



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

“Pruebas selectas de identidad, eficacia y composición de *Brickellia
cavanillesii* (Cass) A. Gray y *B. veronicifolia* (Kunth) A. Gray
(Asteraceae)”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C Juan Francisco Palacios Espinosa



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

AÑO: 2009



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. Ricardo Reyes Chilpa
SECRETARIO	Dr. Andrés Navarrete Castro
PRIMER SUPLENTE	Dra. María Luisa Villarreal Ortega
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

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 Dr. Robert Bye por la recolección e identificación del material vegetal de *Brickellia cavanillesii* 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 comité tutorial, la Dra. Myrna Déciga Campos y el Dr. Leovigildo Quijano, por su valiosa contribución para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del jurado por sus 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.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su asesoría y apoyo técnico brindado para los ensayos de gastroprotección

A la Dra. 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.

INDICE

Lista de Cuadros	i
Lista de Figuras	i
Resumen	v
Abstract	viii

I. INTRODUCCIÓN..... 1

II. ANTECEDENTES

2.1. Regulación de los productos herbolarios en Europa y los Estados Unidos: un ejemplo a seguir.....	5
2.1.1. Comunidad Europea.....	5
2.1.2. Estados Unidos de América.....	9
2.2. Antecedentes de las especies <i>Brickellia veronicifolia</i> y <i>B. cavanillesii</i>	15
2.2.1. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.....	15
2.2.2. Estudios químicos y farmacológicos.....	19
2.3. El sistema gastrointestinal y sus principales padecimientos.....	25
2.3.1. Generalidades de la dispepsia y su tratamiento con productos naturales.	28
2.3.2. Gastritis, mecanismos de protección gástrica y su relación con <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.3.3. Generalidades sobre la analgesia.....	37

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis.....	44
3.2. Objetivos.....	45
3.2.1. Objetivos generales.....	45
3.2.2. Objetivos particulares.....	45

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Material vegetal.....	47
4.1.1. Preparación de los extractos orgánico, acuoso y aceite esencial a partir de <i>B. cavanillesii</i>	47
4.1.2. Preparación del extracto orgánico y aceite esencial a partir de las partes aéreas de <i>B. veronicifolia</i>	48
4.2. Estudios de eficacia y toxicidad.....	48

4.2.1. Determinación de la toxicidad aguda del extracto íntegro de <i>B. cavanillesii</i> mediante los criterios de Lorke.....	49
4.2.2. Potencial antinociceptivo en ratones utilizando las pruebas de la placa caliente y los estiramientos abdominales.....	49
4.2.2.1. Potencial antinociceptivo de los extractos íntegros de <i>B. veronicifolia</i> (BVEO), <i>B. cavanillesii</i> (BCEO) y de los metabolitos 16 , 18 , 19 y 24 en la prueba de la placa caliente.....	50
4.2.2.2. Potencial antinociceptivo de los extractos íntegros de <i>B. veronicifolia</i> (BVEO), <i>B. cavanillesii</i> (BCEO) y los metabolitos 16 , 18 , 19 y 24 en la prueba de estiramiento abdominal.....	50
4.2.3. Evaluación del potencial antidiabético de los extractos orgánicos, aceite esencial y metabolitos selectos de <i>B. veronicifolia</i> y del extracto orgánico íntegro de <i>B. cavanillesii</i>	51
4.2.3.1. Selección del modelo e inducción de la condición diabética en los animales de experimentación.....	51
4.2.3.2. Preparación de las muestras.....	52
4.2.3.3. Recolección de muestras biológicas y determinación de niveles de glucosa sanguínea.....	52
4.2.3.4. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo de los extractos orgánicos de <i>B. veronicifolia</i> (BVEO), <i>B. cavanillesii</i> (BCEO) y el aceite esencial de <i>B. veronicifolia</i> (BVAE) en animales normoglicémicos.....	54
4.2.3.5. Evaluación del efecto hipoglicemiante agudo del extracto orgánico íntegro de <i>B. veronicifolia</i> en animales diabéticos.....	53
4.2.3.6. Efecto del extracto orgánico de <i>B. veronicifolia</i> sobre la tolerancia a la glucosa.....	53
4.2.3.7. Evaluación del efecto hipoglicemiante agudo de los compuestos puros 19 y 24 aislados de <i>B. veronicifolia</i> en animales normoglicémicos.....	54
4.2.3.8. Evaluación del efecto agudo hipoglicemiante de los compuestos puros 19 y 24 aislados de <i>B. veronicifolia</i> en animales diabéticos.....	54
4.2.4. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos orgánicos de <i>B. veronicifolia</i> y <i>B. cavanillesii</i> en el modelo de úlcera inducida con etanol absoluto.....	55
4.2.4.1. Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto de <i>B. cavanillesii</i>	55
4.2.4.1.1. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina.....	56
4.2.4.1.2. Lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas pretratadas con el éster metílico de la N-nitro L-Arginina (L-NAME).....	56
4.2.4.1.3. Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con N-etilmaleimida (NEM).....	56

4.2.5. Evaluación del efecto de <i>B. veronicifolia</i> y <i>B. cavanillesii</i> sobre la motilidad intestinal en ratón.....	56
4.2.6. Evaluación del efecto anti- <i>Helicobacter pylori</i> del extracto orgánico íntegro, fracciones primarias, aceite esencial y compuesto 40 obtenidos de <i>B. cavanillesii</i>	57
4.2.6.1 Cepa del microorganismo y condiciones de cultivo.....	57
4.2.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)...	57
4.2.7. Determinación del efecto antibacteriano del extracto orgánico íntegro y el aceite esencial.....	58
4.2.8. Análisis estadístico.....	59
4.3. Pruebas de identidad y composición de utilidad para el control de calidad de la droga cruda de <i>B. cavanillesii</i>	59
4.3.1. Caracterización molecular de <i>B. cavanillesii</i>	59
4.3.2. Establecimiento de perfiles cromatográficos del extracto orgánico y aceite esencial de <i>B. cavanillesii</i> por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas.....	60
4.3.3. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).....	61
4.3.4. Aislamiento del compuesto activo y marcador mayoritario del extracto orgánico íntegro.....	61
4.3.4.1. Análisis cromatográficos.....	61
4.3.4.2. Equipos utilizados para la determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	62
4.3.4.3. Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total.....	62
4.3.4.4. Aislamiento y caracterización del 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno (40) de la fracción BCFH.....	62
4.3.4.5. Aislamiento de los metabolitos mayoritarios de la infusión de <i>B. cavanillesii</i>	63
4.3.5. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación del compuesto 40 en el aceite esencial.....	63
4.3.5.1. Preparación del aceite esencial de <i>B. cavanillesii</i>	64
4.3.5.2. Aislamiento del 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2 <i>H</i> -cromeno (40).....	64
4.3.5.3. Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.....	64
4.3.5.3.1. Especificidad.....	64
4.3.5.3.2. Linealidad del sistema.....	65
4.3.5.3.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)...	66
4.3.5.3.4. Linealidad del método y exactitud.....	66
4.3.5.3.5. Precisión del método.....	66
4.3.5.3.6. Estabilidad.....	66
4.3.5.3.7. Cuantificación del compuesto 40 en diferentes muestras...	67

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
5.1. <i>Brickellia veronicifolia</i> (Kunth) A. Gray (Asteraceae).....	69
5.1.1. Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto y compuestos puros de la especie.....	69
5.1.2. Evaluación del potencial antidiabético del extracto orgánico, aceite esencial y compuestos selectos de la especie <i>Brickellia veronicifolia</i>	74
5.1.3. Determinación del efecto de <i>B. veronicifolia</i> en la prueba de la motilidad intestinal en ratones.....	80
5.1.4. Efecto gastroprotector de BVEO en el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto.....	81
5.2. <i>Brickellia cavanillesii</i> (Cass.) A. Gray (Asteraceae).....	82
5.2.1. Pruebas de inocuidad de <i>Brickellia cavanillesii</i> . Efectos tóxicos agudos..	83
5.3. Pruebas de identidad.....	84
5.3.1. Caracterización molecular de <i>B. cavanillesii</i>	84
5.3.2. Establecimiento de perfiles cromatográficos del extracto íntegro y aceite esencial de <i>B. cavanillesii</i>	85
5.3.3. Identificación de los compuestos mayoritarios de la esencia por CG-EM	98
5.3.4. Aislamiento del compuesto 40 , marcador de la especie <i>B. cavanillesii</i> y caracterización.....	99
5.3.5. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación del compuesto activo marcador 40 en la esencia.....	99
5.3.5.1. Selectividad.....	100
5.3.5.2. Linealidad del sistema.....	100
5.3.5.3. Límite de detección y límite de cuantificación.....	102
5.3.5.4. Linealidad del método y exactitud.....	103
5.3.5.5. Precisión del método.....	104
5.3.5.6. Estabilidad.....	106
5.3.5.7. Cuantificación del compuesto 40 en tres lotes diferentes de <i>B. cavanillesii</i>	107
5.4. Pruebas de eficacia.....	108
5.4.1. Potencial analgésico del extracto orgánico íntegro en ratones.....	108
5.4.2. Evaluación del potencial antidiabético del extracto orgánico.....	111
5.4.3. Efecto sobre la motilidad gastrointestinal del extracto orgánico (BCEO), aceite esencial (BCAE) y las fracciones derivadas de la infusión (IFD e IFA)...	114
5.4.4. Efecto gastroprotector del extracto orgánico.....	115
5.4.5. Establecimiento del efecto anti- <i>Helicobacter pylori</i>	119
5.4.6. Establecimiento del potencial antibacteriano de <i>B. cavanillesii</i>	120
5.5. Pruebas biológicas realizadas al metabolito 40 derivado de la especie <i>B. cavanillesii</i>	120

VI. CONCLUSIONES.....	123
VII. PERSPECTIVAS.....	125
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	126
IX. ANEXOS.....	137

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del extracto orgánico y el aceite esencial de <i>B. veronicifolia</i>	23
Cuadro 2. Metabolitos secundarios de tipo flavonoide aislados de la especie <i>B. cavanillesii</i>	24
Cuadro 3. Especies medicinales utilizadas en el tratamiento de la dispepsia funcional no ulcerogénica	30
Cuadro 4. Plantas con actividad anti-ulcerosa y sus estudios farmacológicos	34
Cuadro 5. Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos	40
Cuadro 5. Compuestos fenólicos identificados en el extracto orgánico íntegro de <i>Brickellia cavanillesii</i> mediante HPLC HPLC-DAD-APCI/MS	90
Cuadro 6 . Metabolitos secundarios caracterizados mediante CG-EM en la esencia de <i>B. cavanillesii</i>	98
Cuadro 7. Valores experimentales obtenidos para la construcción de la curva de calibración del compuesto 40	101
Cuadro 8. Valores experimentales obtenidos para la construcción de la curva del límite de cuantificación y límite de detección del compuesto 40	102
Cuadro 9. Valores experimentales obtenidos para el porcentaje de recobro para estimar la linealidad y exactitud método con el estándar 40	104
Cuadro 10. Valores experimentales de repetibilidad obtenidos para el analista uno y estimar la precisión del método con el estándar 40	105
Cuadro 11. Valores experimentales obtenidos para los analistas uno y dos para el cálculo de la precisión intermedia del método con el estándar 40	106
Cuadro 12. Resultados de la evaluación de estabilidad representados por $ d_i $	107
Cuadro 13. Cuantificación del compuesto 40 en los Lotes I-III de material vegetal	108
Cuadro 14. Actividad Anti- <i>H. pylori</i> del aceite esencial (BCAE) y las fracciones extraídas con hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etilo (FA) y acuosa (FW) del extracto orgánico de <i>B. cavanillesii</i>	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flavonoides aislados de <i>B. veronicifolia</i>	20
Figura 2. Terpenoides aislados de <i>B. veronicifolia</i>	21
Figura 3. Flavonoide hipoglicemiante centaureidiana aislado de <i>B. veronicifolia</i>	25
Figura 4. Esquema general del tracto gastrointestinal	26
Figura 5. Esquema de las diferentes capas que constituyen al tracto gastrointestinal	26
Figura 6. Movimiento peristáltico de los intestinos	27
Figura 7. Micrografía electrónica de la bacteria gram negativa <i>Helicobacter pylori</i> (en azul) encontrada en el estómago (Tomada de Fleming, S; Deadly Diseases and Epidemics. <i>Helicobacter pylori</i>	36
Figura 8. Procesos fisiológicos que participan en la percepción del dolor	39
Figura 9. Clasificación de las fibras nociceptivas encargadas de la transducción y la transmisión de los estímulos generadores de dolor	39

- Figura 10.** Teoría del control regulado, uno de los mecanismos para la modulación del dolor 43
- Figura 11.** Efecto antinociceptivo del extracto CH₂Cl₂-MeOH (1:1) de *Brickellia veronicifolia* (BVEO) en ratones. En la gráfica A se presenta el número de contorsiones-estiramientos y en la gráfica B la latencia de respuesta al estímulo térmico en la prueba de la placa caliente. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de n = 6 ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t-Dunnet.* p< 0.05 72
- Figura 12.** Efecto antinociceptivo de los ácidos 6-metoxisalicílico (18), 2-metoxibenzoico (19) y de los compuestos, 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (24) y acetato de taraxasterilo (16) obtenidos de la especie *B. veronicifolia* en las pruebas del estiramiento abdominal (panel A) y la placa caliente (panel B). Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet. * P< 0.05 73
- Figura 13.** Efectos hipoglucemiantes del extracto orgánico de *B. veronicifolia* evaluado en ratas normoglucémicas. Cada punto representa la media de N=6 \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05 76
- Figura 14.** Efectos hipoglucemiantes del extracto orgánico de *B. veronicifolia* evaluado en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de N=6 \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05. 76
- Figura 15.** Curva de Tolerancia a la Glucosa (OGTT) luego de la administración del extracto orgánico de *B. veronicaefolia* y glibenclamida en ratas normoglicémicas. Cada punto representa la media de N=6 \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05 77
- Figura 16.** Efectos hipoglucemiantes del aceite esencial y los compuestos aislados de *B. veronicifolia* evaluado en ratas normoglucémicas. Cada punto representa la media de N=6 \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05 79
- Figura 17.** Efectos hipoglucemiantes del aceite esencial y los compuestos aislados de *B. veronicifolia* evaluados en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de N=6 \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05 79
- Figura 18.** Efecto de *B. veronicifolia* sobre el tránsito intestinal del carbón activado en ratones. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05, # P<0.01 80

- Figura 19.** Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. veronicifolia* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$ 82
- Figura 20.** Cromatograma obtenido por HPLC-PDA/APCI-MS del extracto orgánico de *B. cavanillesii* 89
- Figura 21.** Cromatogramas del aceite esencial (A) y de la fracción primaria hexánica (B) realizados por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada a Espectroscopia de Masas en la modalidad de Ionización Química a Presión Atmosférica y un Detector de Arreglo de Fotodiodos 97
- Figura 22.** Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. cavanillesii* 98
- Figura 24.** Curva de calibración para la cuantificación del compuesto 40 y el establecimiento de la linealidad del sistema 101
- Figura 25.** Curva de calibración para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación del compuesto 40. 103
- Figura 26.** Efecto antinociceptivo del extracto CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de *Brickellia cavanillesii* (BCEO) en ratones. En la gráfica A se presenta el número de contorsiones-estiramientos totales y en la gráfica B la latencia de respuesta al estímulo térmico en la prueba de la placa caliente. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVVA seguida de una prueba de t-Dunnet.* $p < 0.05$ 110
- Figura 27.** Efectos hipoglicémicos del extracto orgánico de *B. cavanillesii* evaluado en ratas normoglicémicas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm$ E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$ 112
- Figura 28.** Efectos hipoglicémicos del extracto orgánico de *B. cavanillesii* evaluado en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm$ E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$ 112
- Figura 29.** Efecto inhibitorio sobre la motilidad gastrointestinal del aceite esencial (BC-AE), la fracción extraída con diclorometano de la infusión (BC-IFD) y el extracto orgánico (BC-EO) obtenidos de la especie *B. cavanillesii*. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$ 114
- Figura 30.** Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. cavanillesii* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$ 116

Figura 31. Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. cavanillesii* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas pretratadas con indometacina (A), L-NAME (B), N-etilmaleimida (C). Cada punto representa la media de seis determinaciones (n=6) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05 **118**

Figura 32. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori* del extracto orgánico de *B. cavanillesii*. Cada punto representa el promedio de 2 experimentos realizados por triplicado. Como control se utilizó el DMSO y el ácido anacárdico como producto natural de referencia **119**

Figura 33. Efecto antinociceptivo y antiespasmódico del compuesto **40** aislado de la especie *B. cavanillesii* en las pruebas de la placa caliente y sobre el tránsito intestinal de carbón activado, ambas en ratones. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05, # P<0.01 **122**

RESUMEN

La presente disertación doctoral describe parte de la investigación científica realizada para la elaboración de las monografías de dos especies vegetales ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de México: *Brickellia veronicifolia* y *B. cavanillesii*. El estudio consistió en el establecimiento de algunos parámetros de eficacia de la primera especie y de varios parámetros de inocuidad, eficacia y control de calidad de la droga cruda derivada de *B. cavanillesii*. En todos los casos los estudios se efectuaron de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En primer lugar se demostraron las propiedades antinociceptivas de un extracto orgánico de *B. veronicifolia* (100-600 mg/kg) utilizando como modelos farmacológicos los de la placa caliente y estiramiento abdominal. Además, se comprobó que los ácidos 6-metoxisalicílico (**18**) y 2-metoxibenzoico (**19**) así como el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), todos ellos aislados de esta especie, son efectivos como agentes antinociceptivos en ambos modelos.

El compuesto **24** mostró el mejor efecto antinociceptivo en la prueba de estiramiento abdominal, ya que, a la dosis de 100 mg/kg, inhibió aproximadamente en un 50 % los estiramientos-contracciones de los animales con respecto al grupo control; además su acción fue dependiente de la dosis. La eficacia de estos productos fue comparable a la del metamizol, utilizado como control positivo, en la prueba de estiramiento abdominal. Sin embargo fueron menos activos que la morfina en la prueba de la placa caliente.

Por otro lado, la evaluación del potencial antinociceptivo de los ácidos **18** y **19** en el ensayo de la placa caliente, permitió observar un aumento en la latencia de respuesta al estímulo térmico. En ambos casos, el efecto fue dependiente de la dosis en el intervalo de las concentraciones evaluadas.

Adicionalmente, se establecieron las propiedades antidiabéticas del extracto íntegro, un aceite esencial y algunos metabolitos secundarios mayoritarios en la especie [2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y acetato de taraxasterilo (**16**)]. Se utilizó para ello un modelo de diabetes inducida experimentalmente con estreptozotocina en ratas.

Los resultados obtenidos en los experimentos agudos permitieron comprobar que los distintos tratamientos ensayados poseen propiedades hipoglucemiantes y antihiperglucémicas en un rango de concentraciones de 10-300 mg/kg

Para completar las pruebas de eficacia de *B. veronicifolia*, también se evaluó su potencial antiespasmódico *in vivo* utilizando la prueba de tránsito intestinal en ratones. Los resultados encontrados permitieron comprobar que el extracto íntegro (3.16-31.6 mg/kg) disminuye de manera significativa y dependiente de la dosis, el tránsito intestinal del carbón activado en los ratones de prueba. El efecto concuerda con las propiedades relajantes de la musculatura lisa previamente demostradas en ensayos *in vitro* en íleon aislado de cobayo en nuestro grupo de trabajo.

Finalmente, se evaluó el efecto gastroprotector potencial del extracto íntegro en un modelo de úlceras inducidas con etanol en ratas. El extracto orgánico (10-300 mg/kg) administrado *per os* provocó un efecto gastroprotector significativo dependiente de la dosis. La DE₅₀ calculada fue de 157.9 mg/kg.

Los resultados de las pruebas de eficacia de *B. veronicifolia* serán incorporados a la monografía de la especie previamente propuesta por Rivero-Cruz y colaboradores.

Por otro lado, la especie medicinal *B. cavanillesii* fue objeto de un estudio más extenso que permitió establecer algunos parámetros de calidad, eficacia e inocuidad mediante la experimentación pertinente. En primer lugar se estableció la toxicidad aguda del extracto orgánico íntegro mediante el método de Lorke en ratones; los resultados demostraron que la planta no es tóxica de acuerdo a los criterios del método empleado, ya que, hasta la dosis de 5 g/kg no se observó efecto tóxico alguno.

Las pruebas farmacológicas realizadas a los extractos y el compuesto obtenido (40) de *B. cavanillesii* permitieron comprobar el potencial antinociceptivo de la planta, en los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal (100-794 mg/kg). Así mismo, los estudios sobre el potencial antidiabético, utilizando los mismos modelos que para la especie relacionada *B. veronicifolia*, permitieron comprobar que la planta posee propiedades anti-hiperglucemiantes e hipoglucemiantes.

Se establecieron las propiedades gastroprotectoras del extracto de *B. cavanillesii*, (10-300 mg/kg) utilizando el mismo modelo farmacológico mencionado para *B. veronicifolia*. Los efectos gastroprotectores del extracto fueron mejores que los del de *B. veronicifolia*; la DE₅₀ calculada fue de 30 mg/kg. Los estudios preliminares del

mecanismo de acción demostraron que el efecto gastroprotector esta mediado en parte por las prostaglandinas endógenas, las cuales son muy importantes para la protección de la mucosa gástrica.

Las propiedades antiespasmódicas del aceite esencial, la infusión y el extracto orgánico fueron evaluadas en la prueba de tránsito intestinal de carbón activado en ratones. Tanto la esencia, como el extracto orgánico, provocaron la disminución del tránsito del carbón de manera dependiente de la dosis. El efecto fue comparable al de *B. veronicifolia*.

La evaluación del extracto orgánico, el aceite esencial y el compuesto mayoritario 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**40**) contra la bacteria *Helicobacter pylori*, demostró que los tratamientos inhiben de manera significativa el crecimiento de la bacteria.

En cuanto a las pruebas de identidad de *B. cavanillesii*, se establecieron los perfiles cromatográficos de la infusión y el extracto íntegro de la planta. El análisis de este último mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas permitió la identificación de varios compuestos fenólicos incluyendo flavonoles (rutina, hiperósido, 3-*O*-rutinosido del kamferol, 3-*O*-glucósido del kamferol, 3-*O*-rutinosido de la isoramnetina) y derivados del ácido clorogénico (ácido clorogénico, ácido cafeíco, ácido diferúlico, clorogenato de glicerilo, ácido 1,2-dicafeoilquínico y lactona del ácido 3-*O*-feruoil-4-*O*-cafeoilquínico). Así mismo, se estableció un código de barras para la especie mediante la secuenciación del ADN de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer por sus siglas en inglés) del núcleo; ya que la secuencia de nucleótidos no está publicada ni reportada en las bases de datos especializadas.

