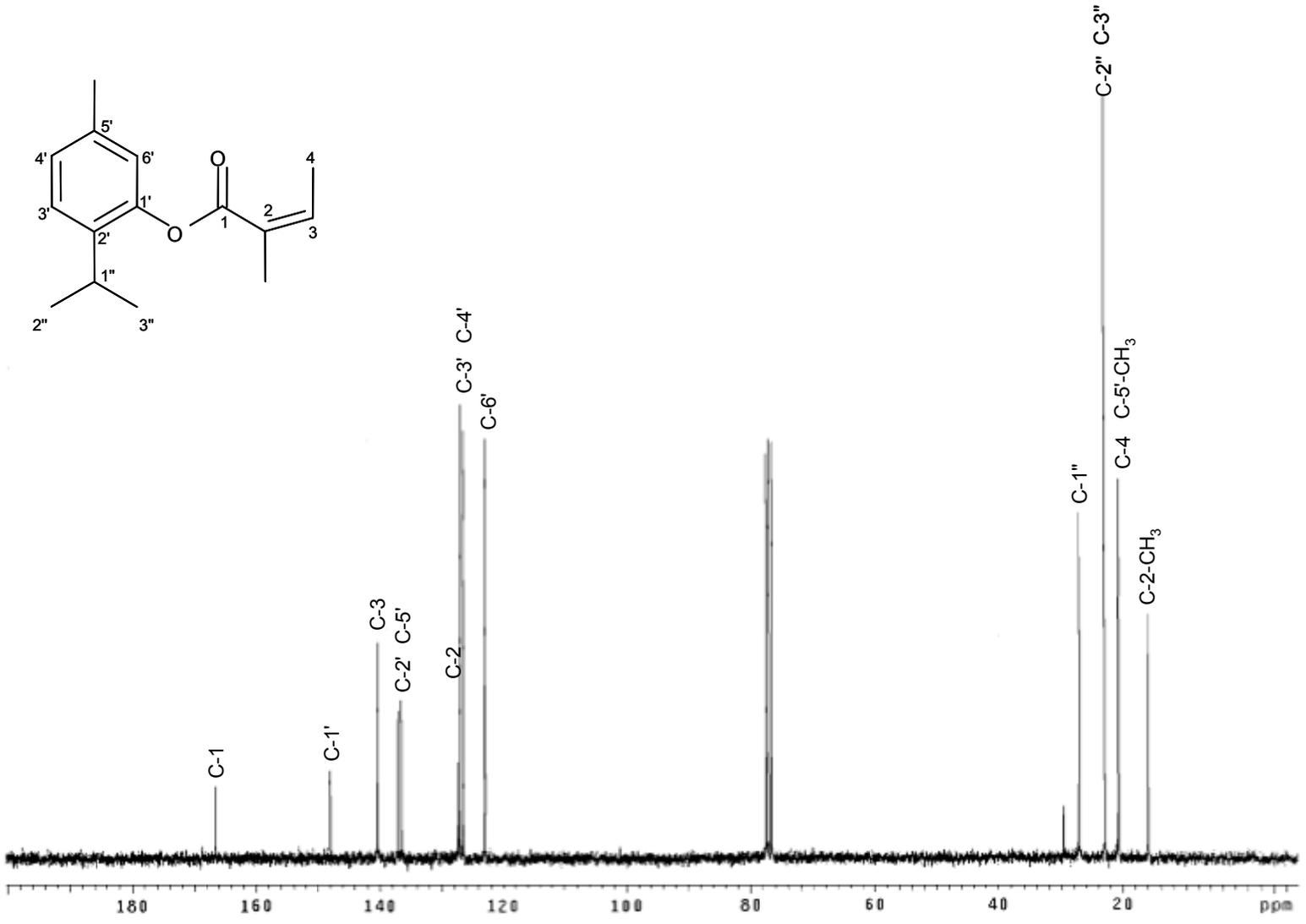
X. ANEXO



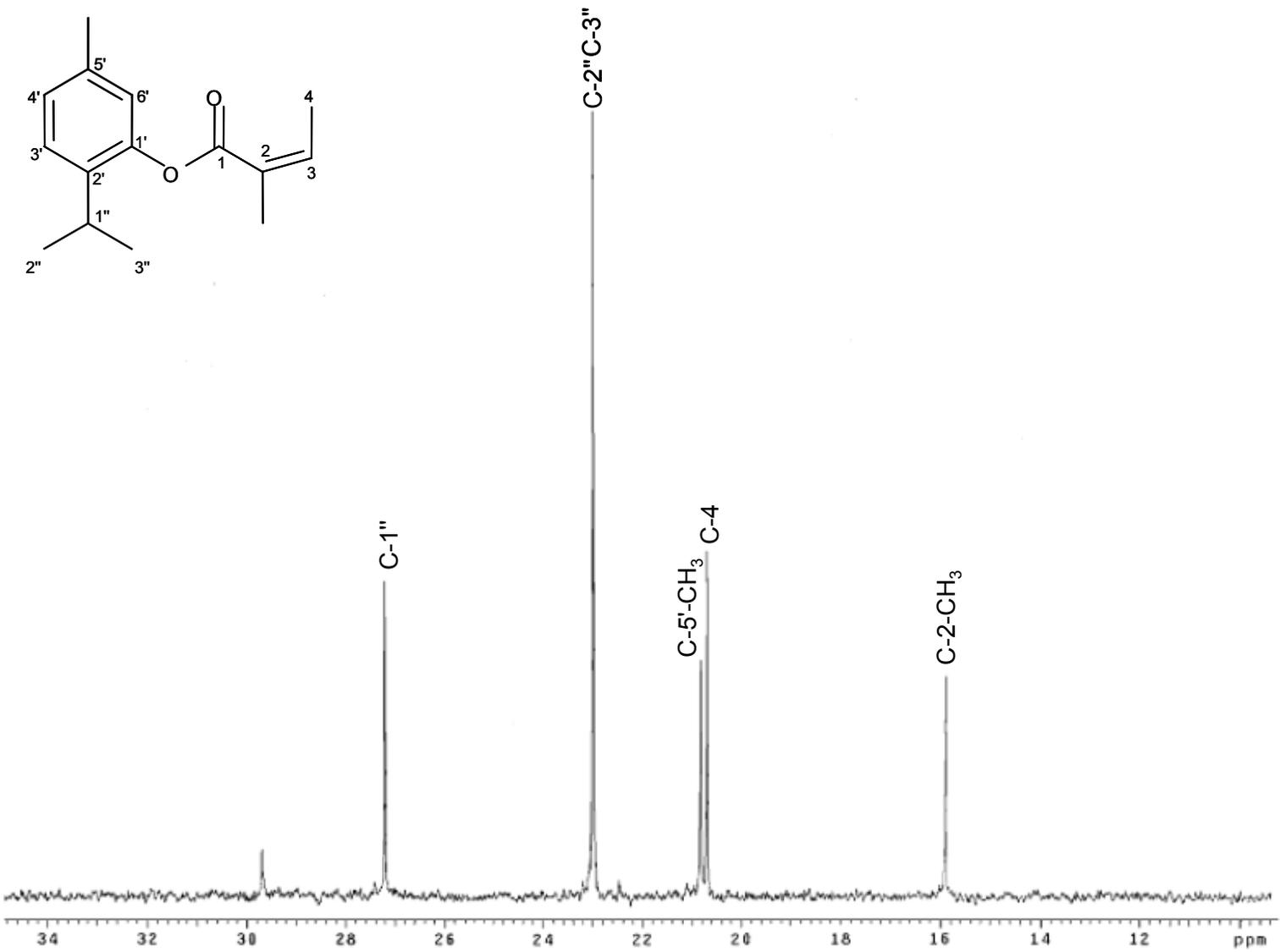
Espectro 1. RMN- ^1H del compuesto **11** (CDCl_3) 300MHz.

Espectro 2. RMN-¹H del compuesto **11** (CDCl₃) 300MHz.

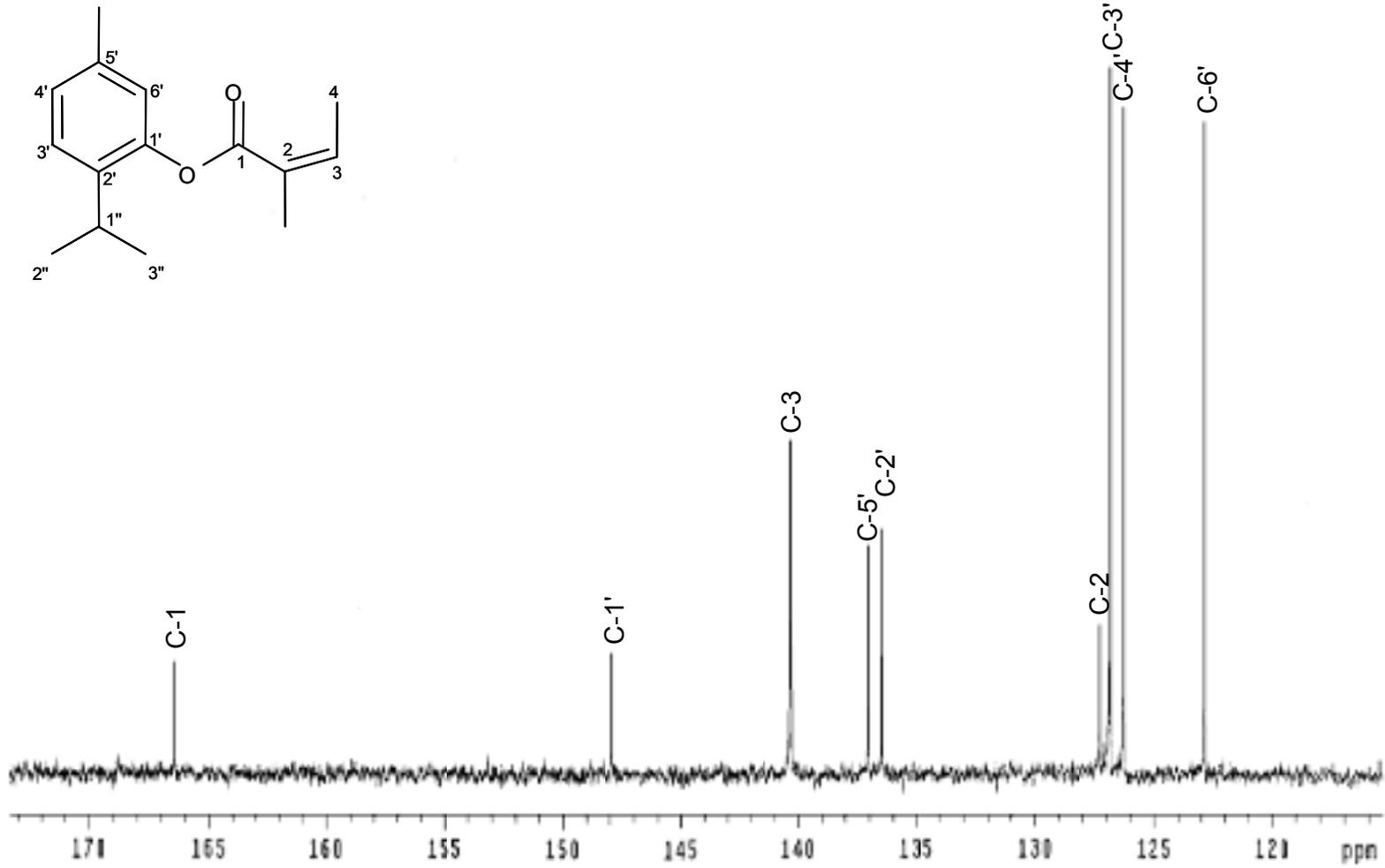
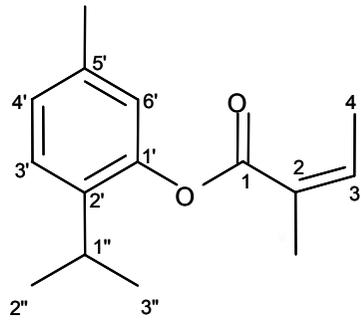