Se desarrolló y validó una prueba de composición que permite cuantificar el contenido de la desmetilisoencecalina (**40**), principio espasmolítico y anti-*H. pylori*, en el aceite esencial. Este método resulto ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones desarrollado.

Los resultados globales del estudio de *B. cavanillesii* permitirán integrar la primera monografía tipo OMS de esta importante especie vegetal.

ABSTRACT

This investigation describes the study of two widely used Mexican medicinal plants. The main goal was to establish the efficacy, quality control and safety parameters of the crude drug derive from *Brickellia cavanillesii* as well as some pharmacological properties of the *B. veronicifolia*. In both cases, the research was accomplished according to World Health Organization criteria.

According to several pharmacological experiments *in vivo*, the crude extract and isolated compounds from *B. veronicifolia* showed spasmolytic, antidiabetic and antinociceptive actions.

The antinociceptive effects were established using two different pharmacological models: hot-plate and writhing tests. The most active compounds in both models were 6-methoxysalicylic (**18**), 2-methoxybenzoic (**19**) acids and benzyl-2,6-dimethoxybenzoate (**24**). The results revealed that the extract (100–600 mg/kg), 6-methoxysalicylic acid (**18**), 2-methoxybenzoic acid (**19**), benzyl-2,6-dimethoxybenzoate (**20**), and taraxasteryl acetate (**16**) showed significant analgesic effects.

The hypoglycemic and antihyperglycemic effect of an extract of *B. veronicifolia* administered *p.o.* was analyzed. The results indicated that the extract (100mg/kg), had a hypoglycemic effect in normal rats. Furthermore, the OGTT (oral glucose tolerance test) performed in this work showed that extract provoked a significant postprandial decrease of blood glucose level after 30 min of the glucose challenge.

The spasmolytic action *in vitro* of *B. veronicifolia* previously described encouraged us to determine the effect of extract on gastrointestinal motility *in vivo*; the results indicated that the crude extract was also effective *in vivo*; the effect of organic extract at the dose of 31.6 mg/kg was comparable to that of atropine at the dose of 1 mg/kg. For the extract, the gastrointestinal motility assay showed a typical biphasic pattern indicative of hormesis mechanisms.

Finally, the gastroprotective properties of *B. veronicifolia* species were determined using the ethanol-induced gastric lesions in rats; the organic extract

demonstrated significant gastroprotective activity; the effect was dose-dependent. The calculated DE₅₀ was 157.9 mg/kg.

B. cavanillesii was subjected to an extensive pharmacological study. First, the acute toxicity of the organic extract was established using the Lorke procedure; the results demonstrated that the extract is safe since the DL₅₀ is higher than 5000 mg/kg when it was administered orally.

Next, antinociceptive potential of the organic extract (100-794 mg/kg) was established using the writhing and hot plate tests. The results revealed that the extract possessed significant analgesic effect in both models. Accordingly, the plant is effective for treating central and peripheral pains.

According to some acute pharmacological experiments *in vivo*, the crude extract showed hypoglycemic and antihyperglycemic effects (10-300 mg/kg) in normal and diabetic rats.

The gastroprotective effect of *B. cavanillesii* extract using ethanol-induced gastric mucosal damage in rats was analyzed. Gastric lesions were significantly reduced by the extract (10-300 mg/kg). Pretreatment of rats with L-NAME and NEM did not suppress the gastroprotective effect of the extract. However, the extract gastroprotection was importantly attenuated in those animals pretreated with indomethacin, an inhibitor of cyclooxygenase-1 (COX-1). These data of the extract suggest that the mode of action involves the stimulation of prostaglandins synthesis. Next the anti-*Helicobacter pylori* activity of the extract and the essential oil were measured, the MIC values were 2.5 and 20 µg/mL, respectively.

Finally, the antispasmodic properties of the essential oil, the infusion and the organic extract (3.16-31.6 mg/kg) were evaluated in the intestinal activated charcoal transit test in mice. The results showed that all treatments significantly inhibit gastrointestinal motility.

The organic extract of *Brickellia cavanillesii* was analyzed by HPLC-PDA/APCI-MS. This analysis allowed the identification of several phenolic compounds including some flavonoids and caffeic acid derivatives.

The composition of the essential oil was also investigated using GC-MS; the analysis indicated that desmethylisoencecaline (**40**) was the major compound. This

product was selected as the marker compound of the species. Other compounds detected in the oil were caryophyllene, curcumene, spathulenol, caryophyllene oxide and carotol.

Another identity test established for *B. cavanillesii* in this study was a genetic barcode. The latter was obtained through the DNA analysis of the nuclear ITS region. The ITS sequence analysis is a valuable tool for crude drug identification.

Finally, a sensitive and accurate HPLC procedure for quantifying the amount of the marker compound **40** in the essential oil was developed and validated.

The overall results will be useful for integration of a scientific monograph of *Brickellia cavanillesii*. On the other hand, the pharmacological testing results derived from the investigation on *B. veronicifolia* will be useful for updating the scientific monograph of the plant.

I. INTRODUCCION

Las plantas medicinales son la fuente más rica de productos medicinales de utilidad en los principales sistemas de medicina como la alternativa, complementaria y homeopática. Asimismo, la mayoría de los nutraceuticos, suplementos alimenticios, intermediarios farmacéuticos y entidades químicas para la síntesis de fármacos se obtienen de plantas medicinales (Hammer *et al.*, 1999).

En los últimos años, las prácticas médicas alternativas han cobrado mayor fuerza a nivel global y han sido un tema muy importante en las reuniones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En muchos países, principalmente en aquellos en vías de desarrollo, una gran proporción de sus poblaciones confía principalmente en otras terapias a base de plantas medicinales para el alivio de sus enfermedades. En los países en vía de desarrollo el uso de las plantas medicinales obedece a muchas causas, en particular a cuestiones de tipo histórico, cultural y socioeconómicos (OMS, 2000; OMS, 2002; ICDRA, 2002; 2004). Las plantas medicinales son importantes también para el desarrollo de agentes terapéuticos. Por consiguiente, la reglamentación de la explotación y la exportación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, son esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad futura (OMS, 2000).

A pesar de que los medicamentos herbolarios a nivel global se han usado durante muchos siglos, solo una cantidad relativamente pequeña de especies medicinales o sus derivados se han estudiado para sus posibles aplicaciones médicas en el marco de la medicina oficial. Asimismo, los datos disponibles sobre su seguridad y eficacia son mucho menores.

En este sentido, la OMS ha adoptado varias resoluciones. Así, en la Declaración de Alma-Ata (1978), la Organización recomendó, la regularización de medicamentos tradicionales de utilidad comprobada y en consecuencia, la modificación de las normas oficiales respecto a la regulación de los medicamentos herbolarios.

De manera adicional la Asamblea de la Salud de la OMS en 1989 (WHA 42.43) instó a sus Países miembros a realizar las siguientes acciones:

- ❖ Efectuar una evaluación completa de sus sistemas de medicina tradicional
- ❖ Hacer un inventario sistemático así como estudios de tipo preclínico y clínico de las plantas medicinales que se utilizan en las prácticas médicas populares
- ❖ Implementar medidas para reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de especies medicinales además de estándares adecuados
- ❖ Identificar a las plantas medicinales o los productos derivados de ellas que tengan una relación eficacia/efecto-secundario satisfactoria y que, por tal motivo, deban incluirse en los formularios o farmacopeas nacionales

Los productos herbolarios también han sido objeto de discusión en las reuniones de la Conferencia Internacional sobre Autoridades Regulatoras de Medicamentos (ICDRA). En los talleres sobre regulación de este tipo de preparados, realizados en 1986 y 1989, se llegó a la conclusión de que la OMS debería de considerar la posibilidad de preparar normas modelo que contengan elementos básicos de legislación y de registro. En consecuencia, en 1991 la OMS redactó una serie de Normas para la Evaluación de los Medicamentos Herbolarios (OMS/TRM/91.4), las cuales fueron adoptadas para su uso. En términos generales, estas normas tratan de establecer los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los medicamentos a base de plantas medicinales, todo esto con el principal propósito de auxiliar y facilitar a las autoridades sanitarias, organizaciones científicas y a los fabricantes de este tipo de medicamentos, la evaluación y el registro de medicamentos herbolarios, con base en los resultados de investigaciones científicas.

Con la finalidad de generar los criterios y principios generales que permitan guiar la labor de investigación sobre la evaluación de los medicamentos herbolarios, la OMS reunió a un grupo de expertos para la realización de esta tarea. Estos lineamientos proporcionarían

una base para que los países miembros formularan sus propias normas de investigación, el intercambio de experiencias y otra información de manera que proporcionasen datos confiables para la validación de productos herbolarios.

Así, con el conjunto de normas establecidas y las recomendaciones de la ICDRA, la OMS publicó un primer volumen “Monografías de Plantas Medicinales Selectas”. La finalidad de este documento es proporcionar la información científica sobre parámetros de eficacia, calidad e inocuidad de algunas especies vegetales ampliamente usadas en todo el mundo con propósitos medicinales y representar un modelo adecuado para que los Estados miembros elaboren sus propias monografías. Posteriormente y con el mismo propósito, se publicaron dos volúmenes adicionales de monografías de plantas medicinales.

En nuestro país, a pesar de la gran riqueza de plantas medicinales con propósitos curativos, no existe regulación alguna que permita controlar la venta, tanto interna como externa, la calidad, la seguridad y la eficacia de las miles de especies vegetales que se comercializan a lo largo y ancho de México. La legislación vigente dispone para este fin de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM, 2001) la cual representa el primer documento en su tipo en toda Latinoamérica. Esta Farmacopea fue hecha con el objetivo de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas, o sus derivados, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios para contribuir al mejoramiento de la calidad de estos productos y su uso racional. Sin embargo, la mayoría de las especies ahí enlistadas son de especies introducidas durante la Conquista y sus monografías son copia de la Real Farmacopea Española. En el caso de las especies autóctonas, las monografías se incluyeron en la sección de la extrafarmacopea ya que no se dispone de la información científica suficiente para integrar una monografía farmacopeica. Por lo tanto, para obtener un documento que incluya información representativa de las especies cultivadas y comercializadas en nuestro país, es necesaria la generación de información científica de calidad para la integración de las monografías de estas plantas medicinales (Gómez Castellanos, 2009).

En respuesta a esto, un conjunto de investigadores de distintas dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto Nacional de Antropología e Historia, recibieron fondos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Secretaría de Salud para generar la información científica que permita la elaboración de monografías tipo OMS de un grupo de especies medicinales mexicanas ampliamente comercializadas. Como parte de ese proyecto, este trabajo pretende establecer la eficacia preclínica, inocuidad y calidad de *Brickellia cavanillesii*. Asimismo, contempla la actualización de la monografía de *B. veronicifolia* mediante estudios adicionales de eficacia preclínica.

II. ANTECEDENTES

2.1 Regulación de los productos herbolarios en Europa y los Estados Unidos: un ejemplo a seguir

2. 1.1. Comunidad Europea

Las plantas medicinales han constituido, desde tiempos inmemoriales, una fuente de los recursos terapéuticamente más importantes de los sistemas tradicionales y modernos de salud de varias naciones. De tal manera que un gran número de enfermedades son tratadas con productos herbolarios, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. En estos últimos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que debido a los niveles de pobreza y al limitado acceso a la medicina moderna, entre el 70 y el 80 % de su población depende de las plantas para la procuración primaria de su salud.

Hoy día las plantas medicinales se utilizan bajo muchas formas, bien sea como remedios caseros o tradicionales, productos naturistas o herbolarios de venta libre, y en preparados fitoterapéuticos elaborados por la industria farmacéutica formal. Todo ello ha provocado un mercado global de plantas medicinales floreciente y de grandes dimensiones (Bandaranayake, 2006). De tal forma que varias empresas han retomado un gran interés en la investigación y comercio de plantas medicinales, lucrando así con la medicina alternativa ya que la cantidad de dinero que se maneja por la compra-venta de estas especies y sus preparados esta en el rango de billones de dólares por año. Cabe mencionar que las ventas anuales en Europa del Este alcanzaron los 5 mil millones de dólares en el periodo 2003-2004, en la República Popular China, la cual cuenta con una gran tradición en el uso de plantas medicinales, se estimó que las utilidades generadas fueron de alrededor de 14 mil millones de dólares en el 2005, mientras que en Brasil las ventas realizadas en el 2007 por concepto de remedios herbolarios fueron cerca de 160 millones de dólares (WHO, 2008).

En la actualidad los grandes productores de plantas medicinales son los países del Este de Europa y los de Extremo Oriente en el continente asiático. El ejemplo más claro lo tenemos en China, país que se encuentra en plena campaña comercial internacional de promoción de estos productos. De hecho, el gigante asiático planea modernizar su medicina

tradicional (su gran tesoro), a través de un revolucionario plan estratégico de quince años, que pretende revalorizar su mercado con la idea de alcanzar los estándares que exige el comercio internacional. En dicho plan, colaboran dieciséis ministerios chinos y lo encabezan el Ministerio de Ciencia y Tecnología, el Ministerio de Sanidad y la Administración Estatal de la Medicina Tradicional China (Cordell, 2007; Prieto, 2007).

Desafortunadamente, en una gran parte del mundo la regulación de las plantas medicinales y sus derivados no ha crecido a la par del incremento en su comercio. Por lo tanto, la OMS ha encabezado numerosos esfuerzos para enfrentar el principal reto en la regulación, y por lo tanto en el uso y comercialización racional de los productos herbolarios, el establecimiento de la seguridad, eficacia y la calidad de las plantas más utilizadas con fines sanitarios. Para ello, esta organización reunió a un grupo de expertos que se ha encargado de recopilar, generar e integrar la información necesaria para la emisión de guías que permitan el establecimiento de los parámetros antes mencionados.

Los documentos más importantes publicados por la OMS son: *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials* (1998) y los tres volúmenes de monografías de especies medicinales selectas (1999, 2004 y 2007). Estos facilitarán a los países miembros de la OMS en su labor de regular los fitomedicamentos. Las monografías constituyen además los modelos idóneos para que los países miembros realicen las monografías de las especies medicinales más utilizadas, y por lo tanto más comercializadas, en sus prácticas médicas populares y/o tradicionales. Otro objetivo de estas guías es promover el uso racional y la conservación de los recursos naturales y la integración de sus sistemas tradicionales de salud a los oficiales (WHO, 1999; OMS, 2002).

Varios países han respondido al llamado de la OMS y han establecido de manera paulatina las normas para regular el comercio y uso de las plantas medicinales y los preparados derivados de ellas. Ejemplos claros de estas tendencias son los países integrantes de la Comunidad Europea (CE) y los Estados Unidos de América (EUA). Estos países han establecido sus propias guías y documentos que permiten el comercio y uso racional de sus productos herbolarios. Por supuesto que dichos ejemplos son deseables de seguir para establecer en México una reglamentación eficiente y documentos oficiales que

normen de manera adecuada la calidad y seguridad de las plantas de mayor uso. Todo ello garantizaría además un comercio interno adecuado y la posibilidad de competir en el mercado global de las plantas medicinales. Este último aspecto es muy importante en un país como México que posee una gran riqueza de plantas medicinales que bien podrían consumirse en otras regiones del mundo.

Para la Comunidad Europea (CE), los medicamentos herbolarios son productos derivados de plantas o materiales de estas que se utilizan con propósitos terapéuticos. En estos países el alto consumo de estos preparados ha conllevado a la armonización del mercado Europeo de plantas medicinales.

Para ello, el Parlamento y el Consejo Europeos, a través de varios documentos, dentro de los que destacan las enmiendas 2001/83/CE y 2004/24/CE, sentaron las bases para el uso de medicamentos herbolarios en toda la Comunidad. El decreto emitido en el 2004 establece la definición de producto medicinal herbolario como “cualquier producto medicinal, conteniendo exclusivamente como ingredientes activos una o más sustancias herbolarias o una o más preparaciones herbolarias, o una o más de tales sustancias herbolarias conjuntamente con uno o más de tales preparaciones herbolarias”. Asimismo, la enmienda realizada al documento 2001/83/CE publicado en el año 2001, señala que para la comercialización de un producto herbolario, este debe cumplir con los mismos requerimientos determinados por las autoridades reguladoras nacionales de cada miembro de la CE para un medicamento alopático. También se establece que si se demuestra bibliográficamente que un producto medicinal herbolario contiene principios activos con un uso medicinal concreto y cierto nivel de seguridad y eficacia, los resultados de los análisis pre-clínicos o clínicos no serán necesarios para su autorización. En caso contrario el producto deberá cumplir con esas pruebas (Directiva 2004/24/CE).

El mayor problema de los Países Europeos ha sido la evaluación de la eficacia de las especies de amplio uso en la Comunidad utilizando el criterio de la medicina basada en evidencias. En este sentido, los documentos anteriormente señalados dan a los productores la oportunidad vender medicamentos herbolarios para los cuales no es posible demostrar un uso medicinal bien establecido a los consumidores, por lo tanto, estos productos son

comercializados bajo la categoría de “productos herbolarios medicinales de uso tradicional” y son distinguidos de aquellos que si tienen un nivel de eficacia aceptable y que son llamados “productos herbolarios medicinales con uso bien establecido” (Directiva 2004/24/CE; Calapai, 2008).

Debido a la introducción de estos nuevos aspectos, particularmente la reclasificación de los productos herbolarios medicinales, se requieren cambios de competencia regulatoria tanto a nivel Europeo como a nivel nacional. Los medicamentos herbolarios, antes considerados y regulados como suplementos alimenticios ahora son considerados como productos medicinales al igual que los homeopáticos. Por esta razón, la publicación de la directiva 2004/24/CE ha causado el paso en la clasificación de estos productos de la jurisdicción de los Departamentos Europeos de Alimentos a, en primer lugar a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y sucesivamente a las agencias reguladoras nacionales de medicinas de los Estados miembros. Con la creación del Comité de Productos Herbolarios Medicinales (HMPC por sus siglas en inglés) en el seno de la EMA, la Comunidad Europea descarga en éste todas las responsabilidades en cuanto a Productos Herbolarios se refiere. Dicho comité tiene como objetivo primordial la preparación y emisión de documentos útiles para la implementación de las enmiendas publicadas por la Comunidad Europea (Calapai, 2008).

Dentro de los manuscritos importantes, las Monografías Comunitarias para productos herbolarios medicinales son los documentos que proveen un compendio de todos los datos disponibles sobre seguridad y eficacia de sustancias/preparados previstos para uso medicinal. De manera adicional, se detallan indicaciones clínicas, posología, vías de administración, contraindicaciones, precauciones en su uso, interacciones con otros productos, riesgos en el embarazo, lactancia o en la niñez y algunos otros aspectos críticos de la o las plantas medicinales por separado (Directiva 2001/83/CE).

Por otro lado la Cooperativa Científica Europea en Fitoterapia (ESCOP) representa una de las organizaciones más importantes en lo que se refiere a regulación de medicamentos herbolarios. La ESCOP se fundó en 1989 como un organismo que integra representa a varias organizaciones europeas dedicadas al estudio de la fitoterapia. Los

propósitos de esta asociación son el avance en el estatus científico de los productos herbolarios medicinales y asistir a los países de la CE en los asuntos regulatorios y de armonización. Sus objetivos específicos giran en torno al aseguramiento de la calidad, eficacia y seguridad de las fitomedicinas en la Comunidad Europea, así como a la promoción de la aceptación del uso de estos preparados, especialmente en el seno de las prácticas médicas generales. Para lograr esos objetivos, la ESCOP realiza y financia diferentes estudios de tipo clínico y otros de preparados herbolarios. Esta organización ha generado numerosas monografías sobre el uso terapéutico de plantas medicinales. Al día de hoy ya suman 80 documentos exhaustivamente revisadas y aprobadas por el HMPC de la Agencia de Evaluación para Productos Medicinales [EMA], (Kemper y Bruhn, 2005).

2.1.2. Estados Unidos de América

En octubre de 2006, la FDA (Food and Drug Administration) autorizó la solicitud para la comercialización y consumo de un nuevo medicamento (NDA; New Drug Application) llamado Veregen de utilidad tópica para el tratamiento del condiloma genital y perianal. A diferencia de los productos que suele aprobar la FDA, Veregen es un fitomedicamento, específicamente consiste de un extracto de hojas de té verde que contiene una mezcla de compuestos de tipo catequina, las sincatequinas, que probablemente son los ingredientes activos. Este producto es el primer medicamento herbolario de prescripción aprobado desde la publicación de la guía industrial en 2004. Su aprobación es prueba de que productos novedosos de origen natural con una composición compleja pueden ser desarrollados y cumplir con los estándares actuales de la FDA en cuanto a control de calidad y evaluaciones clínicas que se les exigen a los medicamentos convencionales para uso en humanos. Gracias a esto, el interés por desarrollar nuevos productos herbolarios medicinales derivados de preparados tradicionales continua en el marco de la nueva reglamentación de la FDA para este tipo de medicamentos; basta mencionar que tan solo entre 1982 y 2007, más de 350 solicitudes de nuevos IND's (investigational new drug) y pre-IND's han sido enviados a esta agencia (Chen *et al.*, 2008).

En los Estados Unidos de América, los productos botánicos utilizados para propósitos relacionados con la salud pueden ser comercializados bajo tres categorías: como alimentos convencionales, suplementos dietéticos y medicamentos. La clasificación dependerá del objetivo específico para el que se use, tal y como se describe en el Acta de Educación y Salud sobre los Suplemento Dietéticos (DSHEA, 1994). Los alimentos convencionales y los suplementos dietéticos que son utilizados sin propósito alguno relacionado con la salud humana están regulados por el Centro de Seguridad y Nutrición Aplicada de la FDA (CDER), mientras que, bajo el Acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, un medicamento está definido como un producto que puede diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir enfermedades o como un artículo que puede afectar la estructura o función del cuerpo (CDER, 2004).

La publicación de la “Guía para la Industria de Productos Herbolarios Medicinales” (2004), pretende sentar las bases para que los productores de este tipo de preparados, cumplan con los requerimientos necesario para su comercialización bajo el régimen de medicamentos de tipo OTC (Over-the-Counter por sus siglas en inglés). Como primer punto, ese documento define a un producto herbolario como “un producto terminado y etiquetado que contiene como ingredientes matrices vegetales”. Dentro de esta definición pueden estar alimentos (incluyendo suplementos alimenticios), un medicamento (incluyendo productos biológicos), dispositivos médicos (gutapercha) o un cosmético.

En esta guía también se discuten algunas áreas en donde, debido a la naturaleza única de los productos herbolarios, la FDA busca aplicar normas que difieran de aquellas a las que son sometidas los medicamentos sintéticos, semisintéticos o compuestos de alta pureza químicamente modificados (tales como los antibióticos de origen microbiano), de manera que cuando exista alguna controversia con alguna guía aplicable a medicamentos de sintéticos o altamente puros, la guía inicialmente mencionada tendrá prioridad en su aplicación.