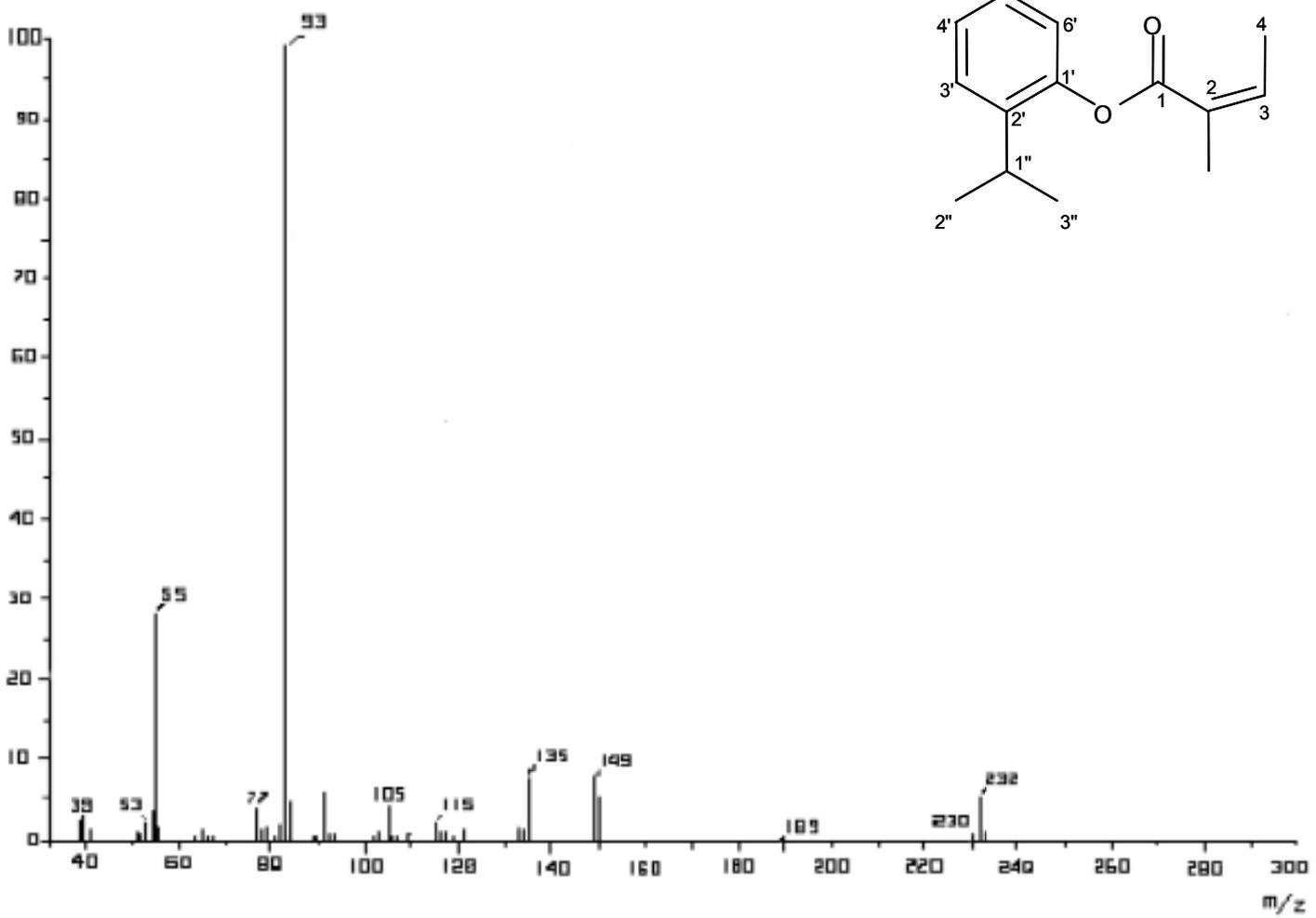
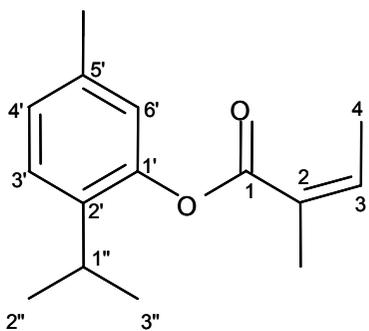
Espectro 3. RMN-¹³C del compuesto **11** (CDCl₃) 75.5MHz.

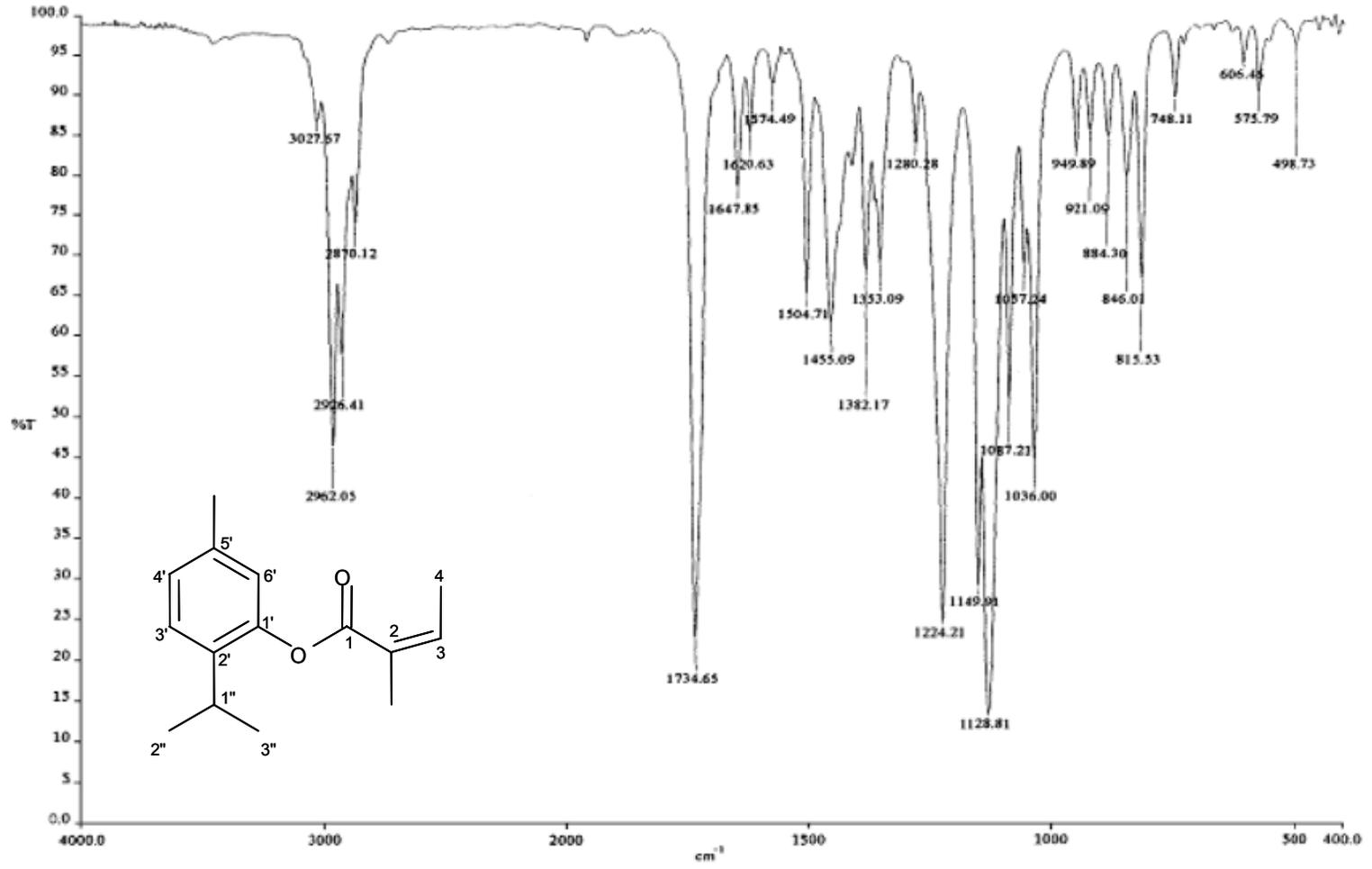


Espectro 4. RMN- ^{13}C del compuesto **11** (CDCl_3) 75.5MHz.