Como ya se había mencionado anteriormente, varios productos herbolarios son ampliamente comercializados en los Estados Unidos y dependiendo de su etiquetado y uso pretendido puede ser distribuido como alimentos, suplementos dietéticos y/o

medicamentos. En caso de que se consuma como alimento, este será regulado como tal, aquellos que sean suplementos estarán regulados por la sección 201 (ff) de la Acta (21 U.S.C. 321 (ff)) del Acta de Educación y Salud sobre los Suplemento Dietéticos. Si el producto herbolario intenta ser usado para diagnosticar, mitigar, tratar o curar alguna enfermedad entonces será evaluado como medicamento bajo la sección 201 (g)(1)(B) del Acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos.

En general, los medicamentos herbolarios no difieren de los medicamentos de tipo no botánicos en términos de la aplicación de la regulación de la FDA. Específicamente, para que el medicamento herbolario pueda ser comercializado es necesario comprobar que cumple con los requerimientos legales para demostrar su seguridad y su efectividad como un nuevo medicamento, de acuerdo con las secciones relevantes del Acta de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos y conforme a los requerimientos de producción para asegurar la calidad del producto (Chen *et al.*, 2008).

Aún cuando los productores de suplementos alimenticios no pueden darles legalmente un uso específico para algún padecimiento o enfermedad sin la aprobación de una solicitud de nuevo medicamento, varios usos médicos para suplementos dietéticos herbolarios son bien conocidos y ampliamente promovidos en la literatura, en los medios y en el internet. Para este tipo de productos no es necesario reportar los resultados de pruebas clínicas a la FDA para su aprobación.

En los Estados Unidos, para que productos herbolarios nuevos que se pretendan comercializar sean aprobados por parte de la FDA, deben de cumplir con los estándares de un producto de calidad y con evidencia de su efectividad y seguridad que son requeridos para la aprobación de cualquier medicamento nuevo. La publicación de la guía industrial para productos herbolarios medicinales en 2004 pretende alentar y facilitar el desarrollo de medicamentos herbolarios.

En este sentido, la Farmacopea Herbolaria Americana (AHP) surge como uno de los documentos más importante en la generación y recopilación de información relevante en cuanto a su eficacia, seguridad y calidad de productos herbolarios. La misión de este

documento es la promoción en el uso responsable de medicinas a base de especies vegetales y asegurar que se están utilizando con un alto grado de seguridad y eficacia tanto como sea posible. Para ello, desarrollan estándares de identidad, pureza y de análisis para productos herbolarios; de igual manera realizan un revisión crítica de datos científicos y tradicionales buscando información acerca de su eficacia y seguridad. Todo esto se encuentra plasmado en monografías, libros y otros documentos. Al día de hoy la AHP ha publicado 18 monografías de diferentes especies utilizadas con fines medicinales y que contienen información botánica, química, de almacenamiento, posología, efectos secundarios, contraindicaciones, entre otros apartados, de gran utilidad.

Entonces, tanto en la Comunidad Europea como los Estados Unidos de Norte América, el éxito de los fitomedicamentos radica en una combinación de su legislación para la regulación de los medicamentos, la actitud de la industria dispuesta a invertir para desarrollar este tipo de productos y el interés por el desarrollo de documentos oficiales, como las monografías que contiene los lineamientos que garantizan el uso de productos fitoterapéuticos eficaces, seguros y de calidad. Este tipo de ejemplos deben de ser adoptados por varios países, como el nuestro.

En México, la regulación en el uso y comercio de los productos herbolarios está a cargo de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), creada con la finalidad de organizar y armonizar en todo el país las acciones de control, vigilancia y fomento sanitario que de manera coordinada y como autoridades sanitarias ejercen la Federación y las entidades federativas (Gómez Castellanos, 2009). Dos de los instrumentos jurídicos con los que cuenta el Estado mexicano, a través de la COFEPRIS, son la Ley General de Salud (LGS) y el Reglamento de Insumos para la Salud (RIS), este último tiene como ordenamiento “reglamentar el control sanitario de los Insumos y de los remedios herbolarios, así como el de los Establecimientos, actividades y servicios relacionados con los mismos” (SSA, 1998).

En 1997, la reforma al artículo 224 de la LGS, el cual trata sobre la clasificación de medicamentos, introduce la definición de Medicamento Herbolario (MH) como “Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente

principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional”. El RIS complementa esta definición indicando: “Los medicamentos herbolarios, además de contener material vegetal, podrán adicionar en su formulación excipientes y aditivos. No se consideran medicamentos herbolarios aquéllos que estén asociados a principios activos aislados y químicamente definidos, ni aquéllos propuestos como inyectables. En la formulación de un medicamento herbolario no podrán incluirse sustancias estupefacientes o las psicotrópicas de origen sintético, ni las mezclas con medicamentos alopáticos, procaína, efedrina, yohimbina, chaparral, germanio, hormonas animales o humanas u otras sustancias que contengan actividad hormonal o antihormonal o cualquier otra que represente riesgo para la salud.” (Art. 66°-68°), además de las leyendas que deberán contener los marbetes y etiquetas (Art. 24, 69° y 70°, Tabla 1 y 2), y sus puntos de distribución (Art. 71°), que permite que sean establecimientos diferentes a Farmacias cuando el MH no sea ni contenga estupefacientes ni psicotrópicos (SSA, 1984; SSA, 1998).

Cabe resaltar que la LGS no contempla ninguna definición para remedio herbolario (RH), sin embargo, este término es mencionado en repetidas ocasiones en sus artículos 257° y 310° 414 bis, en donde se hace referencia a la clasificación de los establecimientos destinados a la fabricación, almacenaje y distribución de los RH. Ante esta situación, la implementación en 1998 del RIS introdujo una definición para un RH como “[e]l preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se le atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio para algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad. Los RH no contendrán en su formulación sustancias estupefacientes o psicotrópicas ni ningún otro tipo de fármaco alopático u otras sustancias que generen actividad hormonal, antihormonal o cualquier otra sustancia en concentraciones que represente riesgo para la salud” (SSA, 1998). De esta manera se estableció la principal diferencia entre un MH y un RH: el primero posee evidencia científica de su utilidad para el alivio curación, prevención o recuperación de padecimientos, mientras que los RH solamente se apoyan en el conocimiento popular o tradicional y se emplean como auxiliares sintomáticos. Ambos, se

diferencian de los suplementos alimenticios en que estos últimos sólo completan o incrementan la alimentación, y de las vitaminas y minerales, que pueden llegar a ser parte de formulaciones propuestas como MH, suplementos alimenticios o bien son considerados como vitamínicos, pudiendo completar la alimentación, siendo indicados también en la terapéutica o en la prevención de enfermedades. De lo anterior, se desprende que un MH no es tan sólo un alimento con propiedades curativas, y un RH no está dirigido a curar un padecimiento (Gómez Castellanos, 2009).

Pese al establecimiento de estas definiciones en estos documentos, varios huecos legales fueron creados inadvertidamente, por ejemplo, el RIS en su artículo 174° contempla los requisitos para obtener el registro de un MH de fabricación nacional pero no se estableció la obligación de anexar la información científica que sustente la eficacia y seguridad comprobadas, lo cual permitió que varios productos se registraran con información documentada en algún libro o farmacopea de otros países, como única evidencia de seguridad y eficacia (SSA, 1984; SSA, 1998).

En cuanto a la regulación de los procesos de fabricación de los medicamentos, incluyendo a los MH, existen las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), las cuales, son definidas por la Ley sobre Metrología y Normalización como “la regulación técnica de observancia obligatoria expedida por las dependencias competentes, conforme a las finalidades establecidas en el artículo 40, que establece reglas, especificaciones, atributos, directrices, características o prescripciones aplicables a un producto, proceso, instalación, sistema, actividad, servicio o método de producción u operación, así como, aquellas relativas a terminología, simbología, embalaje, marcado o etiquetado y las que se refieran a su cumplimiento o aplicación”. La Secretaría de Salud ha dispuesto de 6 NOM para regular los procesos de fabricación y comercialización de medicamentos, la NOM 059, 072, 073, 164, 176 y 177 (SSA, 1992).

De manera adicional, la legislación vigente cuenta también con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), en el caso específico de los MH, de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), la cual tiene como objetivo establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas

y sus derivados, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, para contribuir al mejoramiento de la calidad de estos productos y a su uso racional (FHEUM, 2001).

2.2 Antecedentes de las especies *Brickellia veronicifolia* y *B. cavanillesii*

2.2.1. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

Brickellia veronicifolia (Kunth) Gray es un arbusto pequeño cuyas medidas oscilan entre 40 cm y 1 m de altura. Presenta hojas opuestas, ovadas de 4 a 15 cm de largo por unos 5 cm de ancho, borde crenado, pecíolos de 3 a 6 cm de largo; las flores en cabezuelas miden de 12 a 17 mm y son rosadas (Figura 1). La especie tiene por hábitat el bosque mesófilo de montaña y el bosque de encino o de pino, a una altitud de 1750 a 2750 m sobre el nivel del mar (Martínez, 1989; INI, 1994). Sus principales sinonimias botánicas son las siguientes: *Brickellia galeottii* A. Gray, *Brickellia petrophila* B.L. Rob, *Brickellia veronicifolia* var. *petrophila* (B.L. Rob.) B.L. Rob, *Brickellia veronicifolia* var. *senilis* B.L. Rob, *Brickellia veronicifolia* var. *umbratilis* B.L. Rob, *Eupatorium glechomaefolium* Mocino ex DC y *Eupatorium veronicifolium* Kunth (MOBOT, Trípticos).

En sus *Lecciones de Farmacología* de 1854, Leonardo Oliva menciona a la especie bajo los nombres de *Bulbostylis veronicaefolia* D.C. y “gobernadora de Puebla” preconizándola para tratar dolores artríticos y “fortalecer los nervios” aplicada en baños o fomentos. *B. veronicifolia* aparece por primera vez en La Farmacopea Mexicana en 1876 en su segunda edición; allí se reconoce con el nombre común de “gobernadora de Puebla y con la sinonimia de *Eupatorium veronicaefolia*, Kunt”. La planta procedía de los alrededores de Puebla y se utilizaba en baños o fomentos para curar los dolores artríticos.

Por otro lado, Felipe García Flores en 1887, en su tesis de Farmacia, menciona al “orégano de cerro”, conocido entonces como *Eupatorium pextum* y luego como *Brickellia veronicaefolia*. En dicho trabajo a la planta se le atribuyen propiedades curativas para

dolores de estómago y falta de digestión. Asimismo, combinada con menta, pétalos de rosa, tequesquite y semilla de aguacate, es útil para “corregir deposiciones”.

Por su parte, Villada planteó en un artículo de la *Gaceta Médica de México* su uso, “con excelentes resultados por el vulgo y aun por los médicos” en la “dispepsia atónica” y en la gastralgia y “si realmente fuese el pexto la Gobernadora de Puebla”, se aplica igualmente en baños en las afecciones reumáticas.

B. veronicaefolia también aparece en las ediciones de 1898 y 1904 de la Farmacopea Mexicana, consignada como “Gobernadora de Puebla”, para los siguientes “usos vulgares”: su infusión en la gastralgia y en la dispepsia atónica y, en baños y fomentos para calmar los dolores artríticos y las reumas. Aparece, con idénticas indicaciones a las consignadas en la Farmacopea Mexicana, en la *Historia de Drogas* de Juan Manuel Noriega, de 1902.

En el Instituto Médico Nacional, otra *Brickellia*, *B. cavanillesii* o atanasia amarga, fue estudiada clínicamente en el Hospital de San Andrés por sus efectos contra la indigestión y la anorexia sin obtenerse resultados concluyentes (Loeza, 1905-1908).

En 1939, Maximino Martínez en su obra *Las Plantas Medicinales de México* cita como usos de esta planta los ya referidos en la Farmacopea Mexicana y en la tesis de García Flores, sin mencionar usos empíricos de fuente directa. En la Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica Mexicana (1952) se repite su indicación como eupéptica y antigastrálgica.

Actualmente, *B. veronicifolia* se designa con diferentes nombres comunes incluyendo peistón, pexto, oreganillo, oreganito, hierba del jaito, hierba del haito, chilaco blanco, gordolobo corriente, mejorana de campo y señate, por mencionar los más conocidos. La planta se utiliza para tratar desórdenes gastrointestinales, tales como el dolor de estómago y los cólicos agudos; también se utiliza para curar el reumatismo, dolores de apéndice y contra las enfermedades biliares (INI, 1994). *B. veronicifolia* se consume sola o en combinación con otras hierbas medicinales como la manzanilla, la guayaba, el hinojo, la raíz de crameria, la hoja de San Nicolás y la hierba de San Juan, entre otras. Entre los preparados comerciales, el Estomacure es quizás el más popular y se utiliza para la cura de

desórdenes gastrointestinales y procesos inflamatorios. Este preparado, al igual que muchos otros, corrobora el hecho de que la mayoría de los productos herbolarios comercializados a nivel industrial provienen de plantas de reconocido uso en la medicina popular.

Brickellia cavanillesii (Cass.) A. Gray [Sinónimo *Brickellia squarrosa* (Cav.) B.L. Rob.] es una planta que mide de 1 a 3 metros de altura. Sus hojas en forma ovada, de color verde (alternas las superiores), opuestas, pecioladas, avado-lanceoladas, almenado-dentadas, trinervadas, casi lanosas inferiormente y de color cenizo, con algunas glándulas apenas visibles a simple vista. Sus flores son de color amarillas y están en agrupaciones en cabezuelas colgantes. Tiene tallos ásperos, velludos y rojizo (Martínez, 1989). Algunos de los sinónimos de esta especie son: *Brickellia botterii* B.L. Rob., *Brickellia rosalesia* (DC.) Benth. & Hook. f. ex Hemsl., *Brickellia squarrosa* (Cav.) B.L. Rob., *Coleosanthus cavanillesii* Cass., *Eupatorium rosalesia* DC., *Eupatorium squarrosom* Cav., y *Eupatorium squarrosom* Sessé & Moc. Se le conoce popularmente con los nombres de atansia amarga, gobernadora de Puebla, hierba del becerro y prodigiosa. Al igual que *B. veronicifolia*, se utiliza para tratar afecciones del estómago y diarrea, además para combatir la atonía secretora y motriz del aparato gastrointestinal, la gastritis y se le atribuyen propiedades vermífugas y antidiabéticas (Anuarios del IMN., 1894; Martínez, 1980; INI, 1994; Jezewski y Poss, 2002; Poss *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006). Dado que las dos especies tienen usos terapéuticos similares y se conocen con el mismo nombre es altamente factible que a lo largo de la historia se hayan usado indistintamente. Por su eficacia popular para el tratamiento de la gastritis en la actualidad la planta se comercializa ampliamente sola o en combinación con otras hierbas. Entre los preparados más conocidos se encuentran: el gastrite y el Té Hamula.

Los registros sobre los usos médicos de esta especie datan de 1894 cuando en los Anuarios del Instituto Médico Nacional fue incluida en la lista de las plantas que formaron parte de la Materia Medica Nacional bajo el nombre de *Brickellia cavanillesi*, A, Gr.

En la página 275 del tomo I se describe el trabajo de Francisco Carmona, bajo la dirección del profesor Francisco Río de la Loza quien era jefe de la Segunda sección en el Instituto Médico Nacional. Los resultados que reportan en la tesis inaugural del Sr.

Carmona remarcan que la planta carece de acción antipalúdica y no es tóxica, contiene un producto puro amargo y que, en una fórmula especial y asociada con otras especies, la uso el Dr. Urbina como tenífugo seguro.

Más tarde, en 1905, se recopila esta misma información en el tomo VII de los propios Anales, reportando además que en las zonas de Puebla y el Estado de San Luis Potosí, la planta se conoce con los nombres comunes de Prodigiosa y Yerba del Becerro. En Puebla se recomienda como febrífuga y estomacal usándose en dosis de 4 o 6 gramos de extracto de la yerba y media libra de infusión.

En los Anales del año 1907 se reporta que en el pabellón número 5 del Instituto Médico Nacional, a cargo del Dr. Loaeza, se realizaron varios ensayos clínicos de varias plantas, particularmente la evaluación de *B. cavanillesii* en dos pacientes a los cuales se les administró en dosis de 20 gotas por tres veces al día como aperitivo y eupéptico consiguiendo el primer efecto sin presentarse el segundo ya que no mejoraron de manera sensible las digestiones. En el mismo pabellón, un paciente fue tratado con 20 gotas diarias por 27 días para trastornos dispépticos encontrando un alivio moderado. Otra de las recopilaciones acerca de la información existente de esta especie se realizó en este mismo año, informándose tres sinónimos científicos (*Bulbostylis cavanillesii*, *Eupatorium squarrosus* y *Coleosanthus cavanillesii*) para la planta. También describen su amplia abundancia en el Valle de México y que la temporada de floración ocurre entre los meses de septiembre a diciembre.

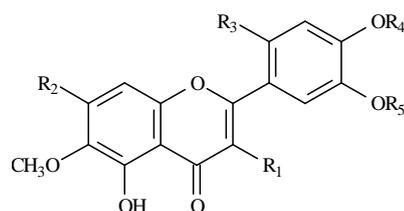
La composición química encontrada hasta ese entonces consistía de un aceite esencial, grasa, resina ácida, un glucósido llamado brickelina, materia colorante, clorofila, goma, almidón y sales minerales. La sustancia llamada brickelina cristaliza como agujas blancas sedosas, de sabor amargo y, soluble en agua y en alcohol absoluto. Los reportes de la acción fisiológica de la planta indicaron que la especie “carece de acción general” y no posee propiedades tóxicas; la ingestión de una decocción por vía oral produce un sabor amargo no desagradable y aumenta la salivación, la secreción de jugo gástrico y esto a su vez produce apetito y movimientos del estómago. También se describe como antiséptico

disminuyendo la actividad de las fermentaciones pútridas del estómago. Finalmente indican que no tiene acción tenífuga (Anales del IMN, 1907, 246,286, 303-304).

Otros ensayos clínicos realizados de esta especie se describen en 1908 e incluyen la administración del extracto fluido en un convaleciente de pleuresía obteniendo a los 24 días mediano alivio; el tratamiento de otro paciente con gastroenteritis alcohólica aliviada, se trató con 10 gotas de extracto fluido como aperitivo, sin obtener resultados concluyentes (Anales IMN, 1908; 126, 195). Por último, en 1912 el extracto de la planta en dosis de 0.5 g en 24 horas administrado en forma pilular dos o tres horas antes de las principales comidas se mostró eficaz como tónico para combatir la atonía gástrica, consecutiva a dispepsia hipoclorhídrica y gastroéctasis. La gastralgia fue uno de los síntomas que mejoro notablemente (Anales IMN, 1912; 118).

2.2.2. Estudios químicos y farmacológicos

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie *B. veronicifolia* posee una gran diversidad de constituyentes. Los principales metabolitos secundarios aislados de esta planta pertenecen a las categorías de los triterpenoides, los diterpenoides de tipo labdano (Calderón *et al.*, 1983) y los flavonoides, en su mayoría 6-metoxiflavonoides (Inuma *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1980 y 1984), derivados del ácido 2-hidroxibenzoico, benzoatos de bencilo y sesquiterpenoides, principalmente camazuleno y germacrano D (Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Rivero Cruz *et al.*, 2007). En el primer estudio realizado por Roberts y colaboradores (1980) fue posible aislar trece flavonoides (**Figura 1**), incluyendo dos heterósidos y cuatro sulfatos, a partir de un extracto metanólico de la especie. Los compuestos se caracterizaron por métodos químicos y espectroscópicos e incluyen: la artemetina (**1**), la casticina (**2**), la eupatina (**3**), la eupatolitina (**4**), la 3,6,7-trimetoxiquercetagetina (**5**), el digalactósido de la veronicafolina (**6**), el galactósido de la eupatolitina (**7**) y los sulfatos de eupatina (**8**), eupatolitina (**9**), patuletina (**10**) y veronicafolina (**11**). En 1984, estos mismos autores describen la presencia de una flavona novedosa, la brickelina (**12**), en un material vegetal que se recolectó en el estado de Nuevo León, México (Roberts *et al.*, 1984).



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(1)	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
(2)	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃
(3)	H	CH ₃	H	H	CH ₃
(4)	H	CH ₃	H	H	H
(5)	OCH ₃	CH ₃	H	H	H
(6)	Gal-gal	CH ₃	H	CH ₃	H
(7)	Gal	CH ₃	H	H	H
(8)	SO ₃ ⁻	CH ₃	H	H	CH ₃
(9)	SO ₃ ⁻	CH ₃	H	H	H
(10)	SO ₃ ⁻	H	H	H	H
(11)	SO ₃ ⁻	CH ₃	H	CH ₃	H
(12)	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃

Figura 1. Flavonoides aislados de *B. veronicifolia*

Posteriormente, Calderón y colaboradores (1983) investigaron un material recolectado en Ciudad Universitaria, México, D. F. En esta oportunidad se aislaron y caracterizaron los ácidos diterpénicos 2 α ,3 α -dihidroxicatívico (**13**) y 2 α -hidroxi-3 α (2-hidroxi-2-metil-butiriloxi) catívico (**14**). En este mismo análisis aislaron por vez primera de esta especie los triterpenoides taraxasterol (**15**) y acetato de taraxasterilo (**16**) (**Figura 2**).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se realizó la investigación del extracto orgánico y del aceite esencial derivados de esta especie con la finalidad de iniciar el establecimiento de los criterios de eficacia, calidad e inocuidad de su droga cruda para integrar su monografía tipo Organización Mundial de la Salud (OMS).

Los estudios toxicológicos preliminares indicaron que la planta no es mutagénica que carece de efecto tóxico agudo de acuerdo con los criterios de Lorke (Déciga-Campos *et al.*, 2007). Posteriormente, se comprobó mediante la experimentación farmacológica apropiada que el extracto íntegro y el aceite esencial de la especie poseen propiedades espasmolíticas

ya que indujeron la relajación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de manera dependiente de la concentración.