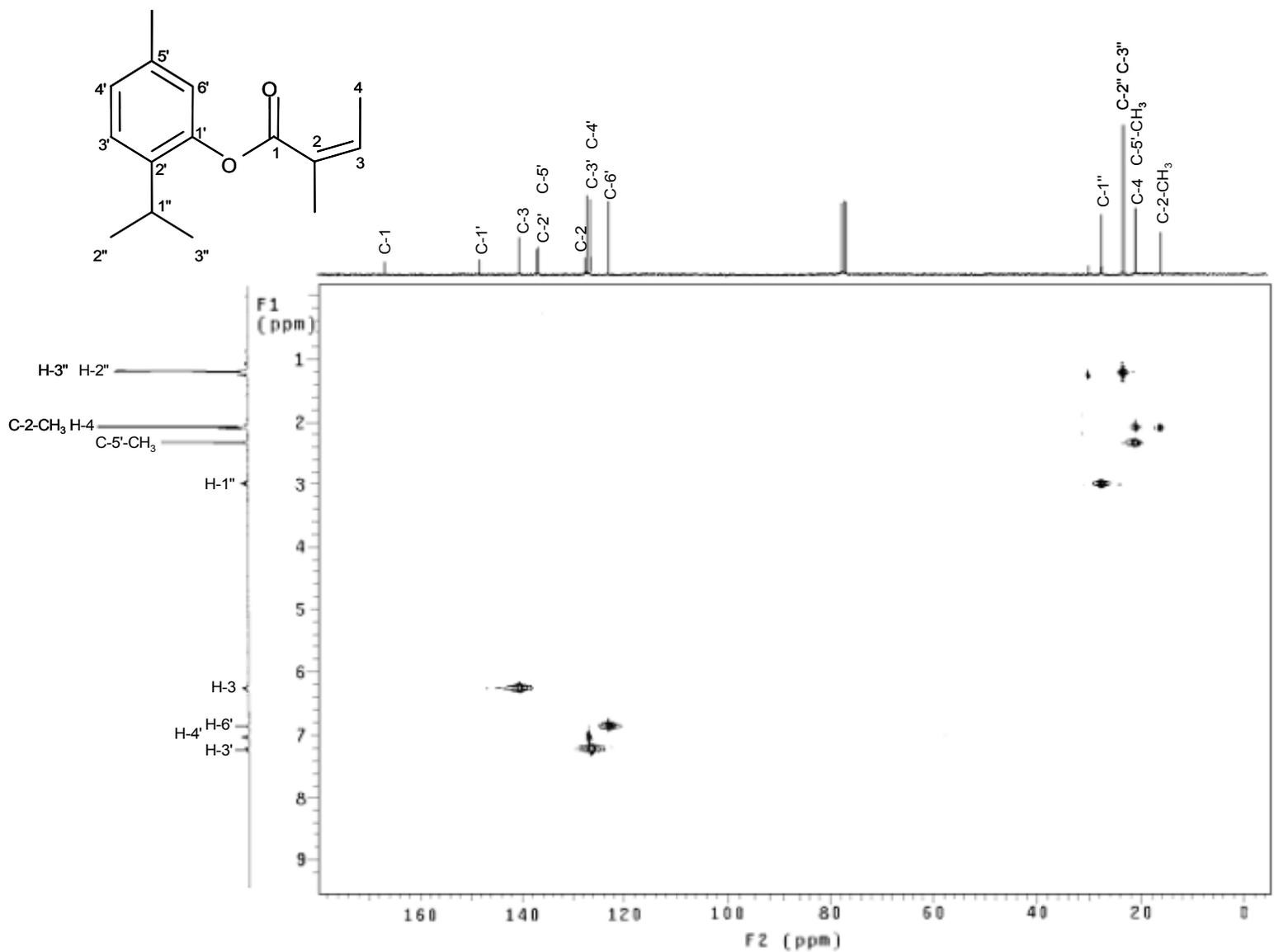
Espectro 5. RMN-¹³C del compuesto **11** (CDCl₃) 75.5MHz.



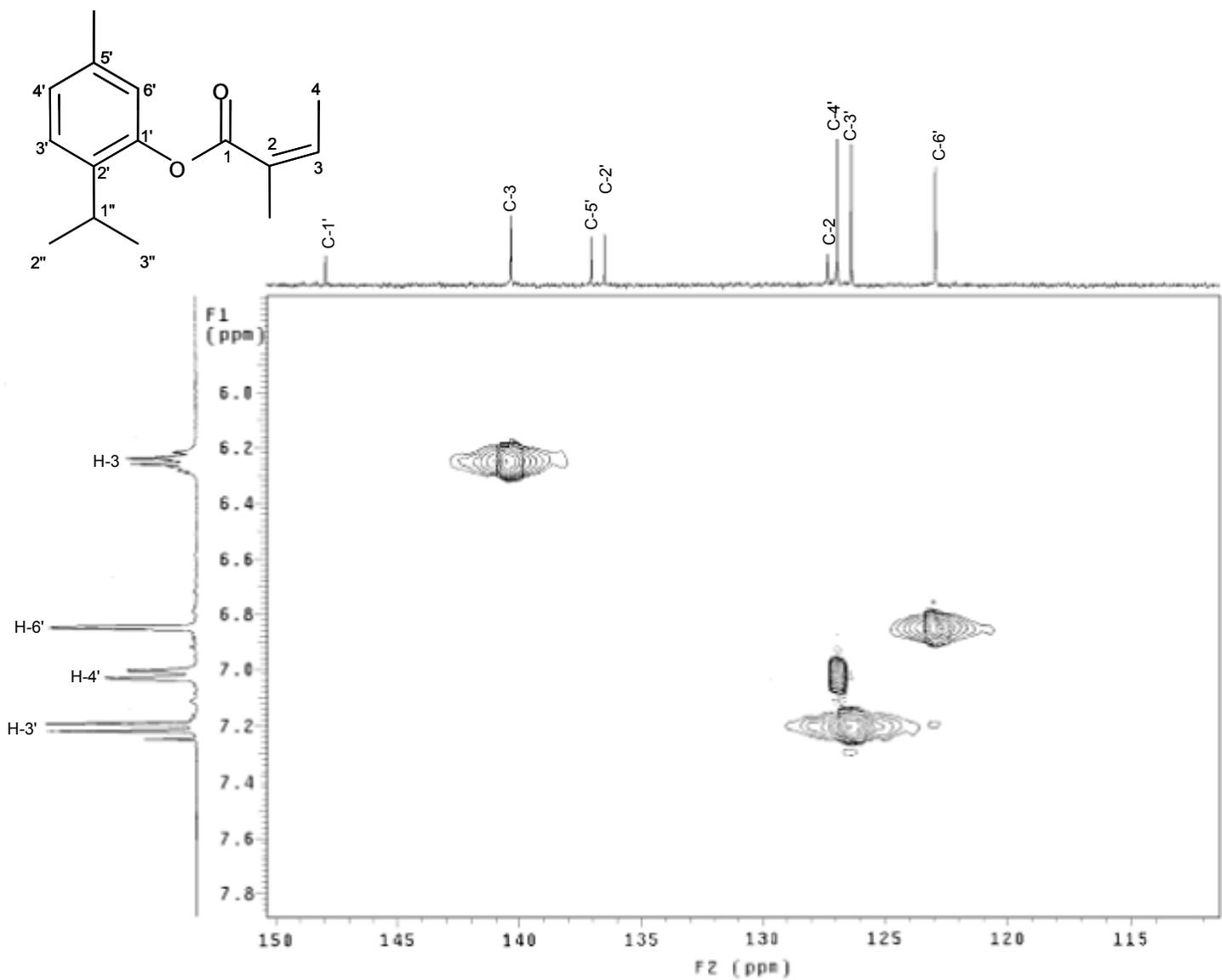


Espectro 6. Espectroscopia de masa modalidad IE del compuesto 11.

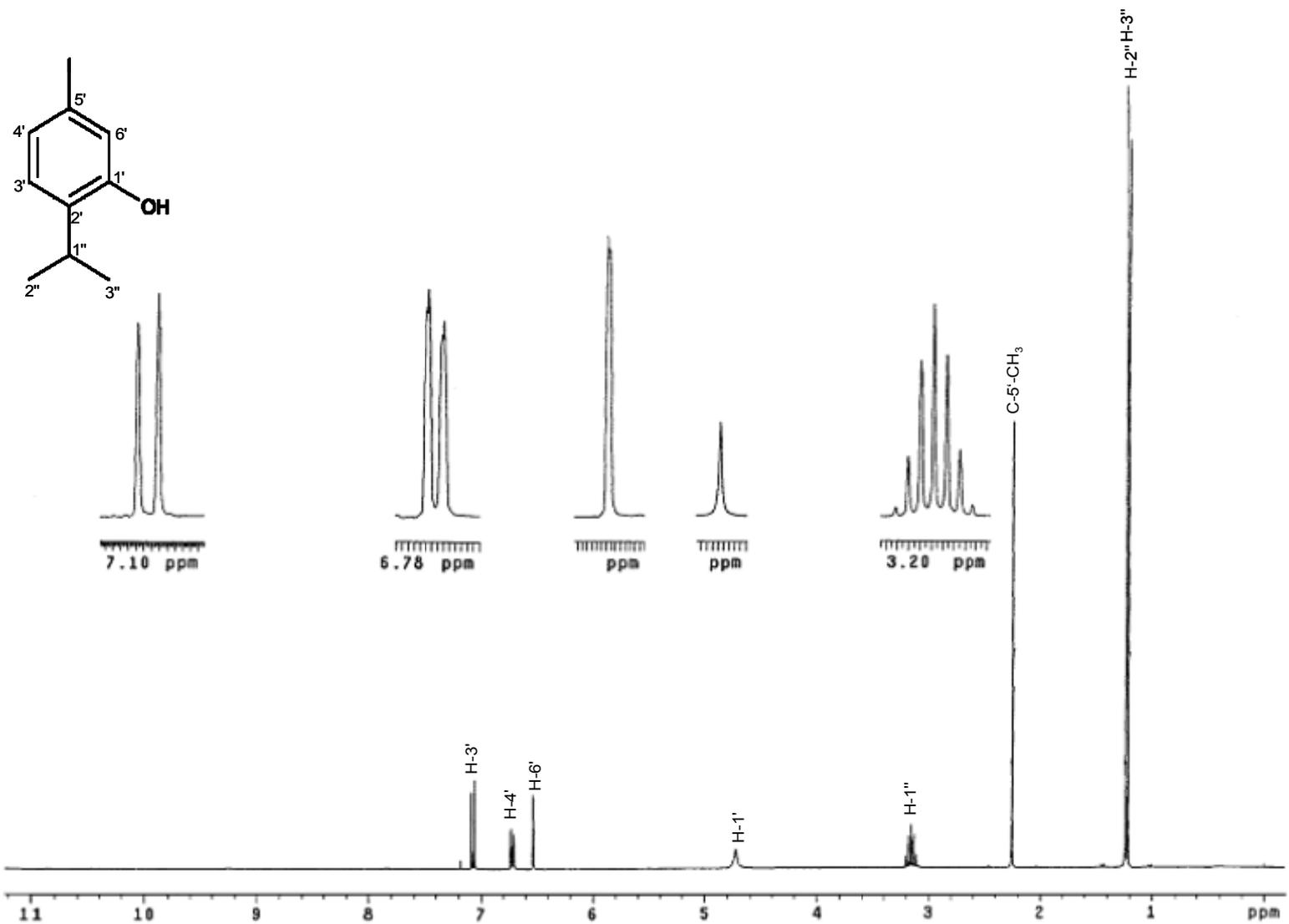
Espectro 7. IR del compuesto 11.