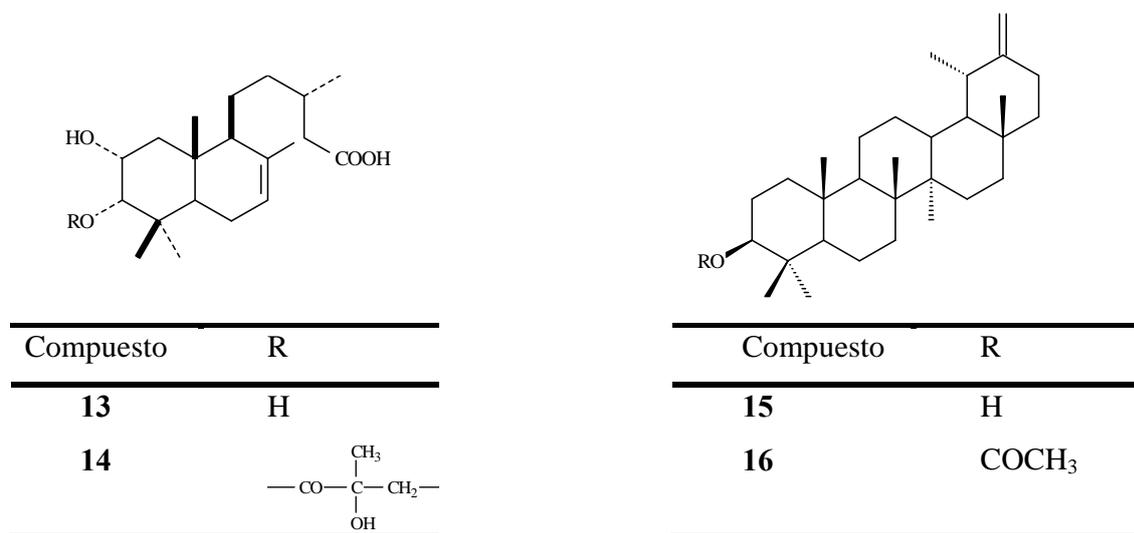


Figura 2. Terpenoides aislados de *B. veronicifolia*

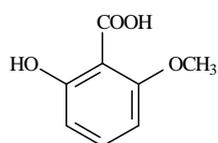
El estudio fitoquímico biodirigido del extracto espasmolítico condujo al aislamiento y la purificación de 16 metabolitos secundarios, tres de los cuales fueron descritos por vez primera y doce fueron novedosos en la especie. Los compuestos aislados fueron caracterizados como: ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**18**), ácido 2-metoxibenzoico (**19**), β -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**), β -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**), 3'- β -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**), 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**25**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**26**), 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**27**), 2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo (**28**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), acetato de taraxasterilo (**16**), camazuleno (**31**) y germacrano D (**32**) (Rivero-Cruz *et al.*, 2005).

Por otro lado, el análisis por CG-EM del aceite esencial espasmolítico de diferentes lotes de la planta permitió corroborar que los constituyentes mayoritarios de la esencia preparada por hidrodestilación fueron los metabolitos **24**, **30**, **31**, **32**, así como el β -eudesmol (**33**) y el β -cariofileno (**34**). El β -cariofileno, el germacrano D y el biciclogermacrano (**35**) son los constituyentes predominantes en las esencias (Rivero-Cruz *et al.*, 2006).

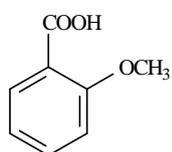
Los benzoatos de bencilo caracterizados constituyeron los principios espasmolíticos más potentes de la planta. El rango de las concentraciones efectivas medias (CI_{50}) determinadas para estos compuestos oscilaron entre 1.49-4.96 μ M. Su efecto fue comparable con el de la papaverina ($CI_{50} = 4.23 \pm 0.68$), agente espasmolítico inespecífico utilizado como control positivo. Estudios acerca del modo de acción de los principios espasmolíticos aislados sobre el complejo Ca^{2+} -CaM, revelaron que los compuestos **24**, **25** y **30** actúan como antagonistas competitivos de la CaM (Rivero-Cruz *et al.*, 2007).

En relación a los parámetros de calidad, se estableció un método analítico conducente a cuantificar los principios activos presentes en la esencia utilizando la RMN 1H como técnica analítica. El método analítico propuesto para cuantificar 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), camazuleno (**31**), germacrano D (**32**), biciclogermacrano (**35**), β -eudesmol (**33**) y β -cariofileno (**34**) resultó ser lineal, específico y exacto (Rivero-Cruz *et al.*, 2006).

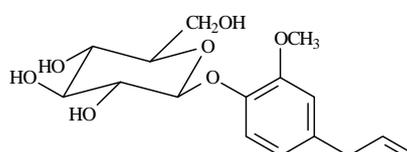
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del extracto orgánico y el aceite esencial de *B. veronicifolia*



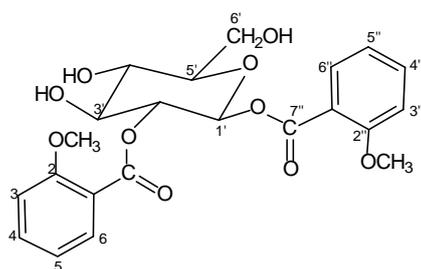
18



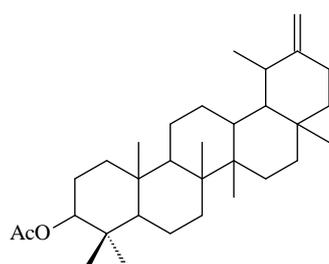
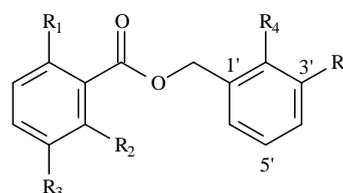
19



20

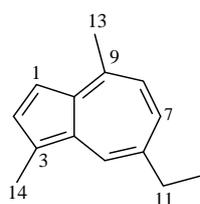


21

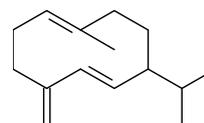


16

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
22	OMe	OMe	H	H	OH
23	OMe	OMe	H	H	β -D-glucosiloxi
24	OMe	OMe	H	H	H
25	OH	OMe	H	H	OMe
26	OH	OMe	H	H	H
27	OH	OMe	OMe	H	H
28	OMe	OMe	OMe	H	H
29	OMe	OMe	H	H	OMe
30	OH	H	H	OMe	H



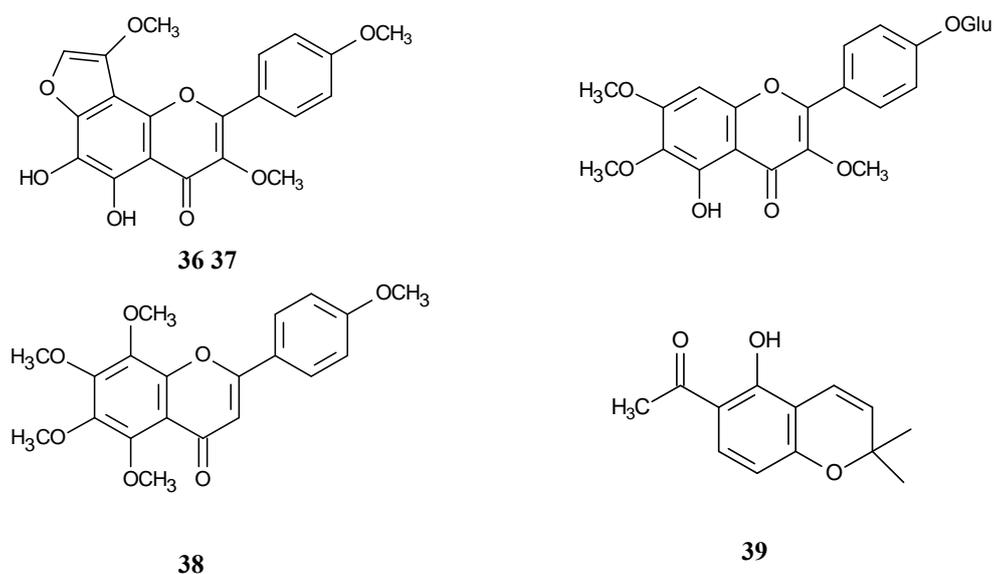
31



32

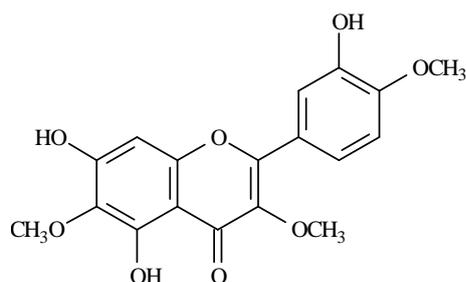
En el caso de *Brickellia cavanillesii*, una investigación química realizada cuatro décadas atrás permitió el aislamiento de las flavonas atanasina (**36**), pendulitina (**37**) y 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona (**38**) (Flores y Herran, 1960). Asimismo, Rodríguez y colaboradores describieron la presencia del 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**39**) en la planta (Rodríguez-López *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Metabolitos secundarios de tipo flavonoide aislados de la especie *B. cavanillesii*



Además del trabajo de Rivero Cruz *et al.*, Pérez y colaboradores realizaron el fraccionamiento biodirigido de un extracto hexánico hipoglucemiante de *B. veronicifolia*, recolectada en el estado de Guerrero; este estudio condujo al aislamiento de la 5, 7, 3'-trihidroxi-3, 6, 4'-trimetoxiflavona, la centaureidina (**17**). El flavonoide no presentó efecto hipoglucemiante significativo en ratones normoglucémicos y diabéticos. La diferencia en la actividad del extracto hexánico, que disminuyó los niveles de glucosa en un 72 % a la dosis de 300 mg/Kg en 24 h, y de la flavona **17**, que tan sólo ocasionó un decremento de los niveles de la glucosa en un 29 % a la dosis de 50 mg/Kg en 4.5 h, indica que este no es el principio activo hipoglucemiante de la planta. La centaureidina (**17**), sin embargo, como otros flavonoides, es un excelente captador de radicales libres por lo que los autores le atribuyen propiedades antioxidantes (Pérez *et al.*, 1998, 2000 y 2004).

Los investigadores concluyen que el efecto hipoglucemiante comprobado experimentalmente corrobora el uso popular de *B. veronicaefolia* como un agente antidiabético. La literatura farmacológica describe también la actividad antibiótica de un extracto etanólico de la especie contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella lutea*, *Bacillus subtilis* y *Shigella dysenteriae* (Argueta *et al.*, 1994).



(17)

Figura 3. Flavonoide hipoglicemiante centaureidiana aislado de *B. veronicifolia*

Cabe destacar, que *B. veronicaefolia* es de utilidad como un agente fitorremediador ya que es capaz de transportar el arsénico del suelo a las partes aéreas de la planta (Flores-Tavizon *et al.*, 2003).

En el caso de *B. cavanillesii*, Aguirre-Crespo y colaboradores (2005) reportan las propiedades vaso-relajantes de un extracto metanólico preparado a partir de las partes aéreas de la especie utilizando el modelo de anillos de aorta aislada de rata.

2.3. El sistema gastrointestinal (GI) y sus principales padecimientos.

El tracto gastrointestinal, también llamado tracto digestivo o canal alimentario, es el sistema de órganos que se encarga de extraer la energía y los nutrientes de los alimentos y desechar los remanentes no digeribles por organismo. Principalmente, está conformado por la boca, la garganta, el esófago, el estómago, los intestinos delgado y grueso, el recto y el ano (**Figura 4**). Otros órganos que se incluyen en este sistema son el hígado, la vesícula biliar y el páncreas. Sus diferentes segmentos muestran grandes variaciones en cuanto a su

morfología y propiedades mecánicas musculares, por ejemplo, el esófago tiene la función de transportar rápidamente el bolo alimenticio desde la boca hasta el estómago donde la comida es almacenada por un tiempo más prolongado mientras es digerida y simultáneamente es degradada en componentes más pequeños.

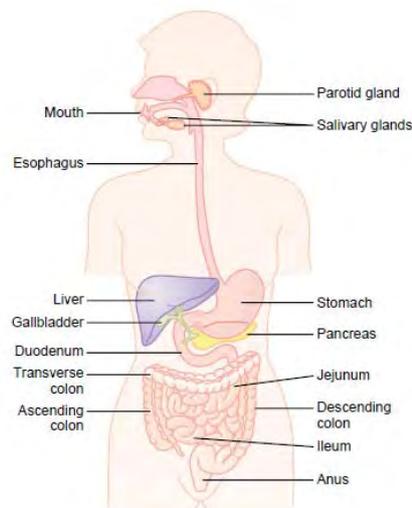


Figura 4. Esquema general del tracto gastrointestinal.

Los esfínteres del tracto GI sirven para separar al sistema en sus diferentes compartimentos. La pared del tracto GI está compuesta por 4 capas: la mucosa, submucosa, musculo y la serosa (**Figura 5**).

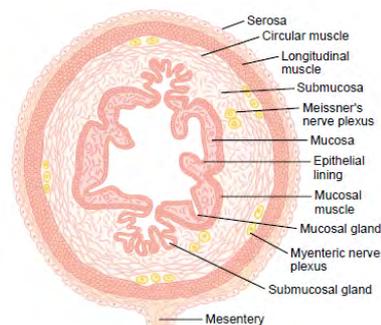


Figura 5. Esquema de las diferentes capas que constituyen al tracto gastrointestinal.

La capa muscular consiste en un estrato de músculo longitudinal externo y uno circular interno. La submucosa, rica en colágeno, y la mucosa están dentro de la capa muscular. Otra delgada capa de músculo existe a través de casi todo el tracto digestivo.

El movimiento del tracto GI se realiza con la finalidad de mezclar el contenido y moverlo a través de la superficie del estómago e intestinos donde se dará la absorción de nutrientes. El patrón de movimientos contráctiles varía de manera significativa en cada una de las partes que conforma el tracto digestivo, estos movimientos que se dan durante la digestión y absorción, son consecuencia de contracciones de las dos capas de la musculatura lisa. Las contracciones de la capa muscular longitudinal acortan la pared del estómago mientras las contracciones peristálticas de las capas musculares circulares, en contraste, producen el avance del tránsito con un pequeño mezclado del bolo alimenticio (**Figura 6**). Estas contracciones, de los dos tipos de capas musculares, ocurren al mismo tiempo (Liao *et al.*, 2009).

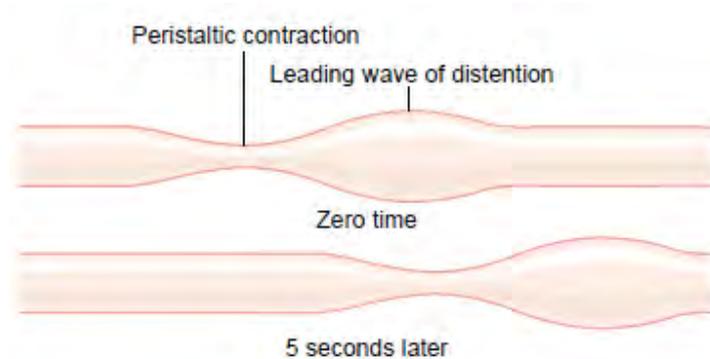


Figura 6. Movimiento peristáltico de los intestinos.

El tracto GI, al igual que otros órganos, está sujeto a sufrir varias patologías. Cada órgano que conforma al tracto digestivo pueden sufrir algún tipo de enfermedad, por ejemplo, el segmento formado por el esófago y el estómago pueden presentar esofagitis, úlceras o estenosis de esófago y estómago, dispepsia, úlcera duodenal y péptica, gastritis, congestiones, etc. Por otra parte, de los padecimientos que pueden afectar a la porción intestinal podemos mencionar a la enfermedad de Crohn, colitis, gastroenteritis, colon espástico, síndrome de vaciamiento rápido, abscesos, pólipos, entre otras. Sin embargo, algunas de ellas son las más frecuentes y para las que generalmente recibimos tratamientos farmacológicos. La dispepsia, el colon irritable, la gastritis y la diarrea son ejemplos de las patologías más recurrentes en el tracto digestivo.

Existen una gran variedad de productos para el tratamiento de enfermedades del tracto GI, cada uno será prescrito según los síntomas que presente el paciente. Sin embargo, algunos de los efectos adversos que acompañan el consumo de estos productos provocan que las personas elijan otro tipo de tratamientos como es el uso de plantas medicinales.

Algunos fármacos utilizados en la terapia para esos padecimientos incluyen los antiulcerosos como la ranitidina (antagonista de los receptores H₂), el omeprazol (inhibidor de la bomba de protones), sales de magnesio y aluminio (antiácidos), sales de bismuto y sucralfato (protectores de la mucosa gástrica), algunos aperitivos [dos tipos principalmente, amargos (genciana, achicoria, ajeno, lúpulo, aperitivos quinados) y los no amargos (pizotifeno, postafeno, lisina, isoniazida, etc.), estos últimos con mayor interés farmacológico. También se utilizan con mucha frecuencia los carminativos, ejemplos de estos productos son la metoclopramida (favorece el vaciamiento gástrico), la semiticona (en caso de meteorismo y aerofagia), esta última suele combinarse con enzimas digestivas para el tratamiento de dispepsias (Rang, 2007).

2.3.1. Generalidades de la dispepsia y su tratamiento con productos naturales.

La dispepsia es un conjunto de síntomas complejos referidos al tracto superior gastrointestinal (GI). Se define como un desorden crónico acompañado de dolor y malestar, episódicos o persistentes, del tracto GI superior, que están relacionados con la alimentación y que tanto el médico como paciente los atribuyen a un desorden del tracto digestivo proximal. Se caracteriza por una sensación de saciedad, dolor epigástrico o localizado, náuseas, eructos e inflamación del estomago (Allescher, 2006; Ford y Moayyedi, 2008).

Varias encuestas revelan que la dispepsia es un problema global y que entre el 15 y 40 % de la población de Asia y Norte América padecen diversos síntomas gastrointestinales relacionados con una condición dispéptica (Ford y Moayyedi, 2008).

Con base en el origen de la enfermedad, la dispepsia se clasifica en orgánica y funcional. En el primer caso, el padecimiento está asociado a una causa conocida, en tanto que en el segundo se desconocen las causas que lo provocan. Por lo general, las causas de la dispepsia orgánica incluyen a los medicamentos que provocan un efecto irritante local, algunos factores dietéticos como los alimentos muy grasosos, la intolerancia a la lactosa, alimentos con gran cantidad de especias. Todos ellos provocan un retardo en el vaciamiento gástrico o irritación de la mucosa y reflujo gastroesofágico (GERD). De acuerdo a los criterios de Roma III, la dispepsia funcional está definida como la presencia de síntomas que posiblemente se originaron en la región gastroduodenal, en ausencia de enfermedades orgánicas, sistémicas o metabólicas que puedan explicar los síntomas. El conjunto de síntomas complejos de una dispepsia funcional incluyen dolor epigástrico, saciedad acelerada o temprana, ardor epigástrico, eructos, náuseas y vómito. Sin embargo, Roma III propone que se consideren la saciedad temprana, el dolor y ardor epigástrico como síntomas dispépticos típicos (Mimidis y Tack, 2008).

Las causas de la dispepsia funcional aún no han sido bien establecidas, pero existe evidencia de la contribución de la susceptibilidad genética, factores infecciosos y psicológicos.

En este sentido, la medicina herbolaria tiene una gran aceptación en el tratamiento de este tipo de padecimientos. En la **Cuadro 3** se enlistan varias especies útiles para este padecimiento.

2.3.2. Gastritis, mecanismos de protección gástrica y su relación con *Helicobacter pylori*

El estómago es un órgano notable, secreta jugos que pueden digerir varios alimentos que comemos pero raramente se digiere a él mismo. En este sentido, se han realizado grandes avances en la investigación de los factores que contribuyen a la conservación de su integridad, entre ellos, un gran número de autacoides están implicados en la mediación de la resistencia del estómago al daño. Estas sustancias incluyen a las prostaglandinas,

mediadores de tipo gaseoso (óxido nítrico y ácido sulfhídrico) y neuropéptidos (péptido del gen relacionado con la calcitonina, CGRP).

Cuadro 3. Especies medicinales utilizadas en el tratamiento de la dispepsia funcional no ulcerogénica.

Angélica	<i>Angelica archangelica</i>	Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>
Anís	<i>Pimpinella anisum</i>	Cola de Caballo	<i>Equisetum arvense</i>
Alcachofa	<i>Cynara scolymus</i>	Haronga	<i>Harungana</i>
Cáscara de naranja	<i>Citrus aurantium</i>		<i>madagascariensis</i>
Cardo bendito	<i>Cnicus benedictus</i>	Marrubio	<i>Marrubium vulgare</i>
Haba de pantano	<i>Menyanthes trifolia</i>	Enebro	<i>Juniper communis</i>
Boldo	<i>Peumus boldus</i>	Toronjil	<i>Melissa officinalis</i>
Comino de prado o alcaravea	<i>Carum carvi</i>	Ulmaria o dulce del prado	<i>Filipendula ulmaria</i>
Cardamomo	<i>Elettaria cardamomum</i>	Cardo mariano o de leche	<i>Silybum marianum</i>
Centaurea menor	<i>Centaurium minus</i>		
Achicoria	<i>Cichorium intybus</i>	Muérdago	<i>Viscum album</i>
Quina	<i>Cinchona pubescens</i>	Uva de Oregón	<i>Mahonia aquifolium</i>
Canela	<i>Cinnamomum verum</i>	Durazno	<i>Prunus persica</i>
Clavo de olor	<i>Syzygium aromaticum</i>	Menta	<i>Mentha piperita</i>
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Rábano	<i>Raphanus sativus</i>
Diente de León	<i>Taraxacum officinale</i>	Romero	<i>Rosemarinus officinalis</i>
Garra del diablo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Salvia	<i>Salvia officinalis</i>
		Siempre viva	<i>Helichrysum arenarium</i>
Eneldo	<i>Anethum graveolens</i>	Hierba de San Juan	<i>Hypericum perforatum</i>
Helenio	<i>Inula helenium</i>	Anís estrellado	<i>Illicium verum</i>
Fenogreco	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>
		Cúrcuma	<i>Curcuma longa</i>
Galangal	<i>Alpinia officinarium</i>	Ajenjo	<i>Artemisia absinthium</i>
Genciana	<i>Gentiana lutea</i>	Milenrama	<i>Achillea millefolium</i>

La integridad de la mucosa gástrica requiere de la continua generación de prostaglandina E₂ (PGE₂) y la prostaciclina (PGI₂). La inhibición de su síntesis resulta en la reducción del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica y el daño a esta. Por otra parte, la liberación local de neuropéptidos (CGRP) contribuye también al mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, un agotamiento en estos neuropéptidos de las terminales de los nervios aferentes primarios resulta en daño a la mucosa inducida por varios agentes. Por último, varios autores sugieren que el NO endógeno colabora también en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (Gyres, 2005; Wallace, 2008).

Además de la liberación de mediadores vasoactivos, el sistema nervioso central (CNS) juega un papel importante en la regulación de la función gástrica; la participación

del SNC en el proceso de ulceración gastrointestinal se sugirió por vez primera a finales del siglo XIX y principios del XX. De tal forma que Schiff, Rokitansky y Cushing encontraron que pacientes con lesiones intracraneales o tumores con frecuencia desarrollaban hemorragias gastrointestinales. Otros autores encontraron que lesiones en casi cualquier lugar del SNC pueden estar asociadas con patologías gástricas. En 1932, Cushing sugirió que tales ulceraciones pueden ser resultado de una hiperactividad vagal e hipersecreción de ácidos gástricos.