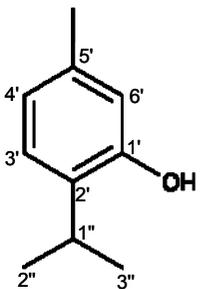
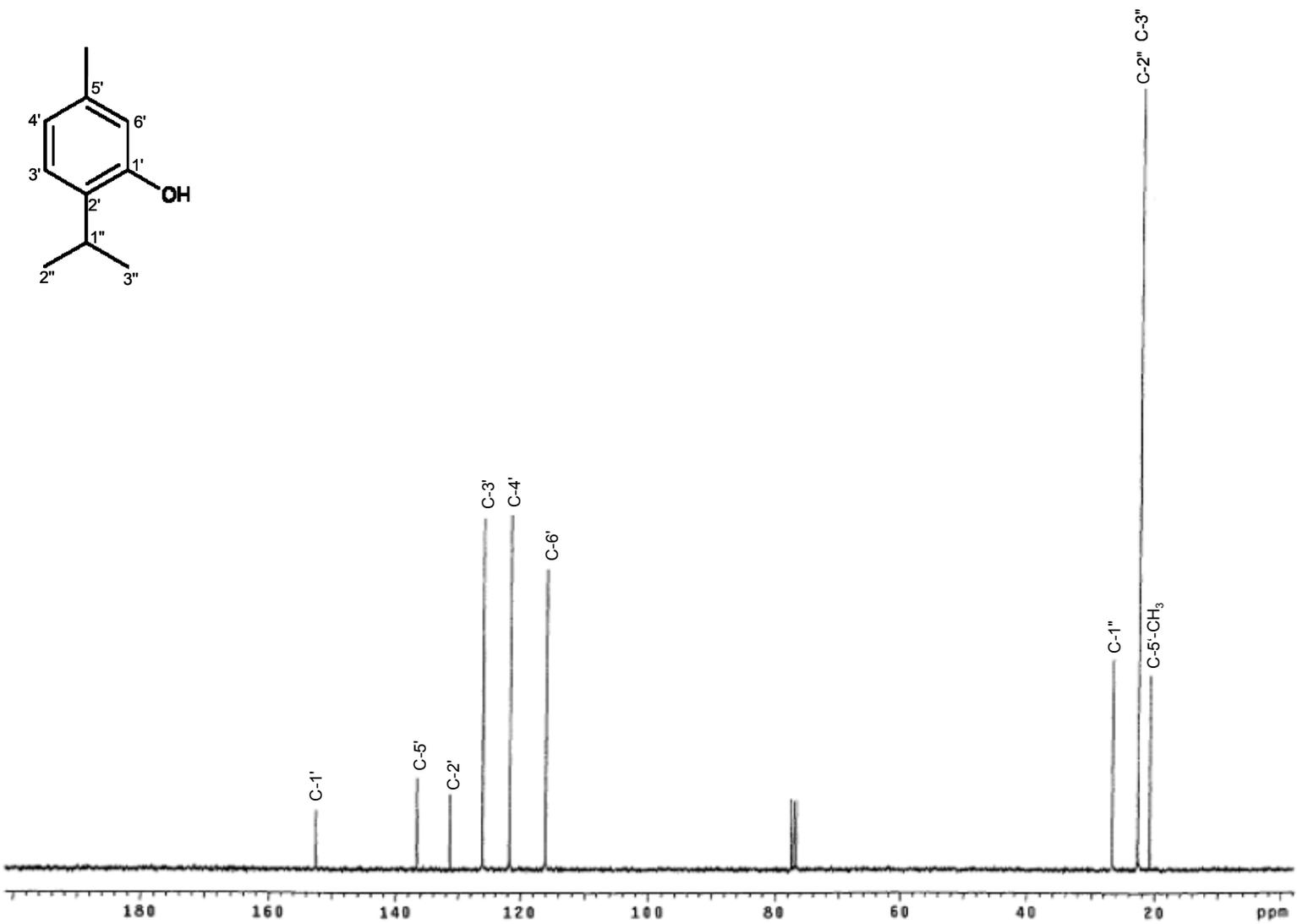
Espectro 8. Helcor del compuesto **11** (CDCl₃) 75.5MHz.



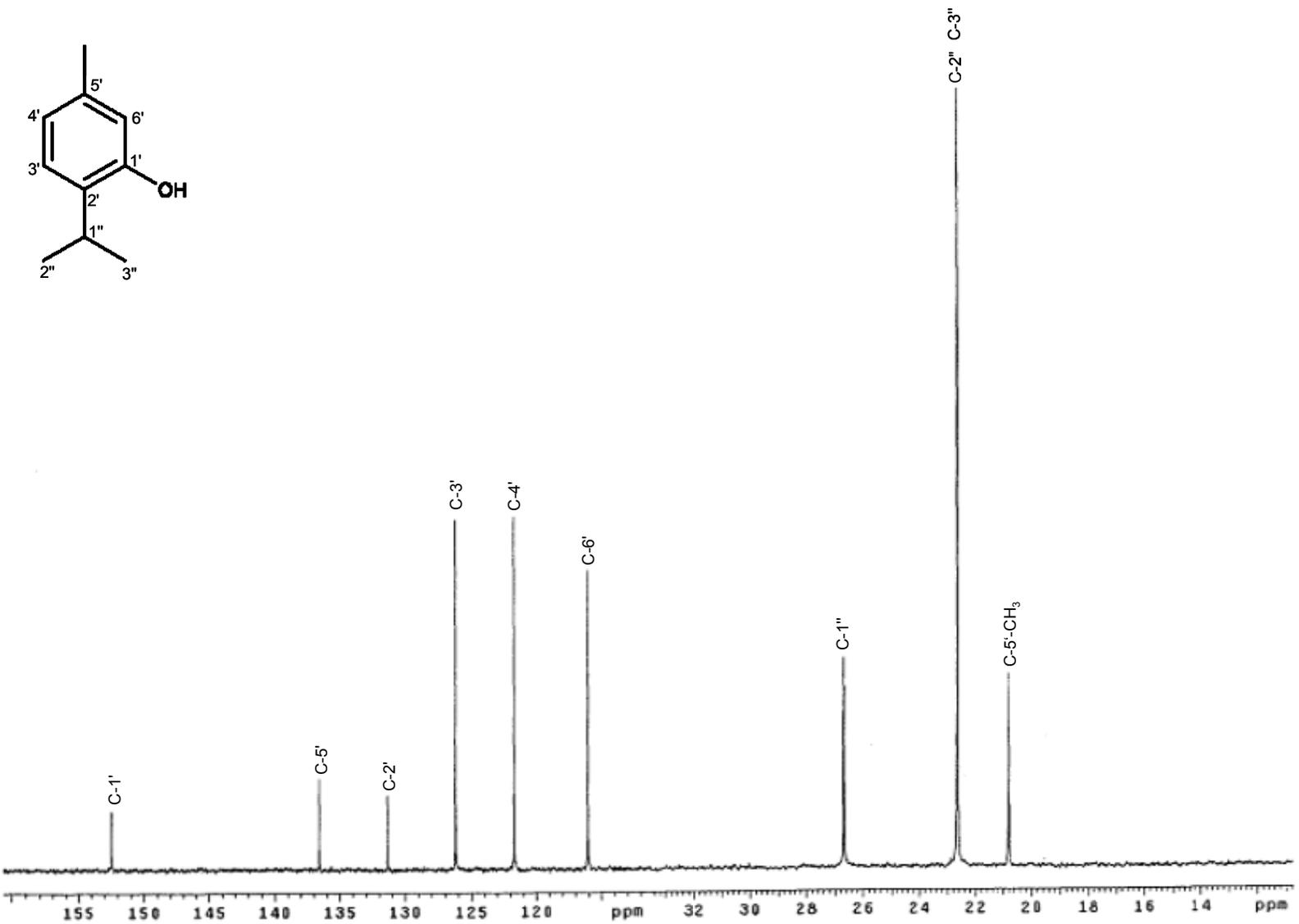
Espectro 9. Helcor del compuesto **11** (CDCl₃) 75.5MHz.