El SNC y numerosos neuropéptidos como la hormona liberadora de tiotropina (TRH), adrenomedulina, el neuropéptido Y pueden estimular procesos defensivos de la mucosa. Los dos últimos péptidos antes indicados han sido identificados tanto en el cerebro como en el tracto gastrointestinal e inducen un incremento en la resistencia al daño de la mucosa en el fluido cerebroespinal o microinyectados directamente a diferentes áreas del cerebro.

Recientemente, se demostró que agentes vasoactivos están involucrados no solamente en la defensa de la mucosa contra el daño gástrico agudo sino también en el proceso de curación de las úlceras. Así, el NO es benéfico en el proceso de curación de las úlceras y las prostaglandinas PGE₂ y PGI₂ estimulan la angiogénesis en la mucosa gástrica dañada (Gyres, 2005).

Se denomina úlcera gástrica al segmento escoriado o discontinuo de la mucosa gastrointestinal que penetra a través de la capa muscular de la mucosa (Guth, 1973; Wyngaarde, 1985). El proceso de ulceración se da por una alteración en el balance normal de la mucosa inducido por factores agresivos o por la disminución en la resistencia de esta (Borrelli e Izzo, 2000). De acuerdo a su localización, las úlceras se clasifican en duodenales y gástricas, sin embargo también se pueden encontrar lesiones pépticas en el extremo inferior del esófago, donde frecuentemente se produce reflujo del jugo gástrico (Sodeman y Sodeman, 1984; IMSS, 2004).

La patogénesis de la úlcera gástrica aún no está bien determinada, se trata de un padecimiento multifactorial donde diversos factores tales como un estilo de vida estresante,

consumo de alcohol, uso de analgésicos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos así como fármacos que estimulan la secreción de ácido gástrico y pepsina, infección de *Helicobacter pylori*, fumar, un estatus socioeconómico bajo además de una historia familiar de la enfermedad, todas las anteriores representan factores de riesgo significativo que pueden contribuir al incremento de daño gástrico (Samara de Lira Mota *et al.*, 2009).

El desarrollo de la úlcera péptica es el resultado de una necrosis y la digestión del revestimiento de una zona localizada del tubo digestivo, la cual pierde su capa de moco y queda susceptible a la posterior digestión por los ácidos gástricos. Frecuentemente estas úlceras logran dañar algunos vasos sanguíneos causando hemorragias e inclusive pueden atravesar por completo la pared intestinal provocando el daño a órganos vecinos o perforando la cavidad peritoneal (Sodeman y Sodeman, 1984). Las úlceras duodenales son causadas por la secreción excesiva de ácido y pepsina de las células gástricas y que no logran ser amortiguadas por el revestimiento de la mucosa gástrica, esto último puede explicarse por las siguientes causas (Lam, 1984; Spiro, 1987):

- Calidad en la secreción de la mucosa gástrica
- Disminución de la secreción de moco
- Incapacidad de los mecanismos de retroalimentación duodeno-gástrico normales para limitar la magnitud del vaciamiento gástrico hacia el duodeno
- Incapacidad de los mecanismos de retroalimentación de secretina pancreática y secretina-conductos biliares para producir jugo pancreático y bilis lo suficientemente alcalino como para neutralizar el jugo gástrico a su entrada en el duodeno.

El tratamiento de la sintomatología relacionada con las úlceras gástricas o gastritis con plantas medicinales también es muy común en la medicina tradicional en todo el mundo (Schmeda-Hirschmann y Yesilada, 2005). Los extractos de plantas medicinales son algunas de las fuentes más atractivas de nuevos fármacos para este tipo de padecimientos ya que han demostrado ser muy prometedores en base a los resultados obtenidos. En América latina varios grupos de investigación han realizado un trabajo muy interesante en

la búsqueda de especies medicinales para el tratamiento de los síntomas relacionados con la gastritis. Falcão y colaboradores, en una revisión reciente, elaboraron una lista de 58 especies medicinales, las cuales han demostrado mediante la experimentación farmacológica adecuada, sus propiedades gastroprotectoras. Estas especies están distribuidas en 37 familias de las que destacan: la Asteraceae, Fabaceae, Celastraceae y Turneraceae. De los nueve países que desarrollan investigación en esta área, debido a su gran diversidad vegetal, Brasil es quién realiza el 67 % de la búsqueda de nuevos constituyentes activos. Destacan por sus propiedades antiulcerogénicas las especies *Baccharis illinita*, *Austroplenckia populnea*, *Quassia amara*, *Rhizophora mangle* y *Syngonanthus arthrotricus* (Falcão *et al.*, 2008).

Adicionalmente, varias especies vegetales han sido usadas de manera extensa en el tratamiento de las úlceras gástricas y su eficacia ha sido ampliamente documentada, tales son los casos del gel de *Aloe vera*, *Glycyrrhiza glabra* y algunas especies de *Capsicum*.

En el caso de *Glycyrrhiza glabra*, ha sido utilizada de manera amplia por sus propiedades anti-ulcerosas. El principal constituyente de esta especie es el ácido glicirricínico, un triterpenoide de tipo saponina, los cuales han mostrado protección contra úlceras. La evaluación de las sales de potasio y calcio de este triterpenoide mostraron la inhibición de úlceras en ratas y también previno la formación de estas por la administración de ácido acético. La fracción libre de glicirricína mostró ser efectivo para tratar úlceras gástricas mediante la inhibición en la secreción de jugo gástrico y su eficacia clínica ha sido confirmada (Takagi *et al.*, 1969). Saitoh y cols aislaron isoflavonoides y chalconas de la fracción libre de glicirricína, los cuales podrían contribuir a la actividad anti-ulcerosas de esta especie (Saitoh *et al.*, 1976). Un derivado importante producto de la hidrólisis del ácido glicirricínico es la carbenoxolona. Varios mecanismos de acción se han propuesto para explicar su eficacia como agente anti-ulceroso. Se ha observado que estimula la producción de moco gástrico (Bickel y Kauffman, 1981), aumenta la velocidad de incorporación de varios azúcares a glicoproteínas de la mucosa gástrica (Johnson *et al.*, 1975), promueve la proliferación celular de la mucosa estomacal (Van Huis y Krames, 1981), inhibe la degradación y aumenta liberación de prostaglandinas, especialmente la

PGE₂ (Peskar, 1980; Aguwa y Okunji, 1986), entre otros. En el **Cuadro 4** se presentan algunas especies vegetales con propiedades anti-ulcerosas comprobadas (Borrelli e Izzo, 2000).

Cuadro 4. Plantas con actividad anti-ulcerosas y sus estudios farmacológicos.

Especie	Parte usada	Tipo de extracto	Modelo farmacológico	Referencia
<i>Alpinia galanga</i>	Rizoma Et	anol	Estrés, etanol, HCl, ligación del píloro	Al-Yahya <i>et al.</i> , 1990
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Corteza	Metanol	Etanol	Navarrete <i>et al.</i> , 1998
<i>Anchusa strigosa</i>	Raíz	Acuoso	Etanol	Disi <i>et al.</i> , 1998
<i>Artemisia herba-alba</i>	Hojas	Acuoso	Etanol	Gharzouli <i>et al.</i> , 1999
<i>Astronium urundeva</i>	Corteza	Acuoso	Aspirina, estrés e histamina	Rao <i>et al.</i> , 1987
<i>Azadirachta indica</i>	Hojas	Acuoso	Estrés, etanol	Garg <i>et al.</i> , 1993
<i>Baccharis triptera</i>	Ramas pequeñas	Acuoso	Ligadura de píloro, estrés, indometacina	Gamberini <i>et al.</i> , 1991
<i>Bauhinia racemosa</i>	Flores	Metanol	Aspirina	Akhtar and Ahmad, 1995
<i>Camelia sinensis</i>	Hojas	Acuoso	Etanol, aspirina, indometacina, ligación de píloro	Bacchi <i>et al.</i> , 1995 Maity <i>et al.</i> , 1995
<i>Curcuma longa</i>	Rizoma	Etanol	Etanol, HCl, indometacina, estrés	Attaguile <i>et al.</i> , 1995
<i>Diodia sarmentosa</i>	Planta completa	Etanol	Aspirina, ligadura de píloro	Akah <i>et al.</i> , 1998
<i>Eremomastax speciosa</i>	Hojas	Acuoso	Etanol, HCl, ligadura de píloro	Tan <i>et al.</i> , 1996
<i>Laurus nobilis</i>	Semillas	Acuoso, aceite esencial	Etanol Aff	i <i>et al.</i> , 1997
<i>Microgramma squamulosa</i>	Rizoma	Etanol, acuoso, crudo	Estrés, etanol, HCl, ácido acético	Suffresini <i>et al.</i> , 1999
<i>Punica gratum</i>	Cáscara	Acuoso	Etanol	Gharzouli <i>et al.</i> , 1999
<i>Quercus ilex</i>	Raíz	Acuoso	Etanol	Gharzouli <i>et al.</i> , 1999
<i>Saussurea lappa</i>	Raíz	Acetona	Estrés	Yamahara <i>et al.</i> , 1985

*Tomado y modificado de Borrelli e Izzo, 2000.

En nuestro país, dos especies vegetales han sido estudiadas de manera exhaustiva, *Hippocratea excelsa* y *Amphipterygium adstringens*. Ambas especies cuentan con reportes en las nuestras prácticas médicas populares (Navarrete *et al.*, 1998; 2002).

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, de forma helicoidal o en espiral que vive en el estómago y crece en medios enriquecidos bajo condiciones microaerobias (90% N₂, 5% CO₂ y 5% O₂). Su presencia en el tracto GI se determina mediante la identificación histopatológica, cultivo y la caracterización molecular de la bacteria en una biopsia del tejido estomacal. Otro método, no invasivo, para detectar la bacteria, de tipo respirométrico, consiste en la ingestión de urea marcada con ¹³C y la medición de ¹³CO₂ en el aire expelido. También pueden ser de utilidad pruebas inmunológicas buscando anticuerpos en pruebas de ELISA o Western Blott.

La infección con *H. pylori* está asociado con un gran número de enfermedades incluyendo úlceras (estomacales y duodenales) y ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, únicamente una pequeña fracción de personas infectadas experimenta de manera notable los síntomas, por esta razón el diagnóstico de la infección es muy lento cuando se compara con el número de personas que actualmente están infectadas (Kayser *et al.*, 2005; Fleming, 2007).

Numerosos estudios han tratado de evaluar la incidencia y prevalencia de la infección de *H. pylori*, su forma de transmisión y los factores de riesgo que contribuyen a que se dé dicha invasión al tejido estomacal. La incidencia anual de la enfermedad, de acuerdo a tres estudios en adultos de países desarrollados, se estima entre 0.3 y 0.5 % por año. Aunque la prevalencia varía mucho, dependiendo de la localización del grupo en estudio y de las características de la población, en general incrementa con la edad y un status económico bajo durante la niñez del paciente (Hardiny y Wright, 2002).

Helicobacter es una bacteria exclusiva de humanos, se transmite por la vía fecal-oral y oral-oral; infecta la mucosa estomacal mediante sus factores patogénicos que incluyen: una motilidad pronunciada para una eficiente búsqueda de las células blanco, una gran adhesión a la superficie de las células epiteliales del estómago, la enzima ureasa que se encarga de

liberar amonio a partir de urea para facilitar su supervivencia en condiciones altamente acidas y, almacenamiento de citotoxinas que destruyen las células epiteliales. De manera adicional, el consumo de alcohol y tabaco, la dieta, el estado nutricional del individuo y la predisposición genética a la infección son otros factores que predisponen a la infección por *H. pylori*.

Una vez que la bacteria infecta el tejido estomacal, se presenta una gastritis aguda y la enfermedad puede o no cursar con la siguiente sintomatología:

- Una gastritis crónica moderada que puede persistir por años e incluso décadas y en ocasiones asintomática.
- Ulceración duodenal y en ocasiones también gástrica.
- Gastritis atrófica crónica a partir de la cual se podría desarrollarse un adenocarcinoma gástrico.
- Raramente linfomas de células B de la mucosa gástrica (MALT).

El tratamiento farmacológico recomendado para la erradicación de la bacteria es una combinación triple de omeprazol (inhibidor de la bomba de protones), metronidazol y claritromicina durante siete días. La terapia es satisfactoria en el 90 % de los casos (Kayser *et al.*, 2005; Fleming, 2007). Sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos para erradicar al microorganismo en ocasiones lleva a producir problemas con la resistencia a este tipo de fármacos. De manera adicional, la aparición de efectos adversos causados por fármacos antibacterianos podría resultar en la necesidad de detener la terapia de erradicación aún si el propósito no ha sido logrado. Por esto y otros motivos, existe un alta demanda de nuevas terapias que brinden la misma o la mejor eficacia que los antibióticos tradicionales pero además que presenten efectos secundarios reducidos (Castillo-Juárez *et al.*, 2007).



Figura 7. Micrografía electrónica de la bacteria gram negativa *Helicobacter pylori* (en azul) encontrada en el estómago (Tomada de Fleming, S; *Deadly Diseases and Epidemics. Helicobacter pylori*)

Los recursos vegetales utilizados en las prácticas médicas alternativas han mostrado ser una excelente opción para la búsqueda de nuevos agentes para la erradicación de este tipo de microorganismo y el tratamiento de los síntomas relacionados con la infección de este. Varios estudios han enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de estos agentes y, en nuestro país, con una gran diversidad en especies vegetales con usos medicinales, también cuenta con estos grupos de investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes potenciales para la erradicación de esta bacteria (Castillo-Juárez *et al.*, 2009).

2.3.3. Generalidades sobre la analgesia

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 varía 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”.

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 8** y son: la transducción, transmisión, modulación y percepción.

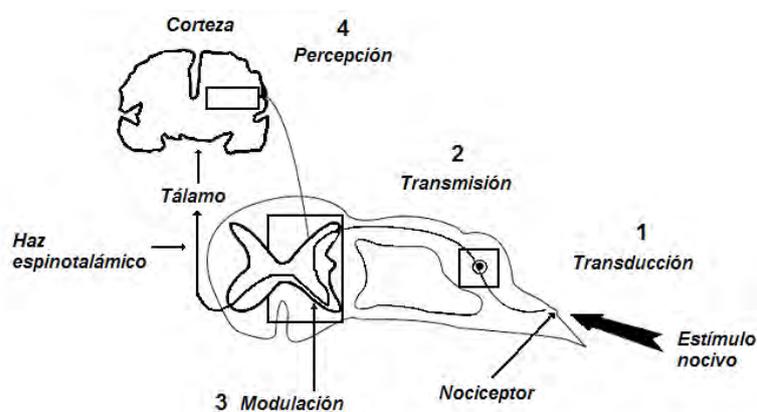


Figura 8. Procesos fisiológicos que participan en la percepción del dolor.

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 9**). 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 δ , (iii) Fibras A β .

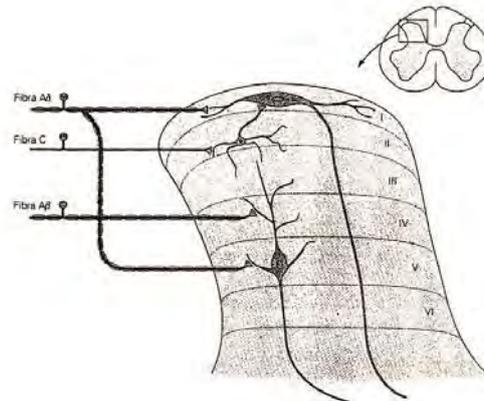


Figura 9. Clasificación de las fibras nociceptivas encargadas de la transducción y la transmisión de los estímulos generadores de dolor.

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 5**.

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.

Cuadro 5 . Mediadores liberados a partir de las fibras periféricas que activan los nociceptores periféricos.

MEDIADOR M	ECANISMO HIPERALGÉSICO	REFERENCIA
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 Millan, 1999
Prostaglandinas	Las prostaglandinas de la serie E ₂ e I ₂ sensibilizan a los nociceptores periféricos. Las Prostaglandinas E ₂ actúan sobre sus receptores EP ₁ -EP ₄ 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 ⁺ en la neuronas sensoriales que liberan la sustancia P.	Ferreira y Nakamura, 1979 Nicol <i>et al.</i> , 1992
Serotonina	Actúa sobre los receptores 5-HT ₂ acoplados a proteínas G ocasionando el cierre de los canales de K ⁺ 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 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 prostanooides proinflamatorios), además también produce hiperalgesia por el aumento de GMPc.	Salvemini <i>et al.</i> , 1993 Duarte y Ferreira, 1992
Adrenalina y Noradrenalina	Estas catecolaminas estimulan las fibras aferentes. En axones aferentes dañados se encontró un aumento en los receptores α ₂ – adrenérgicos.	Sato y Perl, 1991
Canales de Na ⁺ , K ⁺ y Ca ⁺⁺	Cuando hay daño en los axones y un incremento de los mediadores inflamatorios se incrementa la conductancia del Na ⁺ y Ca ⁺⁺ y los canales de K ⁺ se cierran. Estos eventos contribuyen a la excitabilidad de la neurona.	Devor <i>et al.</i> , 1993 Dolphin, 1990 Weinreich y Wonderlin, 1990

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 rafe 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 β -endorfinas); la proencefalina (precursor de las encefalinas) y la prodinorfina (precursor de dinorfina y péptidos relacionados); estos actúan en receptores específicos opioides μ , δ y κ (Gaveriaux-Ruff y Kieffer, 1999). En la SGPA abundan los receptores opioides de tipo μ ; 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_{1B} y 5HT₃ 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 α_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 β); 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 mielínico. Así pues, el nociceptor tiene efectos directos e indirectos sobre la neurona de proyección (**Figura 10**).

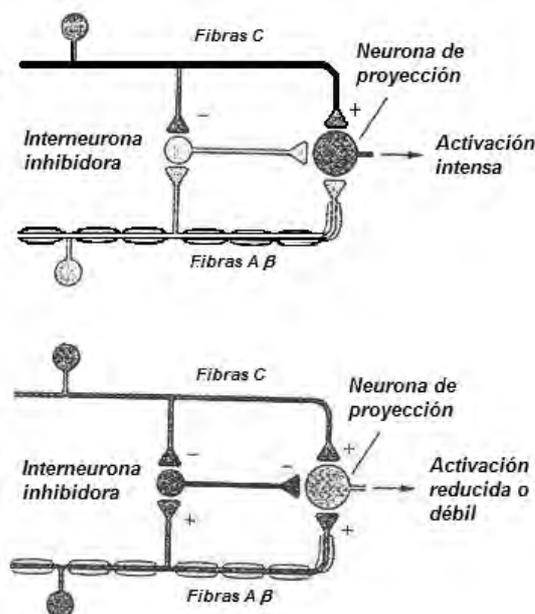


Figura 10. Teoría del control regulado, uno de los mecanismos para la modulación del dolor.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPOTESIS

Este trabajo se realizó de acuerdo a los lineamientos de la OMS. Además, es factible formular algunas hipótesis de trabajo, mismas que se indican a continuación:

- Los usos populares de la especie *B. cavanillesii* para el tratamiento de padecimiento del colon y la dispepsia asociada o no a la gastritis sugieren la presencia en la planta de principios antiespasmódicos, gastroprotectores y analgésicos, entre otros.
- Los usos populares de la especie *B. cavanillesii* para el tratamiento de la diabetes sugieren la presencia en la planta de principios hipoglucemiantes y/o antihiper glucémicos
- Los usos populares de *B. veronicifolia* sugieren que, además de principios espasmolíticos, la especie puede contener compuestos analgésicos y antidiabéticos.
- Sí las especies *B. cavanillesii* y *B. veronicifolia* son filogenéticamente distintas es probable que además de diferencias anatómicas y morfológicas presenten algún compuesto marcador y que las mezclas complejas de productos que de ellas se obtengan presenten perfiles cromatográficos distintos que permitan diferenciarlas químicamente.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivos Generales

- Establecer los parámetros de eficacia, inocuidad y calidad de la especie *B. cavanillesii* con la finalidad de establecer sus monografía tipo OMS y farmacopeica.
- Completar las pruebas de eficacia de *B. veronicifolia* mediante el estudio de sus propiedades antidiabéticas y analgésicas potenciales con la finalidad de completar su monografía de tipo OMS.

3.2.2. Objetivos particulares

- Determinar el potencial antidiabético de las dos especies de *Brickellia* objetos de estudio mediante la realización de estudios agudos y de tolerancia a la glucosa en ratas.
- Determinar el potencial analgésico de las dos especies de *Brickellia* objetos de estudio mediante los ensayos de la placa caliente y estiramiento abdominal en roedores.
- Corroborar el potencial espasmolítico de *B. cavanillesii in vivo* mediante la valoración de sus extractos y aceite esencial sobre el tránsito intestinal en ratones.
- Establecer el potencial gastroprotector de las dos especies de *Brickellia* utilizando el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto en ratas.
- Evaluar el efecto anti-*Helicobacter pylori in vitro* de los extractos y compuestos de la especie *B. cavanillesii*.
- Establecer los parámetros de identidad de la droga cruda *B. cavanillesii* mediante el aislamiento de los compuestos marcadores y establecimiento de perfiles

cromatográficos. Esta actividad permitirá distinguir las dos especies de *Brickellia* analizadas en este estudio.

- Establecer la inocuidad preliminar de las dos especies de *Brickellia* mediante la determinación de la toxicidad aguda de sus extractos.
- Establecer una prueba de composición que permita cuantificar el contenido de principios activos y/o marcadores de *B. cavanillesii*. Esta actividad facilitará el control de calidad de la especie y el desarrollo de preparados estandarizados a base de la planta.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

Los tres lotes del material vegetal (partes aéreas) de la especie medicinal *B. cavanillesii* utilizadas en este trabajo se recolectaron en los siguientes lugares: los lotes 1 y 2 (Voucher: B&L34567, 34572) en los municipios de Ecatzingo y San Miguel Atlautla, en el Estado de México. El material del lote 3 (Voucher: B&L 34570) se obtuvo en el municipio de Yecapixtla en el Estado de Morelos. En todos los casos el material se recolectó en Enero de 2006.

El material vegetal de *B. veronicifolia* fue obtenido de la colecta realizada en la localidad de la Soledad, Municipio de Aculco en el Estado de México (Voucher: BRC-1).

La clasificación botánica de ambas especies estuvo a cargo del Dr. Robert Bye Boettler, investigador del Instituto de Biología, UNAM. Ejemplares de referencia están depositados en la colección etnobotánica del Herbario Nacional. (MEXU) del Jardín Botánico del mismo Instituto. El proceso de desecación de las plantas se realizó a temperatura ambiente, posteriormente se fragmentaron en un molino de cuchillas Wiley Modelo 4.