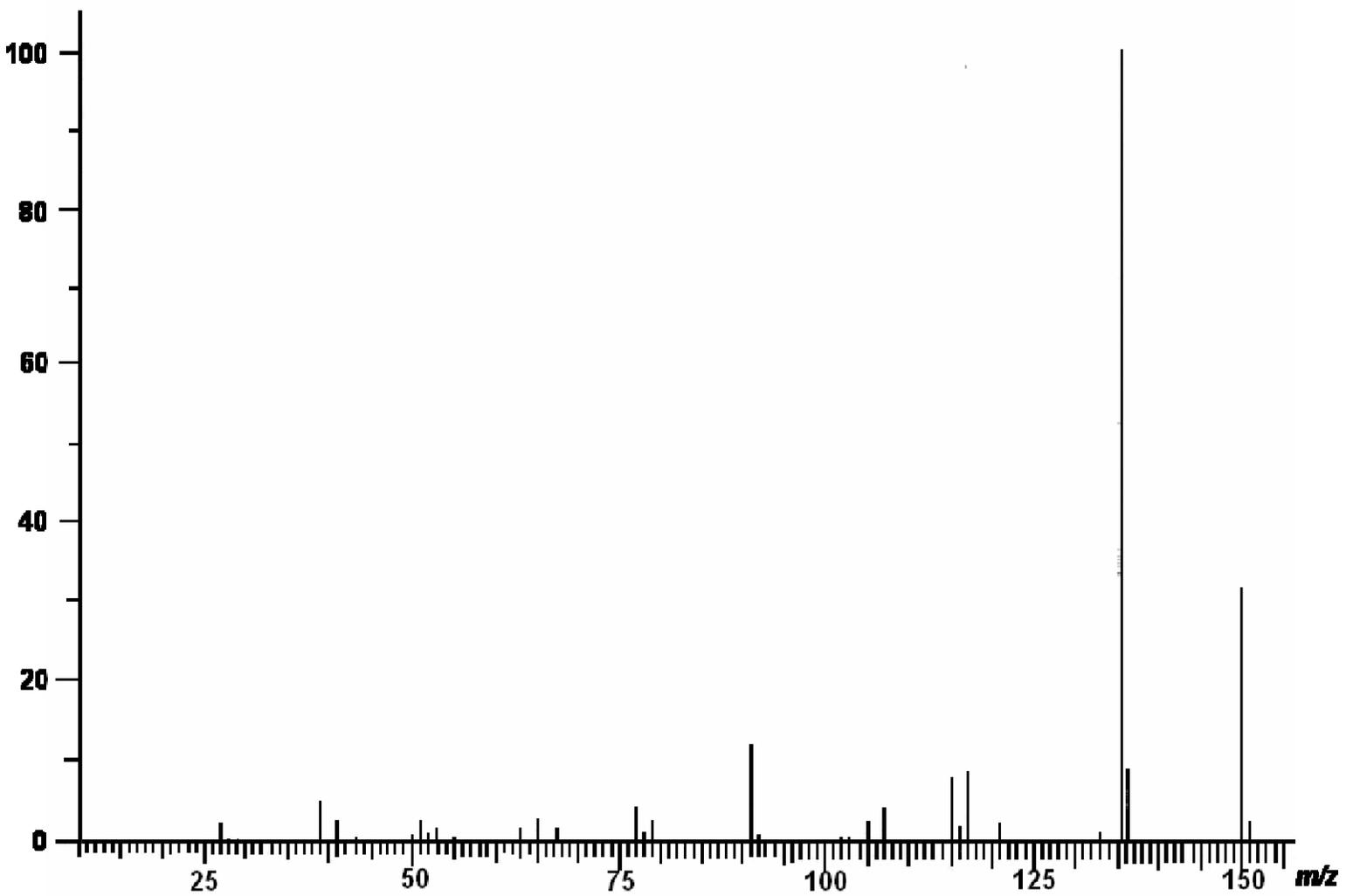
Espectro 10. RMN-¹H del compuesto 10 (CDCl₃) 300MHz.

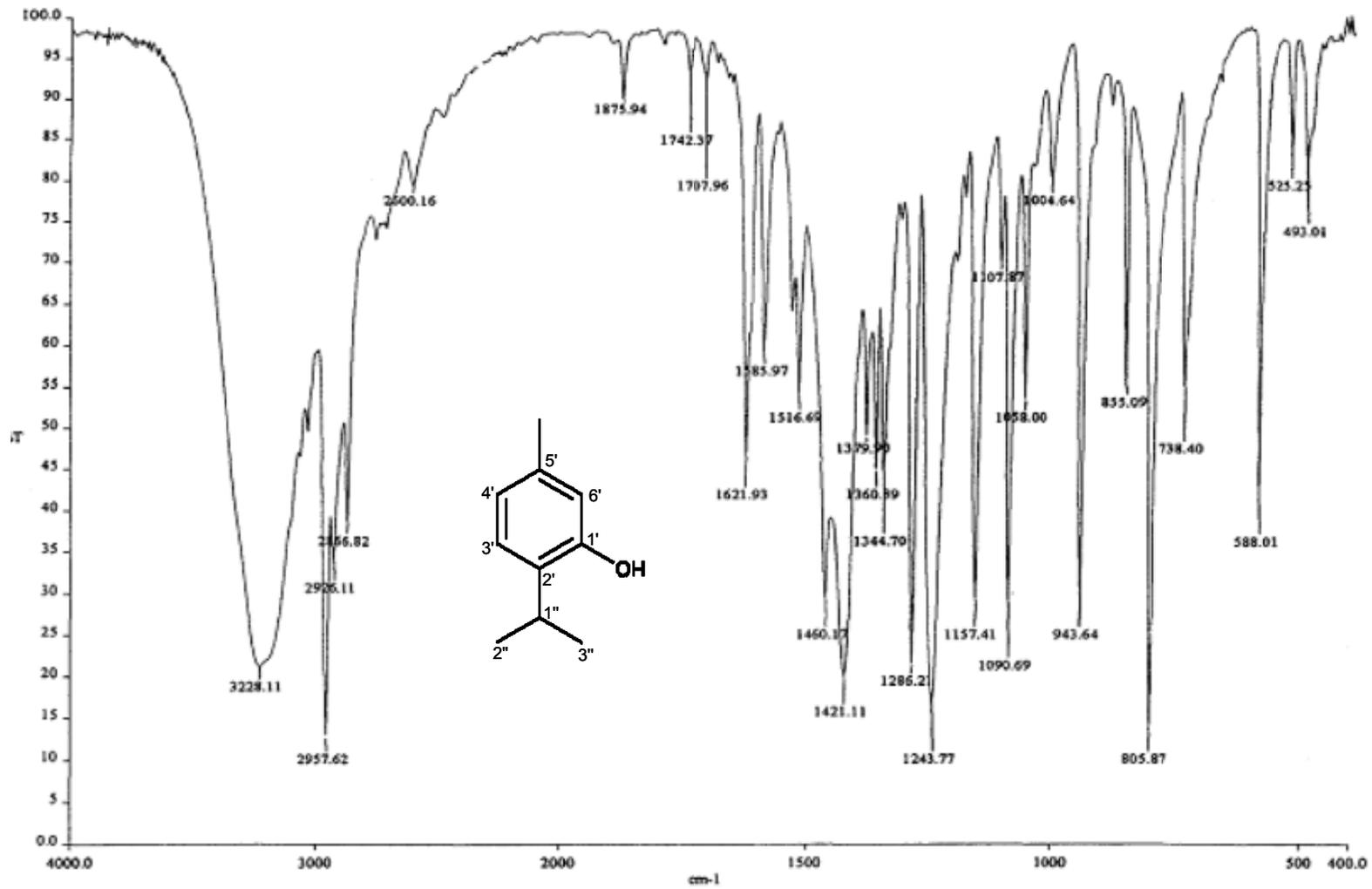


Espectro 11. RMN-¹³C del compuesto 10 (CDCl₃) 75.5MHz.

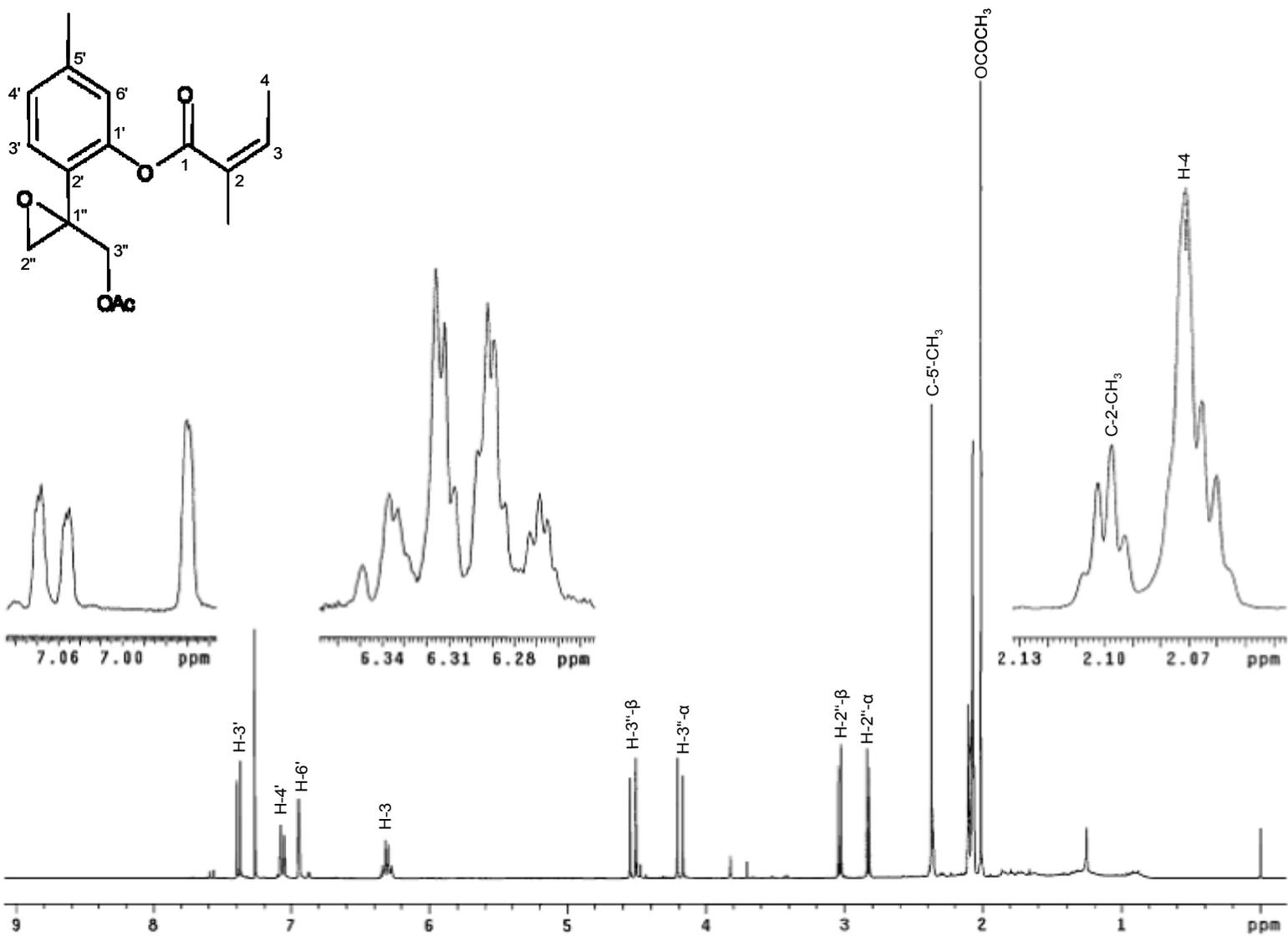


Espectro 12. RMN-¹³C del compuesto 10 (CDCl₃) 75.5MHz.



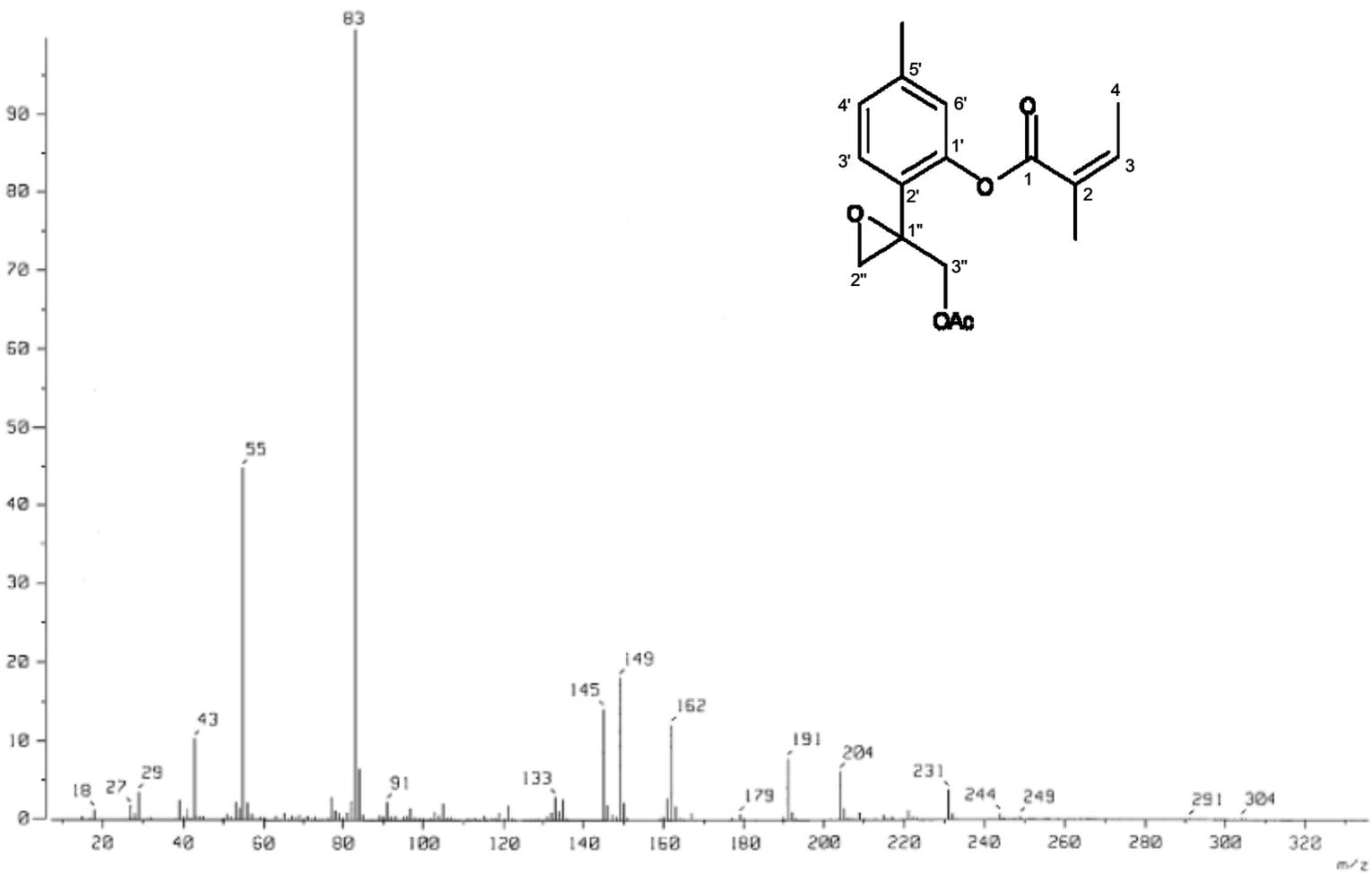
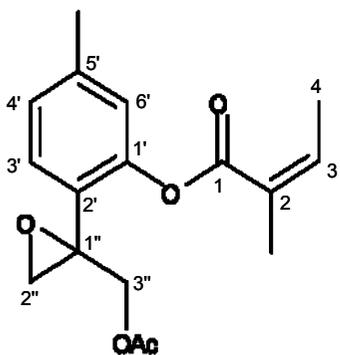


Espectro 13. Espectroscopia de masa modalidad IE del compuesto 10.

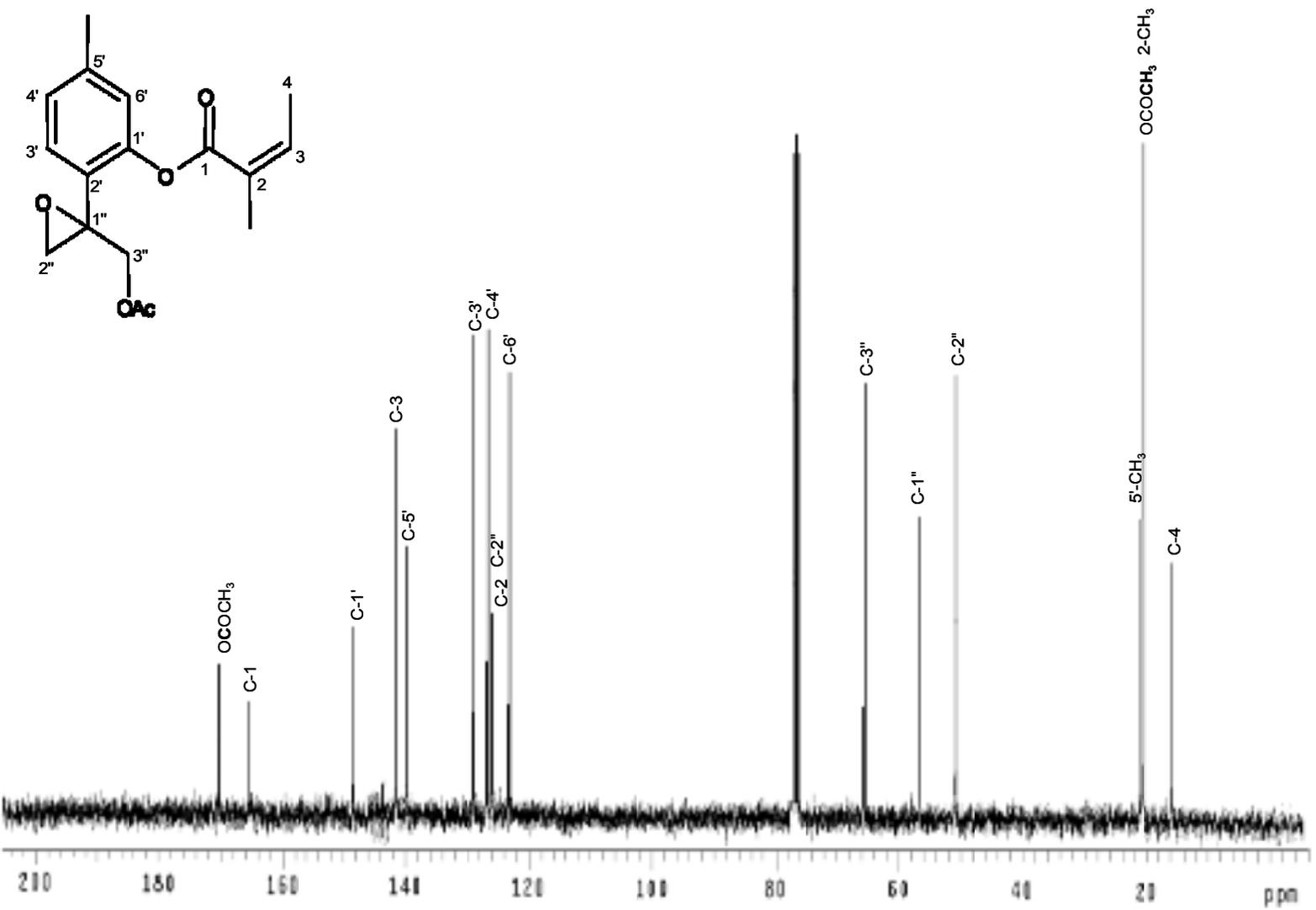


Espectro 14. IR del compuesto 10

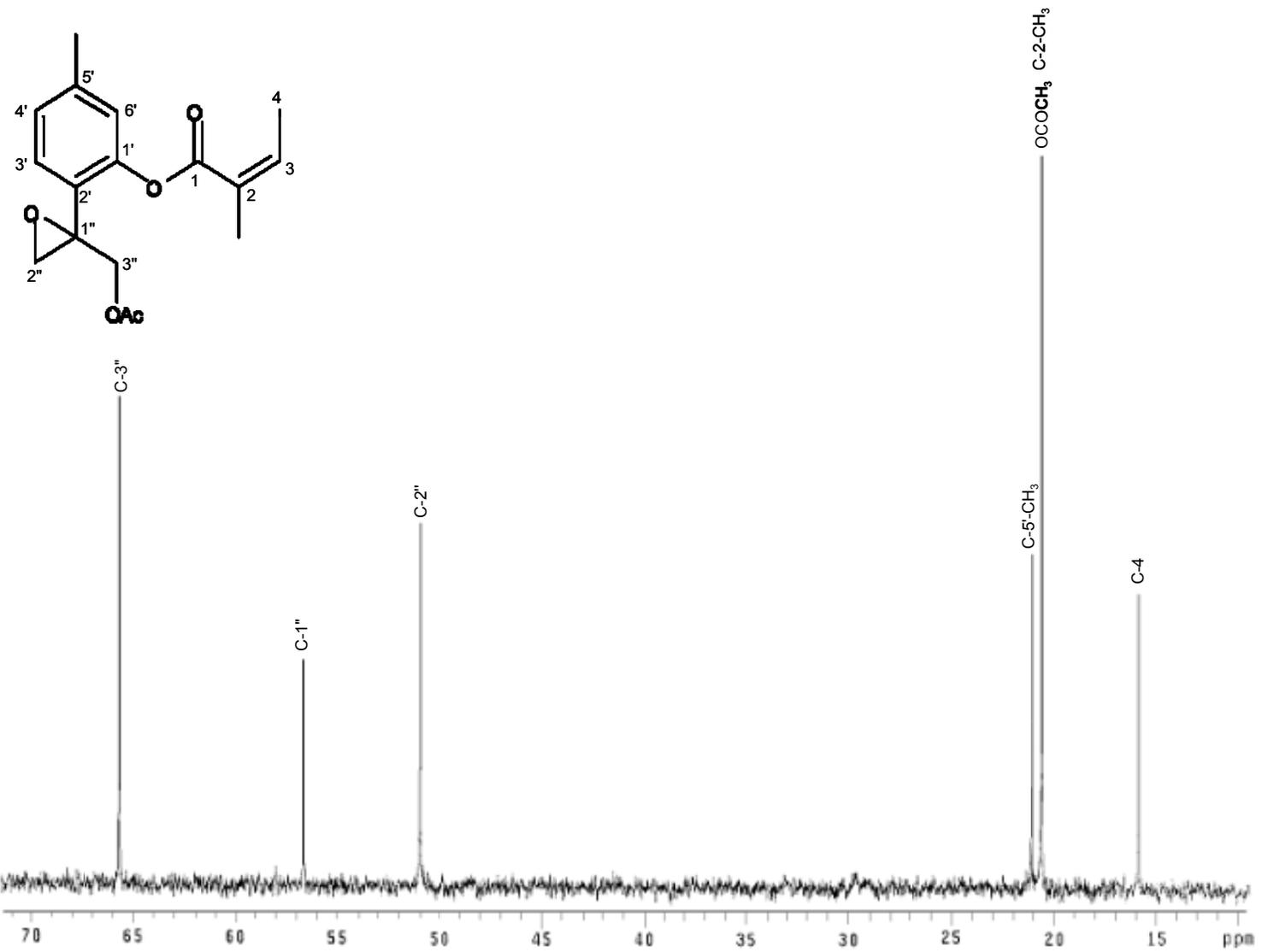
Espectro 15. RMN-¹H del compuesto **7** (CDCl₃) 300MHz