4.1.1. Preparación de los extractos orgánico, acuoso y aceite esencial a partir de *B. cavanillesii*

- i. Extracto Orgánico (BC-EO), se preparó a partir de 5 kg de material vegetal mediante un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). El extracto se concentró con un rota-evaporador hasta sequedad para obtener 346.5 g.
- ii. La preparación del acetite esencial (BC-AE) se realizó por un proceso de hidrodestilación a partir de 100 gramos del material vegetal seco y molido. El aceite se extrajo de un litro del destilado mediante una partición con CH_2Cl_2 . Al eliminar el disolvente se obtuvo un líquido viscoso amarillo. Este proceso se repitió por tres veces. Los rendimientos obtenidos fueron semejantes, (497.9, 459.1 y 463.3 mg).

- iii. La infusión se preparó (BC-I) a partir de las partes aéreas de la especie. Para ello: 10 gramos del material vegetal seco y molido se colocaron en un matraz y se le adicionaron 250 mL de agua hirviendo, la mezcla se dejó reposar por 30 minutos. Al cabo de tiempo se filtro por gravedad para separar el material vegetal. La infusión se sometió a particiones sucesivas con CH_2Cl_2 y acetato de etilo. Las fases orgánicas resultantes en cada caso se concentraron a sequedad y se pesaron los residuos.

4.1.2. Preparación del extracto orgánico y el aceite esencial a partir de las partes aéreas de *B veronicifolia*

El extracto orgánico (BV-EO), se preparó mediante un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). El disolvente se eliminó en un rota-evaporador hasta sequedad para obtener el extracto seco.

El aceite esencial (BV-AE), se preparó por un proceso de hidrodestilación a partir de 100 gramos del material vegetal seco y molido. El aceite se extrajo de un litro del destilado mediante una partición con CH_2Cl_2 . Al eliminar el disolvente se obtuvo un líquido viscoso de color azul muy intenso.

4.2 ESTUDIOS DE EFICACIA Y TOXICIDAD

Los ensayos se realizaron utilizando animales de experimentación adquiridos comercialmente con la compañía Harlan México S. A. de C. V. Todos los experimentos se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el Cuidado y manipulación de Animales de Experimentación. También se observaron con detenimiento la aplicación de reglas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Para la evaluación de la toxicidad aguda, el potencial antinociceptivo y espasmolítico se utilizaron ratones machos 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 12 y 24 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*), respectivamente.

Para los ensayos de las actividades antidiabéticas y gastroprotectoras se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un rango de peso de 180-220 g. Los animales se mantuvieron en un bioterio con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad y libre acceso a agua y alimento. Antes de los ensayos, los animales se dividieron en grupos de seis, se colocaron en cajas individuales y se mantuvieron en ayuno por 28 y 24 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*), respectivamente.

4.2.1. Determinación de la toxicidad aguda del extracto íntegro de *B. cavanillesii* mediante los criterios de Lorke

Para evaluar la toxicidad de tipo agudo del extracto orgánico íntegro se utilizó la metodología reportada por Lorke (1983). De manera breve, la metodología consto de dos fases: en la primera, ratones con 12 horas de ayuno y libre acceso a agua (*ad libitum*) fueron observados durante 30 minutos previos a la administración oral de tres dosis distintas del extracto a evaluar (10, 100 y 1000 mg/kg). En la segunda fase del estudio, las dosis seleccionadas fueron de acuerdo al número de animales muertos en la primera fase (criterios de Lorke) y se siguió el mismo procedimiento. En ambas fases y una vez administrado el extracto orgánico, el comportamiento de los animales fue registrado durante las primeras ocho horas y, posteriormente, a diario por un periodo 14 días; para así determinar algún cambio en su patrón conductual, efectos tóxicos o la muerte. De manera complementaria, tres animales más fueron administrados con el vehículo (1 mL/kg) donde se suspendieron los tratamientos de prueba como control negativo para cada fase. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO₂.

4.2.2. Potencial antinociceptivo en ratones utilizando las pruebas de la placa caliente y los estiramientos abdominales

El efecto antinociceptivo del extracto y los productos aislados se determinó utilizando las pruebas de la placa caliente y estiramiento abdominal, de acuerdo a los protocolos experimentales reportados en la literatura (Williamson *et al.*, 1996).

4.2.2.1. Potencial antinociceptivo de los extractos íntegros de *Brickellia veronicifolia* (BVEO), *B. cavanillesii* (BCEO) y de los metabolitos 16, 18, 19 y 24 en la prueba de la placa caliente

Los animales de experimentación se introdujeron en un cilindro de plástico transparente que se colocó sobre una placa caliente a la temperatura de 55.5 ± 0.2 °C. Inmediatamente se determinó el tiempo transcurrido entre el estímulo térmico aplicado y la primera respuesta de los animales al mismo (lamida, levantamiento de las patas traseras o salto fuera del cilindro), es decir, el periodo de latencia.

Debido a la naturaleza del experimento fue necesario inicialmente adaptar a los animales al entorno del experimento. Para ello, 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.

Los tratamientos se administraron 60 minutos (extracto a las dosis de 100-630 mg/kg) y 30 minutos (compuestos 2-5; 1-100 mg/kg) antes de la aplicación del estímulo térmico. La morfina (3.75 mg/kg) se administró de manera intraperitoneal. Por último, el vehículo se proporcionó a razón de 1 mL/kg de peso corporal *per os*.

4.2.2.2. Potencial antinociceptivo de los extractos íntegros de *Brickellia veronicifolia* (BVEO), *B. cavanillesii* (BCEO) y los metabolitos 16, 18, 19 y 24 en la prueba de estiramiento abdominal

Los tratamientos de prueba [BVEO y BCEO (100-600 mg/kg) y los metabolitos 16, 18, 19, y 24 (10-100 mg/kg) *p.o.*] se administraron por vía oral 30 y 60 minutos previos a la inducción de los estiramientos-contracciones abdominales. Transcurrido el periodo de absorción de los extractos y compuestos a evaluar, se administró una solución diluida de ácido acético al 0.6 %, *i.p.* a cada ratón. Inmediatamente después, los animales se colocaron de manera individual en cajas de plástico transparente y se observaron durante 30 minutos. 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 0.02% en SSI *p.o.*).

Como control positivo se utilizó a la dipirona (100 mg/kg, *p.o.*), administrada 30 minutos antes que el agente algogénico; este fármaco bloquea totalmente el efecto nociceptivo producido por el ácido acético diluido.

4.2.3. Evaluación del potencial antidiabético de los extractos orgánicos, aceite esencial y metabolitos selectos de *Brickellia veronicifolia* y de extracto orgánico íntegro de *B. cavanillesii*

La evaluación del potencial antidiabético de las especies seleccionadas, sus diferentes extractos y compuestos puros, se realizó utilizando un modelo agudo (Bailey y Flatt, 1990; Williamson *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1997; Verspohl, 2002; Subash-Babu y Stanley-Mainzen, 2004; Soumyanath, 2006; Fröde y Medeiros., 2008; *inter alia*).

4.2.3.1. Selección del modelo e inducción de la condición diabética en los animales de experimentación

La condición diabética fue inducida por la administración de una dosis única de estreptozotocina (STZ, *i.p.*, 25-100 mg/kg) disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH=4.5 en un volumen de 1 mL/kg. Los niveles de glucosa de los animales tratados fueron monitoreados de 3 a 5 días después; aquellos que presentaban niveles de glucosa sanguínea mayores a 250 mg/dL fueron considerados diabéticos e incluidos en los estudios de evaluación del efecto antidiabético.

4.2.3.2. Preparación de las muestras

Los extractos orgánicos, el aceite esencial y los compuestos puros fueron suspendidos en una solución salina (SSI) que contenía no más de 0.05 % de Tween 80[®] como surfactante. El producto comercial glibenclamida (Sigma Co., St. Louis, MO) fue utilizado como fármaco de referencia mientras que el vehículo donde se suspendieron las muestras fue utilizado como control negativo. Todas las muestra se prepararon una hora antes de realizar las evaluaciones y administradas por vía intragástrica.

4.2.3.3. Recolección de muestras biológicas y determinación de niveles de glucosa sanguínea

Las muestras sanguíneas se recolectaron a través de una pequeña incisión de la vena caudal al final de la cola de los animales de experimentación. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron utilizando un glucómetro comercial que emplea el método de la glucosa oxidasa (One Touch Ultra, Johnson-Johnson, Milpitas, CA, E. E.U. U.).

4.2.3.4. Evaluación del efecto hipoglicemiante agudo de los extractos orgánicos de *Brickellia veronicifolia* (BVEO), *B. cavanillesii* (BCEO) y el aceite esencial de *B. veronicifolia* (BVAE) en animales normoglicémicos

Un total de 88 animales de experimentación fueron distribuidos en once grupos de ocho ratas cada uno, los cuales fueron colocados en jaulas individuales y puestos en ayuno durante 18 horas con libre acceso a agua (*ad libitum*). Transcurrido el periodo de ayuno, los animales fueron tratados de la siguiente manera: al grupo 1 se le administró el vehículo donde se suspendieron las muestras a evaluar (control negativo), a los grupos 2-10 se les administraron los tratamiento de prueba (BVEO, BVAE, BCEO; 30-300 mg/kg; *p.o.*). El grupo 11 fue utilizado como control positivo y se les administró el fármaco de referencia, la glibenclamida, a la dosis de 10 mg/kg. Los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) fueron

monitoreados a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

4.2.3.5. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico íntegro de *Brickellia veronicifolia* en animales diabéticos

Este experimento se realizó en animales previamente diabetizados con STZ. Un total de 88 ratas diabéticas se colocaron en cajas individuales para iniciar un ayuno de 18 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*). Al término del periodo de ayuno, los animales fueron distribuidos en once grupos de ocho ratas cada uno, los cuales fueron tratados de la siguiente manera: Al grupo 1 se le administró el vehículo (control negativo); los animales de los grupos 2-10 recibieron dosis crecientes de los tratamientos BVEO, BCEO y BVAE (30-300 mg/kg, *p.o.*). Finalmente a las ratas del grupo 11 se les administró la glibenclamida (10 mg/kg, *p.o.*). Inmediatamente se realizó la lectura de los niveles de glucosa sanguínea a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

En ambos experimentos, los porcentajes de variación de glicemia se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glicemia} = [(G_i - G_t) / G_i] \times 100$$

Donde G_i corresponde al valor de glicemia inicial y G_t al valor de glicemia a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos.

4.2.3.6. Efecto del extracto orgánico de *Brickellia veronicifolia* sobre la tolerancia a la glucosa

Tres grupos de 8 animales normoglicémicos fueron colocados en cajas individuales y privados de alimento por 18 horas. Posteriormente se les administraron los tratamientos de la siguiente manera: A los animales de los grupos uno y dos se les administró el vehículo (1 mL/Kg) y la glibenclamida (10 mg/kg, *p.o.*), respectivamente. Al grupo tres se le

administro una dosis de 100 mg/kg vía oral del extracto orgánico íntegro. Treinta minutos después, a todos los grupos se les administró una solución de glucosa anhidra (Sigma Co., St. Louis, MO) a razón de 1g/kg de peso. Los niveles de glucosa sanguínea fueron medidos a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de la administración de la carga de glucosa.

4.2.3.7. Evaluación del efecto hipoglicemiante agudo de los compuestos puros 4 y 5 aislados de *Brickellia veronicifolia* en animales normoglicémicos

Al término del periodo de ayuno de 18 horas, 32 ratas normoglicémicas fueron distribuidas en cuatro grupos de ocho individuos cada uno. La administración de los tratamientos de prueba se efectuó en el siguiente orden: al grupo uno se le administro el vehículo en el cual fueron suspendidos los compuestos de prueba (Tween 80 al 0.05 % en SSI) a razón de 1 mL/kg; los grupos 2 y 3 se trataron vía intragástrica con los compuestos puros a las dosis de 10 y 40 mg/kg, respectivamente; finalmente, al grupo 4 se le administro el fármaco de referencia, glibenclamida (10 mg/kg). La medición de los niveles de glucosa sanguínea se realizo a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos.

4.2.3.8. Evaluación del efecto agudo hipoglicemiante de los compuestos puros 4 y 5 aislados de *Brickellia veronicifolia* en animales diabéticos

Los animales de experimentación previamente diabetizados por tratamiento con STZ, fueron tratados con los compuestos puros 4 y 5. El régimen de administración fue el mismo descrito en el inciso anterior. De igual manera, se utilizo como fármaco de referencia a la glibenclamida. Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron en los mismos periodos antes mencionados.

4.2.4. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos orgánicos de *B. veronicifolia* y *B. cavanillesii* en el modelo de úlcera inducida con etanol absoluto

La evaluación del potencial gastroprotector de las especies objetos de estudio se realizó utilizando el modelo de inducción de úlceras gástricas con etanol absoluto en ratas. Las úlceras fueron inducidas de acuerdo a los protocolos experimentales reportados en la literatura (Robert, 1979; Navarrete *et al.*, 2005; Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007).

De manera general, ratas macho de la cepa wistar con un rango de peso entre 180-220 g fueron distribuidas en grupos de ocho individuos cada uno. Los extractos de prueba (10-300 mg/kg, *p.o.*), el fármaco de referencia carbenoxolona (30 mg/kg) y el vehículo donde se suspendieron los tratamientos (1 mL/kg) fueron administrados 30 minutos antes de la administración de etanol (1 mL/rata, *p.o.*). Un par de horas después de la administración del agente necrosante, los animales de experimentación se sacrificaron con una sobredosis inhalada de éter etílico. Inmediatamente, se realizó la disección del estómago y el duodeno; éste fue llenado con 10 mL de formaldehído al 2 % y posteriormente se colocó en un recipiente que contenía formaldehído a la misma concentración por espacio de 15 minutos; todo esto con el objetivo de lograr la fijación tanto de la capa interna como de la externa del órgano. A continuación, el estómago se disecó a lo largo de su curvatura mayor.

El área dañada se midió utilizando un microscopio estereoscópico (x 10) equipado con un micrómetro ocular. La suma del área (mm²) de todas las lesiones en el corpus de cada animal se utilizó como el índice de úlcera.

4.2.4.1. Estudios preliminares del mecanismo de acción del efecto gastroprotector del extracto de *B. cavanillesii*

Para los estudios del mecanismo de acción de *B. cavanillesii* se diseñaron algunos experimentos adicionales utilizando como base el modelo descrito en el inciso 4.2.4. con ligeras modificaciones que se describen a continuación:

4.2.4.1.1. *Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con indometacina*

Para determinar la participación de las prostaglandinas endógenas en la gastroprotección del extracto, se administró indometacina (IND) por vía subcutánea a la dosis de 10 mg/kg (disuelta en SSI conteniendo 5 % de bicarbonato de sodio 5 mM) 75 minutos antes de la administración del extracto (30 mg/kg, *p.o.*). La carbenoxolona (CAR, 30 mg/kg) y el vehículo (SSI + Tween 80, 5 ml/kg) se administraron por vía oral como controles.

4.2.4.1.2. *Lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas pretratadas con el éster metílico de la N-nitro L-Arginina (L-NAME)*

Los animales se trataron por la vía intraperitoneal con 70 mg/kg de L-NAME disuelto en agua 30 minutos antes del extracto de prueba (30 mg/kg) y los controles respectivos.

4.2.4.1.3. *Lesiones gástricas inducidas por etanol en ratas pretratadas con N-etilmaleimida (NEM)*

Para investigar la participación de los grupos sulfhídricos en la gastroprotección del extracto, se administró la NEM (10 mg/kg en SSI) de manera subcutánea (*s.c.*) 30 minutos antes de la administración de los tratamientos de prueba y los controles.

4.2.5. Evaluación del efecto de *B. veronicifolia* y *B. cavanillesii* sobre la motilidad intestinal en ratón

Grupos de ocho ratones cada uno, con un periodo de ayuno de 24 horas y libre acceso a agua (*ad libitum*), fueron utilizados para evaluar a los distintos tratamientos de prueba. De manera breve, después del periodo de ayuno, los animales se trataron con los extractos orgánicos, el aceite esencial y el compuesto **40** (3.16-31.6 mg/kg, *p.o.*), suspendidos en solución salina con Tween 80 al 0.05 % como surfactante. Quince minutos después de la administración de los tratamientos, 0.5 mL de una suspensión de carbón activado al 10 % en una solución acuosa de goma arábica al 5 % se administraron a cada

animal de experimentación por vía oral. Veinte minutos después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el intestino delgado fue extraído cuidadosamente desde el píloro hasta el yeyuno. La distancia recorrida por el carbón activado a lo largo del intestino fue medida para cada ratón y utilizada para calcular el % de tránsito intestinal mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ motilidad intestinal} = (A/B) \times 100$$

Donde:

A= distancia recorrida por el carbón activado en el intestino

B= distancia total del intestino

Atropina (1 mg/kg, *p.o.*) y el vehículo (1 mL/kg) donde se suspendieron los tratamientos de prueba que se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

4.2.6. Evaluación de l efecto anti-*Helicobacter pylori* del e xtracto o rgánico ín tegro, fracciones primarias, aceite esencial y compuesto 40 obtenidos de *B. cavanillesii*

4.2.6.1 Cepa del microorganismo y condiciones de cultivo

Una cepa estándar de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, se cultivo en cajas petri con una base de agar Casman suplementado con 5 % de sangre de cordero desfibrilado y 10 mg/mL de vancomicina al día a 37 °C bajo condiciones microaerofílicas (10 % de CO₂). Las cepas se identificaron mediante su morfología en una tinción de Gram y por pruebas bioquímicas.

4.2.6.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La evaluación del extracto orgánico, fracciones primarias, aceite esencial y el compuesto **40** se realizó en caldo de cultivo de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI). El medio de cultivo contenía caldo Muller-Hinton (DIFCO), 0.2 % de β-ciclodextrina y vancomicina (10 mg/L). El extracto, fracciones, aceite esencial y compuesto de prueba se disolvieron en DMSO para obtener

concentraciones finales de 40, 20, 10, 5 y 1 µg/mL. De estas diluciones, 20 µL fueron adicionadas a 3 mL de un caldo de cultivo conteniendo $\sim 10^8$ UFC/mL de *H. pylori* que se encontraba en la fase logarítmica de su crecimiento. Las diferencias de absorbancia fueron determinadas después de 18 horas de incubación en agitación vigorosa (150 rpm) por 2 días a 37 °C bajo condiciones microaerófilas. Estas absorbancias se utilizaron para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria con respecto a un control que creció solo con DMSO (20 µl). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Amoxicilina y metronidazol fueron usados como antibióticos de referencia para dar validez a los resultados.

4.2.7. Determinación de l efecto antibacteriano del extracto orgánico íntegro y el aceite esencial

Una batería de bacterias gram positivas y negativas se utilizó para realizar las pruebas del potencial antimicrobiano de la planta empleando para tal fin el método de disco en caja petri. *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella typhi* (ATCC 9992) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) fueron suministrados por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Química de la UNAM. Las bacterias se desarrollaron en placas de agar Müller-Hinton a 37 °C siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las cajas petri se prepararon con agar conteniendo 20 µL de un caldo de cultivo de una noche de crecimiento (10^8 bacterias por mL) ajustado por el tubo estándar turbidimétrico de McFarland al 0.5 %. Los discos de papel filtro con un diámetro de 6 mm impregnados con 5 µL de cada muestra a ensayar, con una concentración final de 100, 250, 500, 750 o 1000 µg se colocaron sobre el agar de las cajas petri de manera equidistante. Los controles utilizados incluyeron el disolvente (DMSO) y con los siguientes antibióticos: amikacina (*S. aureus*, CC=), vancomicina (*B. subtilis*, CC=), gentamicina (*P. aeruginosa* y *E. coli*, CC=) y ciprofloxacina (*S. typhi*, CC=).

Todas las cajas se incubaron a 37 °C por 24 horas. La susceptibilidad de cada microorganismo a las muestras de prueba y a los antibióticos de referencias se determinó midiendo el tamaño de las zonas o halos de inhibición sobre la superficie del agar alrededor de los discos de papel filtro. Valores menores de 8 mm se consideraron como no activos. Los resultados de la evaluación se reportan como concentración crítica (CCI).

4.2.8. Análisis estadístico

Los resultados experimentales de los ensayos farmacológicos realizados están expresados como el promedio \pm el error estándar para un valor de $n = 6$. En los gráficos correspondientes se presentan los resultados de las evaluaciones antidiabéticas, del efecto antinociceptivo [número de estiramientos vs tiempo y área bajo la curva calculada por el método de trapecios (ABC) vs tiempo; en las pruebas de estiramiento abdominal y placa caliente, respectivamente], el efecto gastroprotector (área ulcerada vs dosis) y el efecto inhibitorio de la motilidad intestinal (% de inhibición vs dosis). En todos los casos se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) seguida de la prueba de t de Dunnet para encontrar diferencias significativas entre los grupos de prueba y los grupos control. Un valor de significancia de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente diferente.

4.3 PRUEBAS DE IDENTIDAD Y COMPOSICIÓN DE UTILIDAD PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA DE *B. CAVANILLESII*

4.3.1. Caracterización molecular de *Brickellia cavanillesii*

Una muestra de hoja fresca de *Brickellia cavanillesii* fue utilizada por el grupo de investigación de la Dra. Argelia Lorence del Instituto de Biociencias de la Universidad de Arkansas U.S.A. para aislar y purificar sus ácidos nucleicos utilizando el kit “Nucleon Phyt PURE” que permite extraer ADN de plantas con alto contenido de compuestos fenólicos. El procedimiento utilizado para amplificar por PCR a la región ITS por sus siglas

en inglés (Internal Transcriber Spacer) fue el descrito por Schmidt y Schilling (2000). El aislamiento de estas regiones fue exitoso y la combinación de oligonucleótidos “IT4” e “IT5” permitió amplificar un producto de 750 pares de bases del ADN genómico la especie; como control positivo se utilizó el ADN genómico de *B. eupatorioides* que fue de cerca de 650 pares de bases. Los productos obtenidos por PCR se clonaron utilizando el vector pDrive (Qiagen) con la finalidad de obtener la secuencia completa.

4.3.2. Establecimiento de perfiles cromatográficos de extracto orgánico y aceite esencial de *B. cavanillesii* por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de la serie 1100 (Agilent Technologies). El equipo cuenta con un sistema automático de inyección, una bomba cuaternaria, un termostato para columna cromatográfica, un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y un detector de masas selectivo (MSD). La separación de los picos se realizó en una columna cromatográfica YMC-ODS-AM (100 x 2.1 mm), con un tamaño de partícula de 3.5 µm. La elución se realizó con un gradiente lineal utilizando una mezcla de acetonitrilo-ácido fórmico acuoso al 0.1 % (7-93→100-0). El tiempo de análisis fue de 30 minutos con un flujo de 0.4 ml/min y una temperatura de 45 °C. El escaneo del espectrómetro de masas se realizó por ionización química en la modalidad de iones negativa con un rango de detección entre 150-800 umas en la modalidad de ionización química a presión atmosférica (HPLC-PAD-APCI/MS).

Para la identificación de posibles compuestos en los extractos orgánicos y el aceite esencial, se utilizaron soluciones metanólicas de los siguientes estándares: [ácido clorogénico (**41**), ácido cafeíco (**42**), rutina (**43**), quercetin-3-*O*-galactosido (**44**), apigenin-7-*O*-galactosido (**45**), ácido rosmarínico (**46**), quercetina (**47**), apigenina (**48**), baicaleína (**49**) y el compuesto **40**] (Tabla 1). La identificación de los compuestos presentes en los extractos se realizó mediante una coelución y también comparando los espectros de masas,

UV y los tiempos de retención (t_r) de estos compuestos con los registrados en el extracto orgánico.

4.3.3. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial obtenido de *B. cavanillesii* como se indicó en el inciso 4.1.2.ii, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas HP 5989A. La columna utilizada fue del tipo 5 % metil silicón HP, con una longitud de 30 m por 0.32 mm de diámetro. El helio se empleó como gas acarreador con una velocidad de 1 mL/min. La temperatura de la columna de programa de 70-250 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El voltaje de registro de los espectros fue de 70 eV.

4.3.4. Aislamiento del compuesto activo y marcador mayoritario del extracto orgánico íntegro

4.3.4.1. Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en columna abierta se realizaron mediante las técnicas convencionales, en columnas de vidrio de diferentes capacidades, empleando como soporte gel de sílice Merck 60 (tamaño de partícula 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 μ m ASTM). Los análisis por cromatografía en capa fina (ccf) se efectuaron en placas de vidrio o aluminio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 F₂₅₄, Merck) empleando diferentes sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno revelador.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (996) y un equipo de bombeo cuaternario (600). El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y

manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Empower 2 Waters Corporation. El análisis del aceite esencial y de la infusión se realizó con una columna Simmetry® C₁₈, con un tamaño de poro de 100 Å y de partícula de 5 µm, con un diámetro interno de 3.9 mm y 150 mm de longitud. La detección se ajustó a 270 nm.

4.3.4.2. Equipos utilizados para la determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los puntos de fusión se midieron en un aparato de Fisher-Johns y se reportan sin corregir, los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ¹H) y de carbono-13 (RMN- ¹³C) 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 se registraron en un espectrómetro JEOL SX 120 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

4.3.4.3. Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico total

El extracto total (346.5 g) obtenido como se describió en el inciso 4.1.2.i fue sometido a un proceso de fraccionamiento primario mediante un proceso de partición con disolventes de distinta polaridad. El extracto orgánico se suspendió en una mezcla de MeOH-H₂O y se realizó el proceso de partición adicionando los disolventes en el siguiente orden: Hexano, CH₂Cl₂ y AcOEt. Las fracciones primarias obtenidas fueron concentradas al vacío y los residuos resultantes se pesaron y etiquetaron como BCFH, BCFD, BCFA y BCFW, respectivamente.

4.3.4.4. Aislamiento y caracterización del 6-a cetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (40) de la fracción BCFH

Para el estudio fitoquímico de la fracción hexánica (BCFH) se realizó un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta utilizando 40 g de la fracción en una columna de vidrio empacada con 1 kg de gel de sílice. La columna fue eluída con diferentes mezclas de disolventes desde Hexano-CH₂Cl₂ [(1-0)→(0-1)] CH₂Cl₂-MeOH [(1-0)→(0-1)]. De conjunto de fracciones BCFH-F4 precipitaron de manera

espontánea 1.2 g de un sólido cristalino verde-amarillo, el cual presentó un punto de fusión de 102 °C. Para identificar este sólido, se registraron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

4.3.4.5. Aislamiento de los metabolitos mayoritarios de la infusión de *B. cavanillesii*

El estudio químico realizado con la finalidad de aislar los compuestos mayoritarios de la infusión preparada como se indicó en el apartado **4.1.2.iii** se llevo a cabo de la siguiente manera: la partición de la infusión resultante con CH_2Cl_2 generó 4.4692 g de un residuo; la fracción obtenida fue sujeta a un estudio químico mediante técnicas cromatográficas convencionales, permitiendo el aislamiento del compuesto **40** y del flavonoide quercetina (**47**), el cual constituye el metabolito mayoritario en esta fracción. La identidad de ambos compuestos fue establecida por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos descritos en la literatura.

4.3.5. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación del compuesto 40 en el aceite esencial

El análisis del aceite esencial se realizó con una columna Simmetry® C_{18} , con un tamaño de poro de 100 Å y de partícula de 5 μm , con un diámetro interno de 3.9 mm y 150 mm de longitud. La detección se ajustó a 270 nm. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (996) y un equipo de bombeo cuaternario (600). El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Empower 2 Waters Corporation. Para la obtención del mejor sistema de elución se probaron distintas mezclas de ACN-Ácido Fórmico acuoso (0.5 % v/v) hasta encontrar las condiciones óptimas de análisis. Las condiciones seleccionadas fueron: ACN-Ácido Fórmico acuoso (0.5% v/v) [1:1], la velocidad de flujo fue de 0.45 ml/min y la detección se estableció a una longitud de onda de 270 nm. Bajo estas condiciones el tiempo de retención (t_R) del compuesto **1** fue de 30 minutos.

4.3.5.1. Preparación del aceite esencial de *B. cavanillesii*

La preparación de la esencia utilizada en el desarrollo y validación del método analítico se realizaron de la siguiente manera: 100 gramos del material vegetal seco, con un tamaño de malla (0.05 mm), se colocaron en un aparato de hidro-destilación y se le adicionó 2 L de agua destilada. El aceite esencial obtenido se extrajo de un litro del destilado mediante particiones con CH₂Cl₂, posteriormente se eliminó el disolvente, obteniéndose un líquido viscoso amarillo. Este proceso se repitió tres veces.

4.3.5.2. Aislamiento del 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno (40)

El estándar se obtuvo a partir del extracto orgánico como se describió en el apartado 4.3.4.4.

Para el establecimiento de la pureza del compuesto se realizó un análisis por HPLC con las condiciones desarrolladas para el método analítico. El grado de pureza obtenido fue mayor al 99.5 % (Ver espectro anexo).

4.3.5.3. Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico

4.3.5.3.1. Especificidad

La especificidad del método se realizó mediante el registro de los espectros de absorción, en el rango de longitudes de onda (λ) del ultravioleta (UV), de cuatro muestras diferentes: La primera correspondiente al estándar a dos diferentes niveles de concentraciones (10 y 100 mg/mL); la segunda que fue la matriz de trabajo (250 mg/mL), y la última a la matriz de trabajo enriquecida con el estándar del compuesto **40**.

4.3.5.3.2. Linealidad del sistema

Para la evaluación de la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración de acuerdo al siguiente procedimiento: 10 mg de compuesto **40** se disolvieron en 10 mL de Metanol (MeOH) para obtener una concentración final de 1 mg/mL. A partir de esta última

se prepararon las disoluciones que contenían entre 10 y 1000 µg/mL del estándar a cuantificar. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico del estándar de seis replicas se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución.

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los valores obtenidos se compararon con los criterios: $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R \geq 0.99$, $R^2 = 0.98$.

4.3.5.3.3. Limite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Para evaluar el LD y el LC se preparó una curva de calibración con una serie de disoluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 1000 µg/mL. Las diluciones contenían entre 10 y 400 µg/mL del estándar a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área del pico que corresponde al estándar de cada réplica se gráfico vs la concentración del estándar en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen (b_0), la pendiente (b_1), el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R^2), se utilizó un análisis de regresión lineal simple. De esta manera, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

4.3.5.3.4. Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método y su exactitud se determinó construyendo una curva de calibración de la matriz de trabajo enriquecida con tres diferentes concentraciones del estándar del compuesto **40** (125, 250 y 375 $\mu\text{g/mL}$). Se evaluaron por triplicado para cada concentración para así tener los valores de ABC. Estos últimos se interpolaron en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema y los resultados obtenidos (concentración adicionada vs concentración recuperada) fueron analizados mediante una regresión lineal simple para determinar los parámetros estadísticos $b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R \geq 0.99$, $R^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [IC(μ)] del % de recobro.

4.3.5.3.5. Precisión del método

La repetibilidad se evaluó midiendo la respuesta analítica de seis réplicas del estándar **40** a una concentración de 250 mg/mL aproximadamente.

La precisión intermedia se realizó mediante el análisis de seis réplicas de la matriz enriquecida con el estándar (250 mg/mL), efectuándose por dos analistas diferentes en distintos días.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se expresaron en términos de coeficiente de variación (CV).

4.3.5.3.6. Estabilidad

La estabilidad de la muestra se evaluó midiendo el porcentaje (%) del estándar **40** contenida en una solución preparada de estándar a una concentración de 250 mg/mL y otra

solución del aceite esencial del mismo lote de la planta a una concentración aproximada de 250 mg/mL.

Las condiciones de almacenaje fueron:

Temperatura de 40 °C, ambiente y -4 °C. Tres replicas fueron sometidas a cada una de las condiciones. Las muestras se evaluaron al inicio y a los 20 días.

Los resultados se expresan en términos de diferencias absolutas de la media aritmética de cada condición de almacenaje con respecto a la media aritmética del análisis inicial.

4.3.5.3.7. Cuantificación del compuesto **40** en diferentes muestras

2.5 mg de la esencia a analizar se disolvieron en 1 mL de MeOH. El constituyente se cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones indicadas en el inciso **4.3.5**.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente disertación surgió de la necesidad de investigar los recursos vegetales de mayor relevancia en México para el alivio de numerosas enfermedades. Así, mediante el desarrollo de la presente investigación fue posible generar algunos parámetros de eficacia, calidad e inocuidad de *Brickellia veronicifolia* y *B. cavanillesii*, dos de las plantas medicinales más ampliamente comercializadas en nuestro país con fines curativos, bien sea bajo la forma de droga cruda o en preparados fitofarmacéuticos, solas o combinadas con otras especies vegetales. Así mismo, es probable que ambas especies sean utilizadas de manera indistinta ya que se designan con los mismos nombres comunes y como en la mayoría de los casos, no existen criterios de calidad y eficacia que permitan diferenciarlas. Es importante señalar que en las pruebas de eficacia preclínica se enfatizó el estudio de los extractos orgánicos, esencias e infusiones de las plantas; esto obedece a que se han encontrado resultados que demuestran que la eficacia de estas mezclas es mejor que el de los componentes aislados debido principalmente a los efectos polifarmacológicos o sinérgicos de los múltiples componentes presentes en los extractos de plantas (Gibbons, 2003). La terapia multi-objetivo es un concepto nuevo de fitoterapia según el cual se tratan las enfermedades con una o la combinación de varias drogas crudas de una manera causalmente dirigida. Este tipo de terapias tiene la ventaja de que se pueden reducir, y hasta eliminar, los efectos colaterales que provocaría el uso de un solo principio activo ya que las dosis de los componentes en la mezcla de extracto o extractos son usualmente menores que la de un compuesto puro (Wagner, 2006).

Para facilitar la presentación de los resultados de los análisis farmacológicos y químicos de las especies medicinales *Brickellia veronicifolia* y *B. cavanillesii*, en primer lugar se describirán los estudios de eficacia de la especie *B. veronicifolia*, mismos que fueron publicados recientemente como un artículo en extenso en la revista "*Journal of Ethnopharmacology*". La información obtenida enriquecerá la monografía de la especie previamente propuesta por Rivero-Cruz (2004). En segundo lugar, se detallarán los

resultados obtenidos para la especie *B. cavanillesii* que incluyen algunos parámetros de eficacia, seguridad, identidad y composición de la droga cruda derivada de esta especie.

5.1. *Brickellia veronicifolia* (Kunth) A. Gray (Asteraceae)

Las evaluaciones farmacológicas conducentes al establecimiento de parámetros de eficacia preclínica de *B. veronicifolia* consistieron en la determinación de sus posibles efectos antinociceptivo, antidiabético y gastroprotector. Asimismo, se corroboró *in vivo* el efecto espasmolítico de la planta.

5.1.1. Evaluación del potencial antinociceptivo del extracto y compuestos puros de la especie

Para establecer el potencial antinociceptivo del extracto y algunos metabolitos selectos de la especie, se utilizaron las pruebas de estiramiento abdominal y placa caliente en ratones de la cepa ICR. Los resultados de la actividad antinociceptiva se presentan en la **Figura 11**.

La prueba del estiramiento abdominal, constituye un modelo experimental ampliamente utilizado para la detección de agentes con actividad antinociceptiva a nivel periférico. El ensayo mide el potencial del extracto y compuestos puros para contrarrestar la irritación que causa la administración de una solución diluida de ácido acético (0.6 % v/v) utilizando ratones. La administración intraperitoneal de esta sustancia produce una reacción inflamatoria caracterizada por contracciones de la musculatura abdominal acompañada de extensiones de las extremidades inferiores y la elongación del cuerpo. Este comportamiento en los animales de experimentación es indicativo de un dolor visceral inflamatorio. Está bien documentado que la administración del ácido produce la liberación de mediadores algésicos tales como la bradicinina, prostaglandinas (PGE₂ y PGF_{2α} principalmente), histamina y 5-hidroxitriptamina (Nardi *et al.*, 2006). La liberación de estas sustancias produce una inflamación en el lugar de la administración y un incremento en la transmisión

sináptica en la espina dorsal (Collier *et al.*, 1968; Chiang y Zhuo, 1989; Le Bars *et al.*, 2001).

Una de las principales desventajas de esta prueba es que algunos antagonistas adrenérgicos o relajantes musculares pueden inducir efectos positivos (Le Bars *et al.*, 2001). Debido a esta falta de especificidad de la prueba, es común que el estudio se complete con otros. Por esta razón se realizó la evaluación del extracto y los compuestos en la prueba de la placa caliente. Este modelo se seleccionó además para investigar la actividad antinociceptiva potencial a nivel central de los diferentes tratamientos. El ensayo es altamente sensible a analgésicos fuertes y su implementación ocasiona poco daño a los animales de experimentación.

La aplicación de un estímulo térmico, a ratones, produce una respuesta que se caracteriza por (i) el levantamiento o lamida de una o ambas patas traseras y/o (ii) un salto hacia fuera del sistema cilindro-placa caliente descrito en la parte experimental. Estas respuestas son supraespinales (Le Bars *et al.*, 2001).

La administración oral del extracto orgánico (100-600 mg/kg de peso) de *B. veronicifolia* (BVEO) redujo significativamente el número de estiramientos abdominales, sin embargo este efecto no fue dependiente de la dosis (**panel A**). Además, el BVEO provocó un incremento significativo de la latencia de respuesta al estímulo térmico en el ensayo de la placa caliente (**panel B**). En este caso el efecto sí fue dependiente de la dosis administrada.

Con el fin de establecer los principios activos de la planta, el potencial antinociceptivo de los metabolitos **18**, **19**, **24** y **16** aislados de *B. veronicifolia* fue ensayado utilizando las pruebas farmacológicas antes descritas y los resultados se presentan en la **Figura 12**.

Los tratamientos con el compuesto **18** (10, 31.6 y 100 mg/Kg, **Panel A**) provocaron una disminución significativa en el número de estiramientos-contracciones totales inducidos por la solución diluida de ácido acético; sin embargo, la respuesta no fue dependiente de la dosis, ya que el efecto observado a 100 mg/Kg fue similar al de la dosis

de 10 mg/Kg. El ácido 2-metoxibenzoico (**19**) mostró una acción estadísticamente significativa y dependiente de la dosis, provocando la disminución de los estiramientos-contracciones en un 40 % con el tratamiento de 100 mg/Kg.

El compuesto **24** fue el que presentó el mejor efecto. Así a la dosis de 100 mg/kg inhibió aproximadamente en un 50 % los estiramientos-contracciones con respecto al grupo que recibió solo el vehículo. El metamizol fue usado como fármaco de referencia a la dosis de 100 mg/kg. El efecto del compuesto **16** no se analizó en este modelo debido a la poca cantidad disponible del metabolito.

En la prueba de la placa caliente (**panel B** de la **Figura 12**) los compuestos **16, 18, 19 y 24** (1-100 mg/Kg) aumentaron la latencia al estímulo térmico de forma dependiente de la dosis al igual que el extracto íntegro. De los cuatro metabolitos evaluados en esta prueba el más eficaz fue el compuesto **19**, sin embargo, su efecto fue menor que el del fármaco de referencia, la morfina (**mor**; 3.16 mg/Kg).

Aunque no existen estudios del potencial antinociceptivo de benzoatos de bencilo, Carson y colaboradores (1994) establecieron que algunos benzoatos de bencilo sintéticos son inhibidores de la fosfolipasa A₂, enzima proinflamatoria. En este sentido se ha propuesto que los inhibidores la actividad de esta enzima pueden ser de utilidad potencial para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la soriasis, colon irritable, artritis dermatitis, gota y traumas, entre otras. Sí existe correlación entre el efecto antinociceptivo establecido en el modelo de dolor inflamatorio y la inhibición de la fosfolipasa A₂, es necesario demostrarlo experimentalmente. De manera adicional, la similitud estructural de estos derivados del ácido benzoico con el ácido acetilsalícílico, sugiere la posibilidad de que el efecto en la prueba de estiramiento abdominal sea mediada por la inhibición en la síntesis de sustancias proinflamatorias como las prostaglandinas.

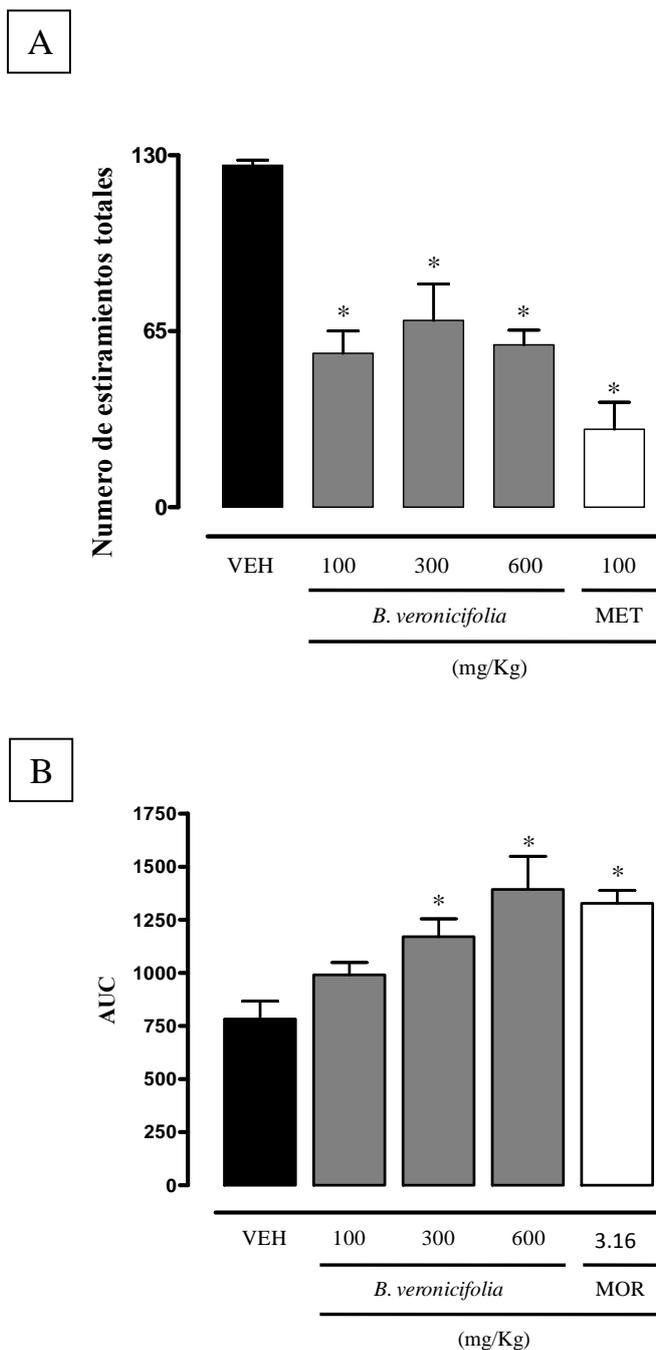


Figura 11. Efecto antinociceptivo del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (1:1) de *Brickellia veronicifolia* (BVEO) en ratones. En la gráfica **A** se presenta el número de contorsiones-estiramientos y en la gráfica **B** la latencia de respuesta al estímulo térmico en la prueba de la placa caliente. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba de t-Dunnet. * $p < 0.05$.