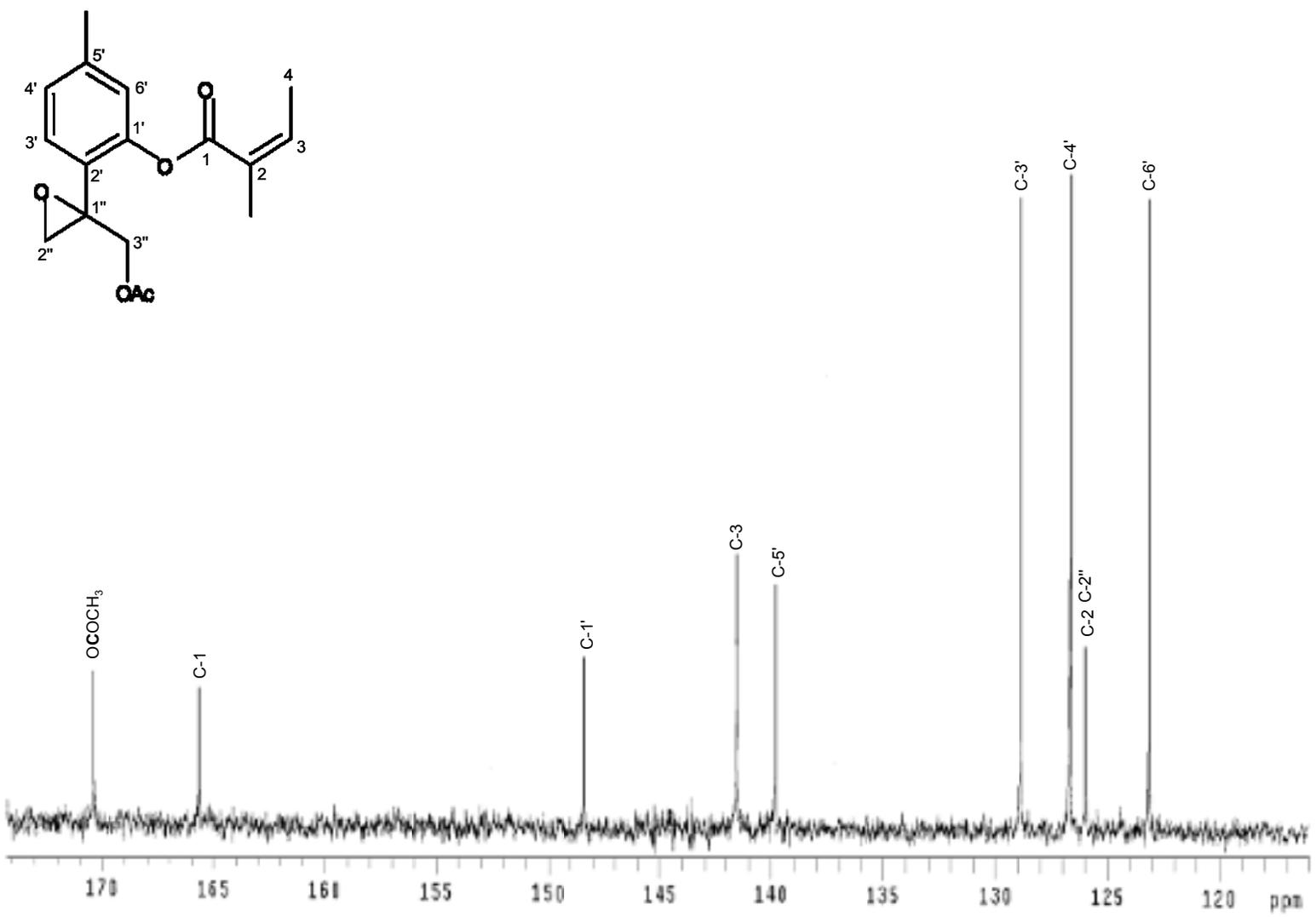
Espectro 16. Espectroscopia de masas modalidad IE del compuesto 7



Espectro 17. RMN-¹³C del compuesto 7 (CDCl₃) 75.5MHz

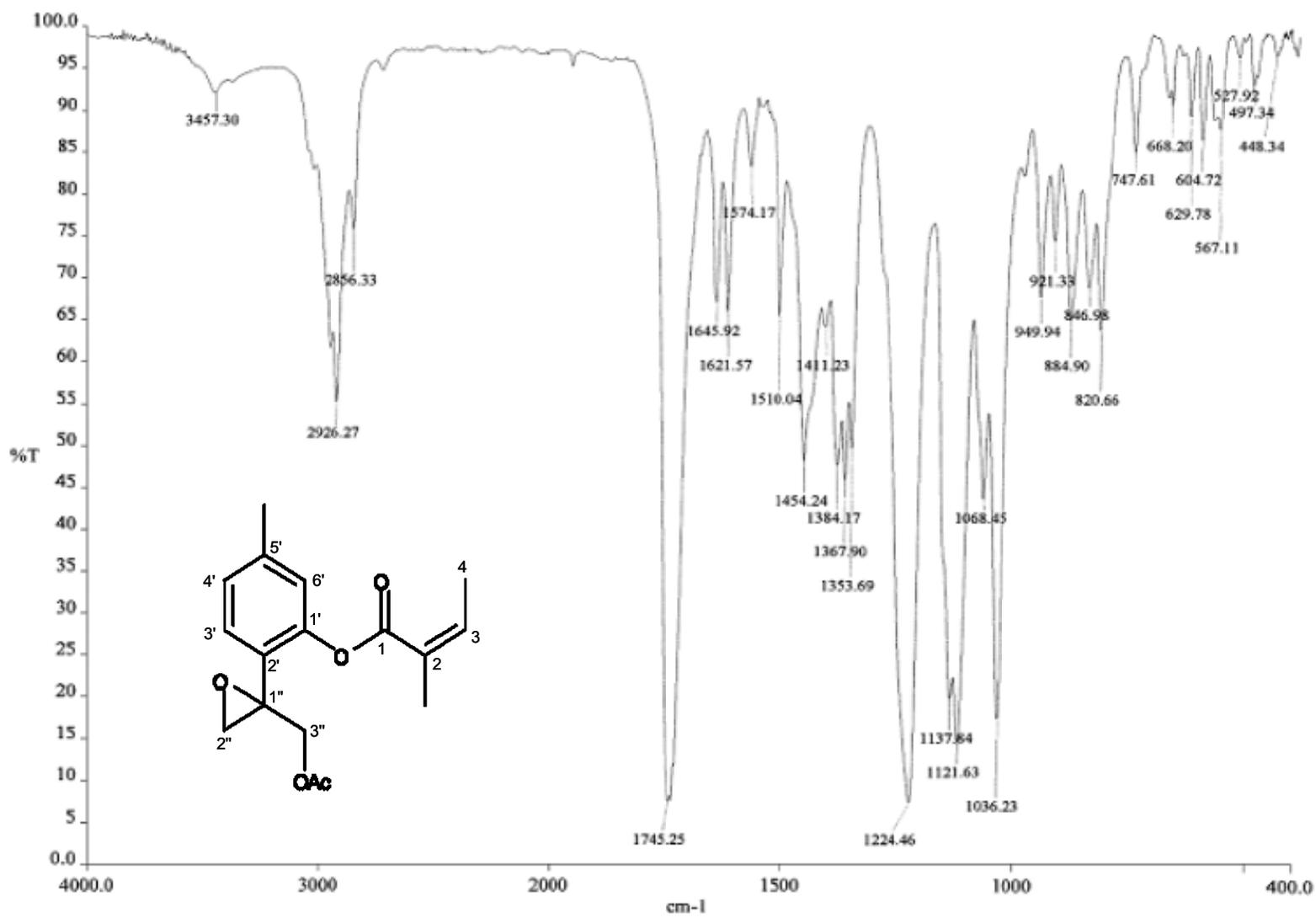


Espectro 18. RMN-¹³C del compuesto 7 (CDCl₃) 75.5MHz

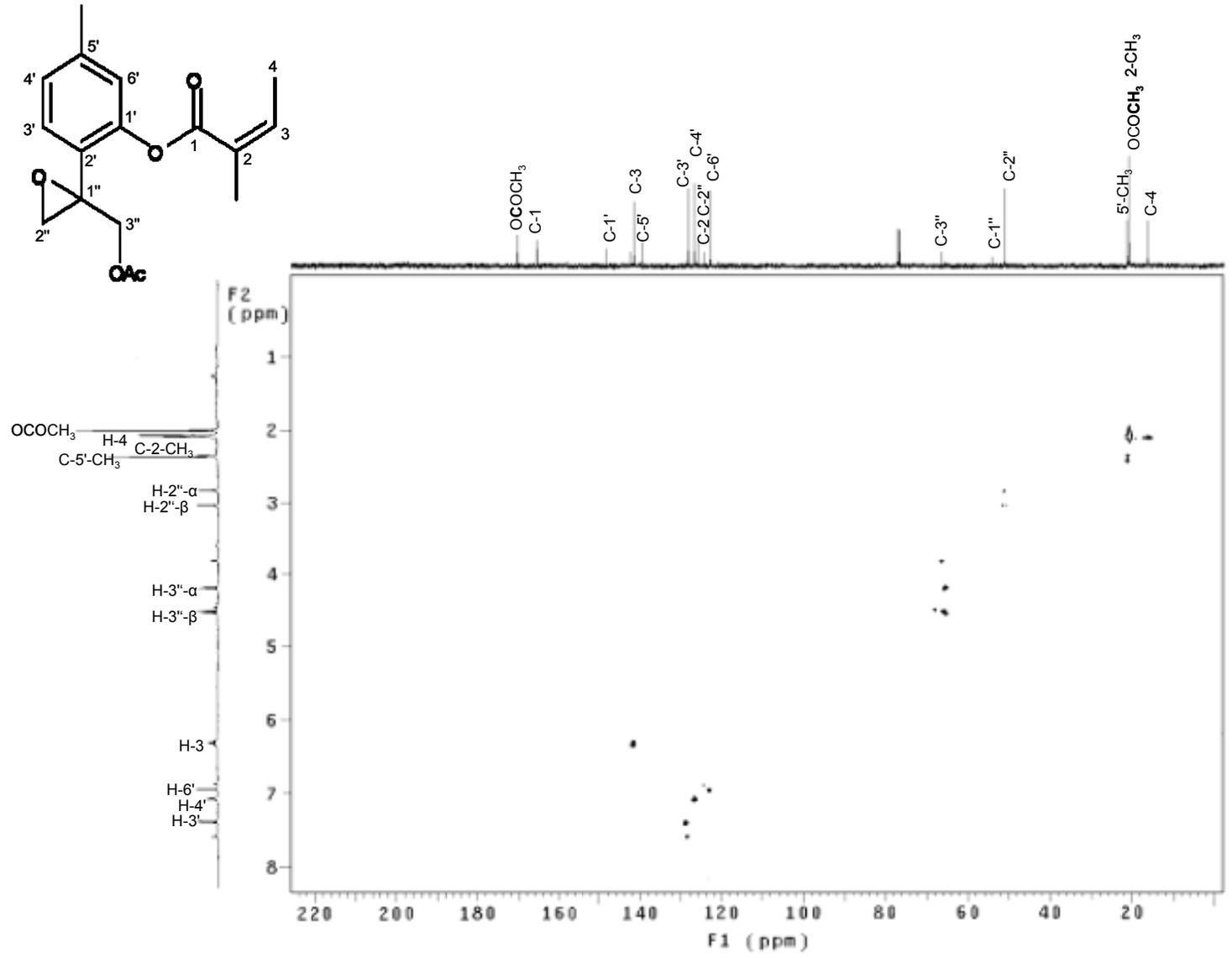


Espectro 19. RMN- ¹³C del compuesto **7** (CDCl₃) 75.5MHz

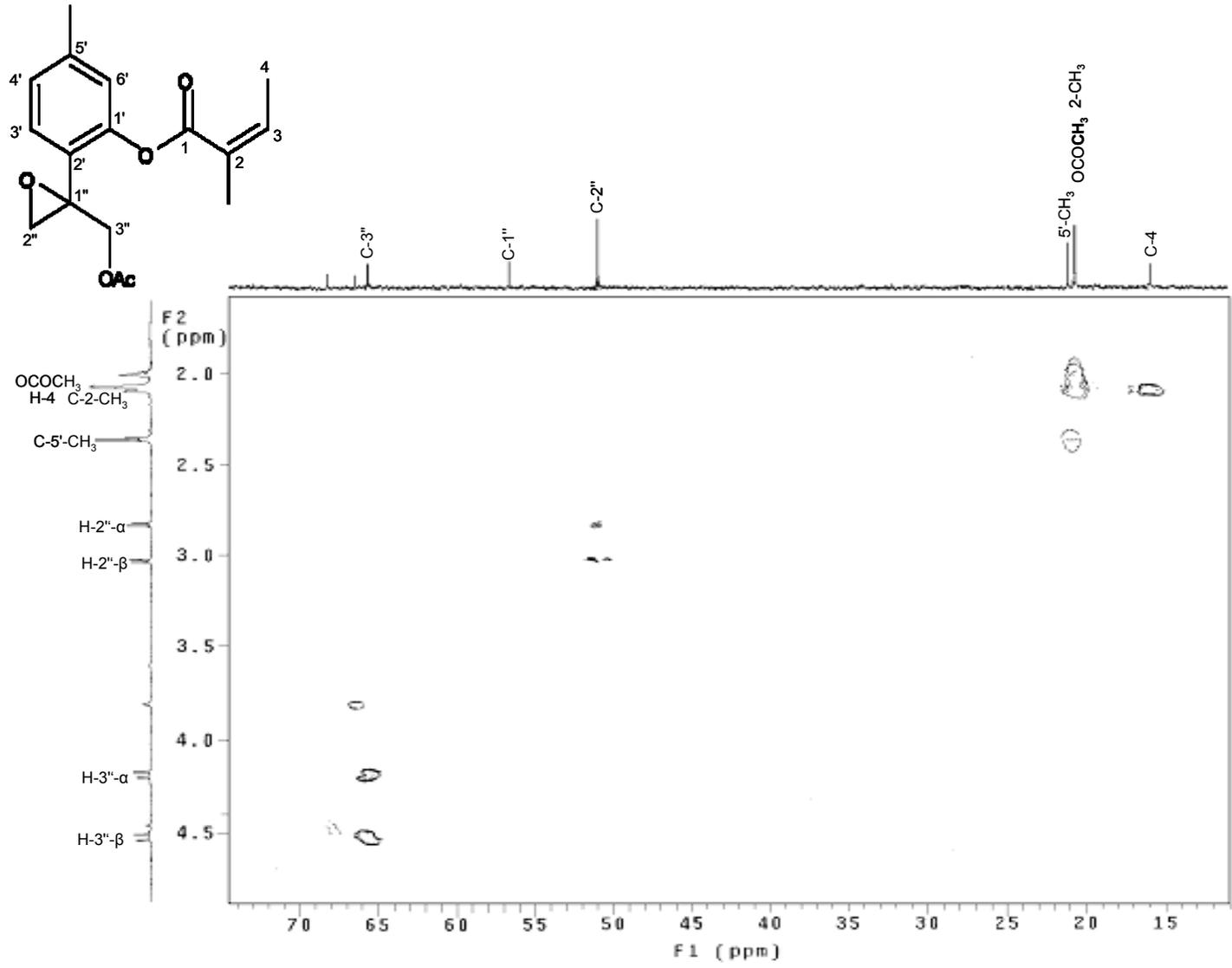
Espectro 20. IR del compuesto 7

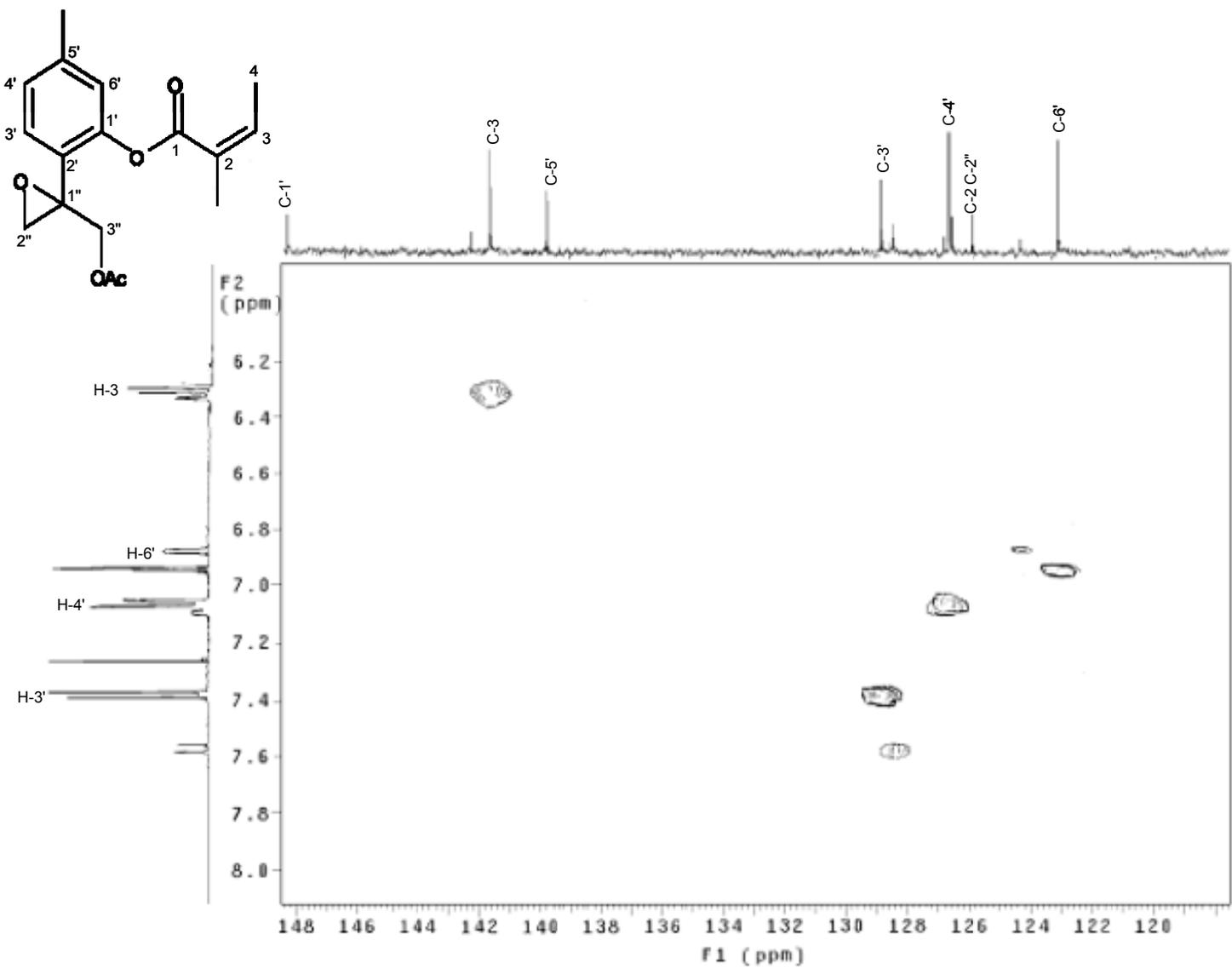


Espectro 21. HSQC del compuesto 7 (CDCl₃) 400MHz



Espectro 22. HSQC del compuesto **7** (CDCl₃) 400MHz





Espectro 23. HSQC del compuesto **7** (CDCl₃) 400MHz