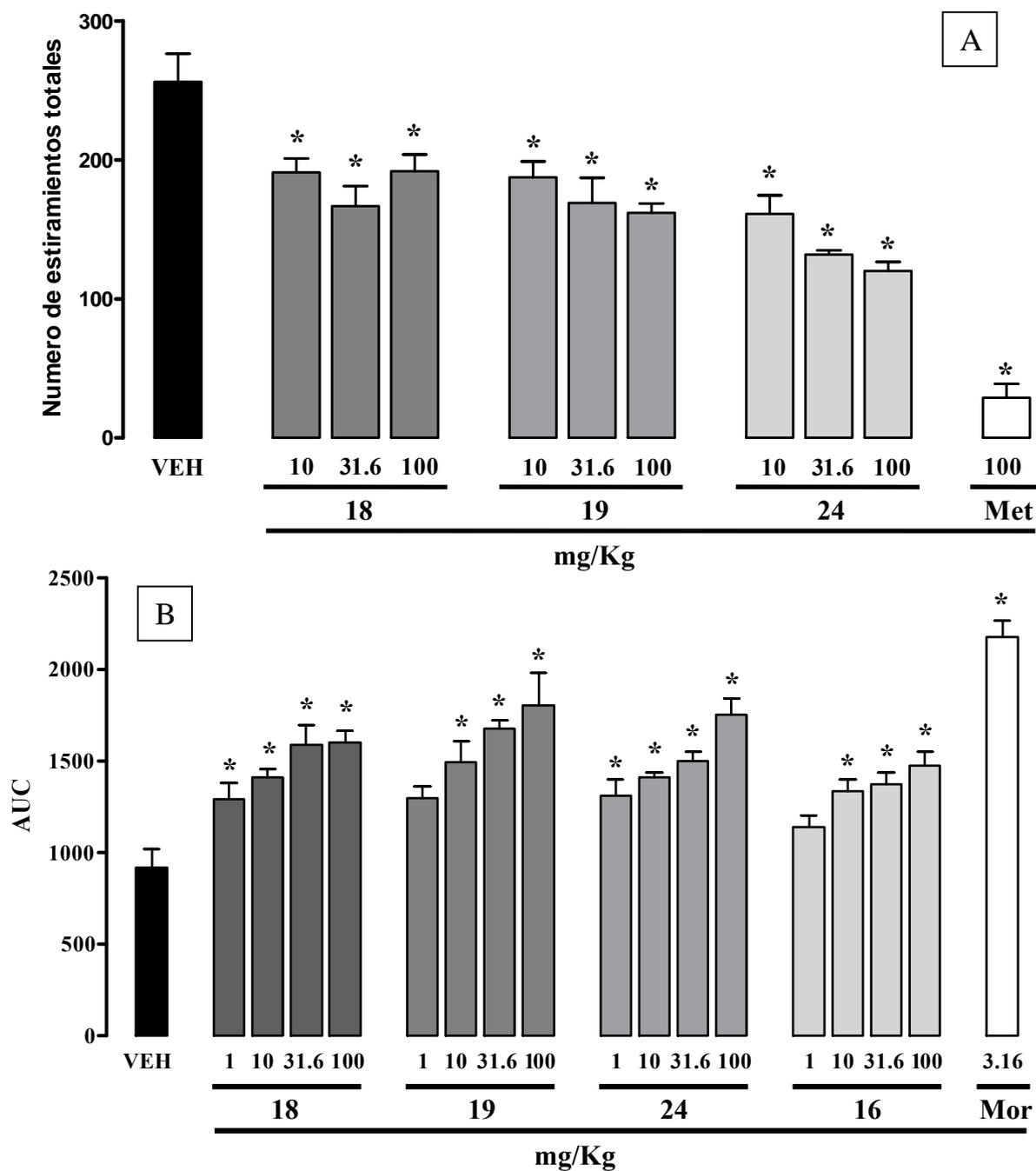


Figura 12. Efecto antinociceptivo de los ácidos 6-metoxisalicílico (**18**), 2-metoxibenzoico (**19**) y de los compuestos, 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y acetato de taraxasterilo (**16**) obtenidos de la especie *B. veronicifolia* en las pruebas del estiramiento abdominal (panel A) y la placa caliente (panel B). Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet. * $P < 0.05$.

5.1.2. Evaluación del potencial antidiabético del extracto orgánico, aceite esencial y compuestos selectos de la especie *Brickellia veronicifolia*

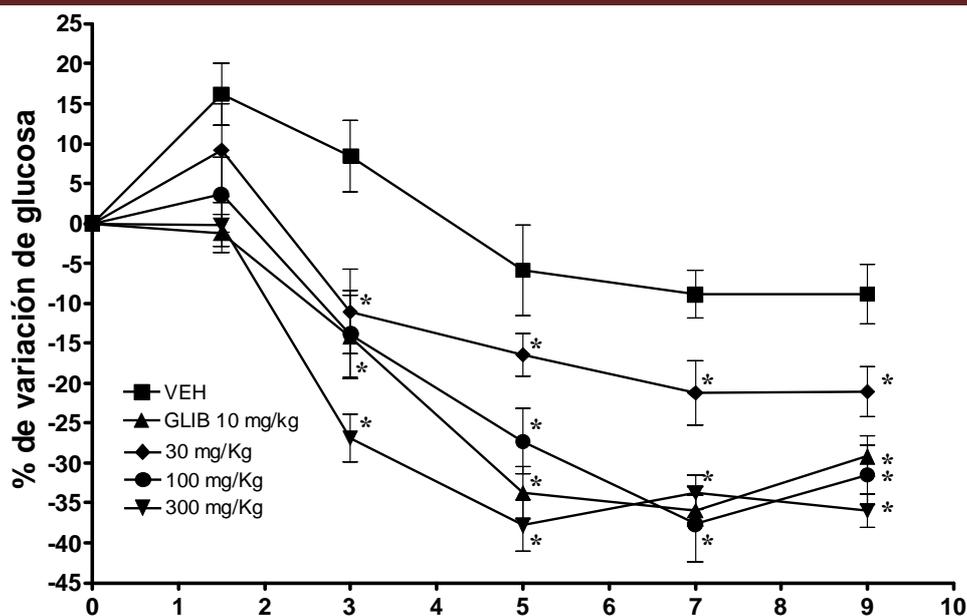
Dentro de las prácticas médicas populares de nuestro país, se ha reportado el uso de *B. veronicifolia* sola o en combinación con otras especies para el tratamiento de la diabetes (Martínez, 1980; Argueta, 1994; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En este sentido, se realizó la evaluación del extracto orgánico (EOBV), el aceite esencial (AEBV) y algunos metabolitos selectos (**16** y **24**) de la planta en un modelo de tipo agudo, con la finalidad de obtener información acerca de su eficacia para el tratamiento de esta enfermedad. Dado que ya existe un trabajo previo realizado por Pérez-Gutiérrez y colaboradores (1998), quienes evaluaron un extracto hexánico y un compuesto puro (el flavonoide centaureidina) obtenido de la planta con resultados poco concluyentes. Por lo tanto, se decidió realizar la evaluación del extracto de la especie nuevamente, sin embargo las características de los ensayos fueron un poco diferentes a las realizadas por Pérez y colaboradores (1998). En primer lugar, se sustituyó el modelo de ratones por el de ratas en la evaluación de los efectos hipoglucemiantes de los tratamientos; estos ensayos agudos se llevaron a cabo con animales normoglucémicos y diabéticos. Estos últimos se diabetizaron experimentalmente mediante la aplicación de una dosis de estreptozotocina (STZ) intraperitoneal. Además, los tratamientos de prueba así como el fármaco hipoglucemiante de referencia (glibenclamida), fueron administrados de manera intragástrica. Todo lo anterior, con la finalidad de contrastar los resultados con los obtenidos por el grupo de investigación de Pérez-Gutiérrez, donde los tratamientos de prueba fueron administrados a ratones normoglucémicos y diabéticos, estos últimos inducido con aloxana (otro compuesto con propiedades diabetógenas), por vía intraperitoneal. El cambio en la metodología experimental utilizada por Pérez y colaboradores nos permitirá observar la influencia de la vía de administración (Fröde and Medeiros, 2008). Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 13**.

El extracto orgánico a la dosis de 300 mg/kg posee un efecto hipoglucemiante significativo en animales normoglucémicos; a las tres horas posteriores a su administración

se observó una disminución de la glucemia en un -26.83 %. El efecto máximo se observó a las cinco horas después del tratamiento; en este caso los valores de glucosa sanguínea disminuyeron en un -37.83 % y se mantienen constantes hasta el final del experimento. El fármaco de referencia, la glibenclamida, provocó su máximo efecto hipoglucemiante a las siete horas posteriores a su administración (-36.01 %); a las nueve horas después del tratamiento se observó un incremento en la glucemia (-29.01 %) indicando que los niveles de glucosa sanguínea comienzan a restablecerse.

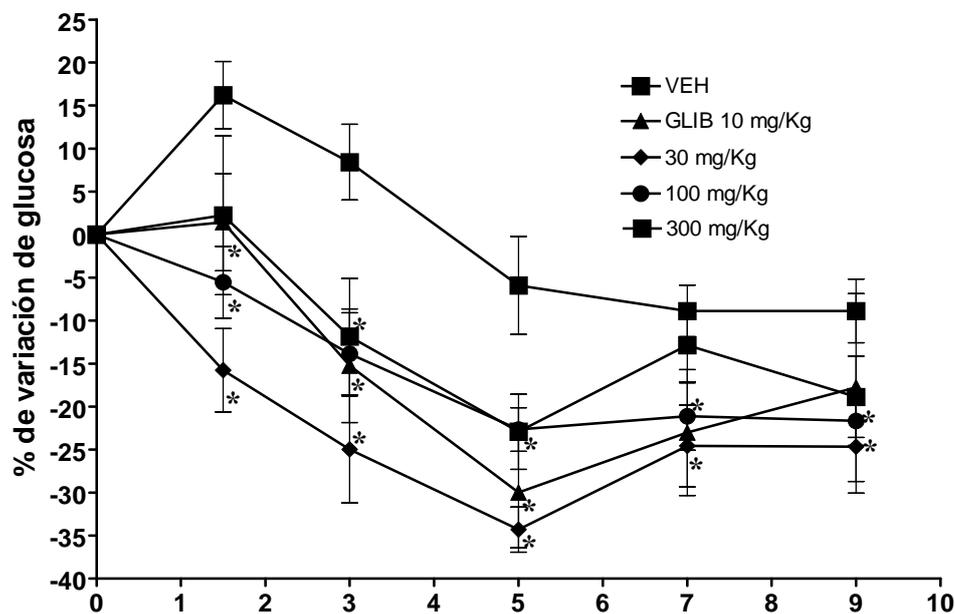
La evaluación del extracto en animales diabéticos implicó la inducción de la enfermedad en ratas, lo que se realizó mediante la administración intraperitoneal de una dosis única de estreptozotocina (50 mg/kg). Cinco días después se monitorearon los niveles de glucosa sanguínea para comprobar la condición diabética en los animales de experimentación. Aquellos con niveles de glucosa mayores a 250 mg/dL y con algunos síntomas característicos de la enfermedad como polifagia, poliuria, polidipsia y pérdida de peso corporal, fueron incluidos en el experimento.

Los resultados obtenidos del efecto hipoglucemiante del extracto orgánico en ratas diabéticas se presentan en la **Figura 14**, donde se puede observar que a la dosis de 30 mg/kg los niveles de glucosa disminuyeron hasta -35.99 % cinco horas después de la administración del tratamiento; a las nueve horas, los niveles de glucemia se mantuvieron en -27.17 % consistente con la recuperación de los animales enfermos. A las dosis de 100 y 300 mg/kg la disminución de la hiperglucemia fue menor, pero aún significativa, y de igual manera se logró un restablecimiento moderado de los niveles de glucosa.



Fig

uras 1 3. Efectos hipoglucemiante del extracto orgánico de *B. veronicifolia* evaluado en ratas normoglucémicas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm E.E.M.$ Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$



Figuras 14. Efectos hipoglucemiante del extracto orgánico de *B. veronicifolia* evaluado en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm E.E.M.M.$ Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$.

De manera adicional, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (OGTT) en animales normoglucémicos (Cheng *et al.*, 2005). Los resultados del efecto de EOBV a la dosis de 100 mg/kg nos indican que el tratamiento con el extracto orgánico íntegro no afecta la absorción o el metabolismo del monosacárido, ya que el abatimiento del pico postprandial que provocó no es significativo con respecto al grupo control. Sin embargo sería deseable explorar este efecto en animales diabéticos (**Figura 15**).

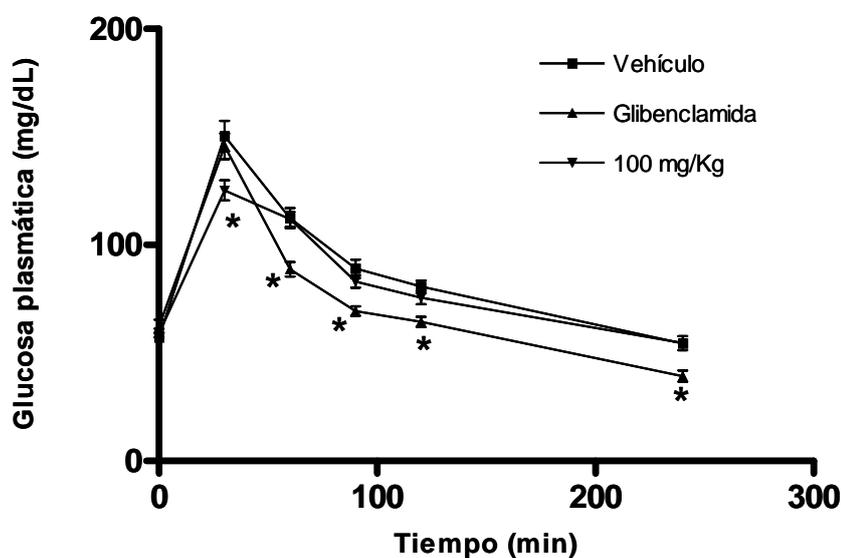
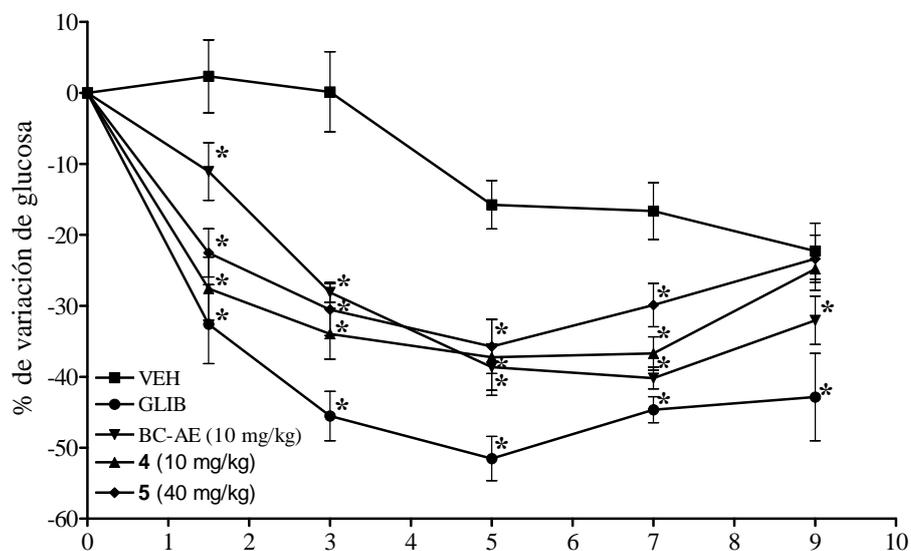


Figura 15. Curva de Tolerancia a la Glucosa (OGTT) luego de la administración del extracto orgánico de *B. veronicaefolia* y glibenclamida en ratas normoglucémicas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm E.E.M.$ Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$

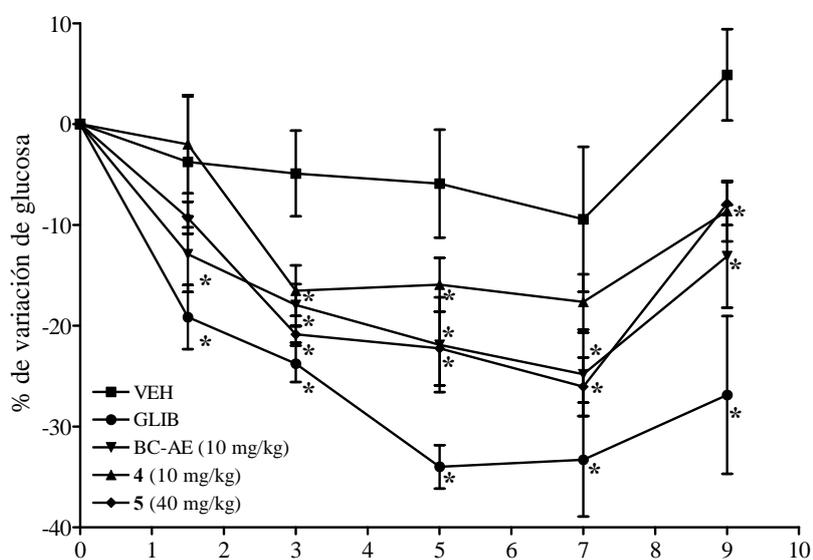
El aceite esencial preparado a partir de las partes aéreas de la especie por hidrodestilación y los metabolitos **24** y **16** se ensayaron también en animales normoglucémicos como diabéticos. Los resultados obtenidos en estas evaluaciones se muestran en las **Figuras 16** y **17**. Los animales normoglucémicos tratados con el aceite esencial a la dosis de 10 mg/kg presentaron una disminución importante de la glucemia, ya que a las siete horas los niveles de glucosa sanguínea habían disminuido en un -40.18 %,

este valor representa el efecto máximo provocado por la administración de la esencia. Estos resultados nos indican la presencia de metabolitos secundarios con una actividad hipoglucemiante en el aceite. La mejor actividad fue observada en animales sanos, mientras que en animales diabéticos el efecto hipoglucemiante fue menor, sugiriendo la posibilidad de que la administración del aceite esencial provoque la liberación de insulina y que por la acción citotóxica de la estreptozotocina el número de células beta este disminuida y por lo tanto la síntesis y liberación de la hormona (Kecskemeti *et al.*, 2002; Doyle y Egan, 2003; Ross *et al.*, 2004).

Los compuestos puros evaluados en este experimento también provocaron una disminución de poco más del 30 % en los niveles de glucosa en sangre; el efecto se observó a las cinco horas después de su administración. Al finalizar el experimento, los grupos tratados con los compuestos mostraron una recuperación en los niveles de glucosa en sangre similar al presentado por el aceite esencial. En los animales diabéticos los mejores efectos hipoglucemiantes se obtuvieron con el compuesto **16** el cual provocó una disminución de la glucemia de cerca del 27 % a las siete horas después de administración intragástrica del tratamiento. Los diferentes reportes que existen del triterpeno **16**, hacen referencia a sus propiedades como agente antiinflamatorio (García-Pérez *et al.*, 2005), anticarcinogénico (Takasaki *et al.*, 1999), quimiopreventivo (Ovesná *et al.*, 2004) antiespasmódico y espasmogénico (Kirimer *et al.*, 1997), por lo tanto, para nuestro conocimiento, este es el primer reporte de las propiedades hipoglucemiantes de este compuesto. Sin embargo, numerosos estudios han comprobado experimentalmente la efectividad del ácido ursólico, un triterpenoide con un esqueleto similar al del acetato de taraxasterilo, en el tratamiento de la diabetes mellitus y padecimiento asociados a la enfermedad (Gao *et al.*, 2008). De esta manera, el ácido ursólico regula la apoptosis en ambientes ricos en glucosa (Oh *et al.*, 2007); estimula la captación de glucosa por incremento en la fosforilación del receptor de insulina (Zhang *et al.*, 2006) y suprime la angiogénesis en pacientes diabéticos con retinopatía no proliferativa (Skopinski *et al.*, 2004).



Figuras 16. Efectos hipoglucemiante del aceite esencial y los compuestos aislados de *B. veronicifolia* evaluado en ratas normoglucémicas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm$ E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$.



Figuras 17. Efectos hipoglucemiante del aceite esencial y los compuestos aislados de *B. veronicifolia* evaluados en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm$ E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$.

5.1.3. Efecto de *B. veronicifolia* sobre la motilidad intestinal en ratones.

Para demostrar *in vivo* el efecto espasmolítico de la planta, se realizó la evaluación del extracto orgánico en la prueba de tránsito gastrointestinal en ratones. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 18**, encontrándose que el extracto íntegro disminuye de manera significativa el tránsito intestinal del carbón activado (Williamson, 1996).

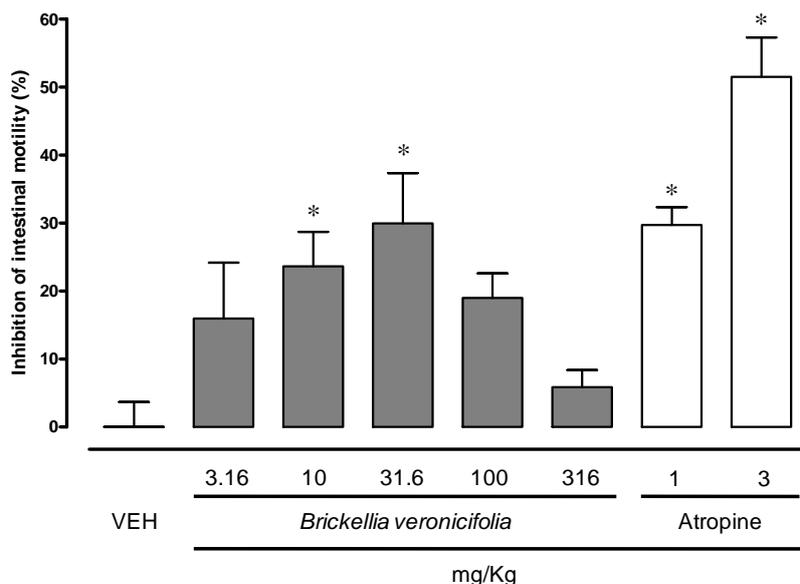


Figura 18. Efecto de *B. veronicifolia* sobre el tránsito intestinal del carbón activado en ratones. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$.

Los resultados de este trabajo pueden tener varias explicaciones, incluyendo el fenómeno de hormesis (Mattson, 2008). Este efecto se ha descrito durante la evaluación de otros extractos vegetales como en el caso de la especie *Scolymus hispanicum*. Coincidentemente, en esa planta el principio activo mayoritario es el acetato de taraxasterilo que también presenta una respuesta bifásica (Kirimer *et al.*, 1997). De cualquier forma, los resultados se encuentran en armonía con los descritos por Rivero Cruz y cols (2005) quienes demostraron que el extracto y compuestos puros a concentraciones menores de 31.6 $\mu\text{g/ml}$, inhibieron las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de manera dependiente de la concentración. Esta prueba nos permitió sustentar

parcialmente el uso popular de ambas especies para el tratamiento de trastornos de la motilidad gastrointestinal.

5.1.4. Efecto gastroprotector de BVEO en el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto.

Como se indico en la sección de antecedentes, uno de los usos más difundidos de *B. veronicifolia* es para el tratamiento de la gastritis. Por tal motivo se decidió evaluar su efecto gastroprotector utilizando el modelo de úlceras inducidas con etanol absoluto (Navarrete *et al.*, 2002; 2005). El extracto orgánico de *B. veronicifolia* presentó un efecto gastroprotector significativo y dosis dependiente en ratas (**Figura 19**). La dosis efectiva media calculada para el extracto íntegro de esta especie fue de 157.9 mg/kg.

Este hallazgo representa el primer reporte de la actividad gastroprotectora de *B. veronicifolia*, lo cual nos indica la presencia de compuestos útiles para el tratamiento de padecimientos de tipo ulceroso. En este sentido, la composición metabólica reportada para la planta incluye la presencia de algunos diterpenos y triterpenos (Calderón *et al.*, 1983), algunos benzoatos de bencilo (Rivero-Cruz *et al.*, 2005; Rivero Cruz *et al.*, 2007), y una gran cantidad de flavonoides, en forma de glicósidos o aglicona (Inuma *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1980 y 1984). De este último grupo de compuestos se tienen varios reportes relacionados con sus propiedades gastroprotectoras, mismas que se evaluaron en distintos sistemas enzimáticos y celulares (*in vitro*) y modelos animales (*in vivo*). En la mayoría de los casos el efecto farmacológico se atribuye a las propiedades antioxidantes de los flavonoides. Sin embargo, sería necesario evaluar los presentes en la planta para comprobar sí el efecto gastroprotector observado se debe a los flavonoides o a otros constituyentes (Zayachkivska *et al.*, 2005; de Lira Mota *et al.*, 2009).

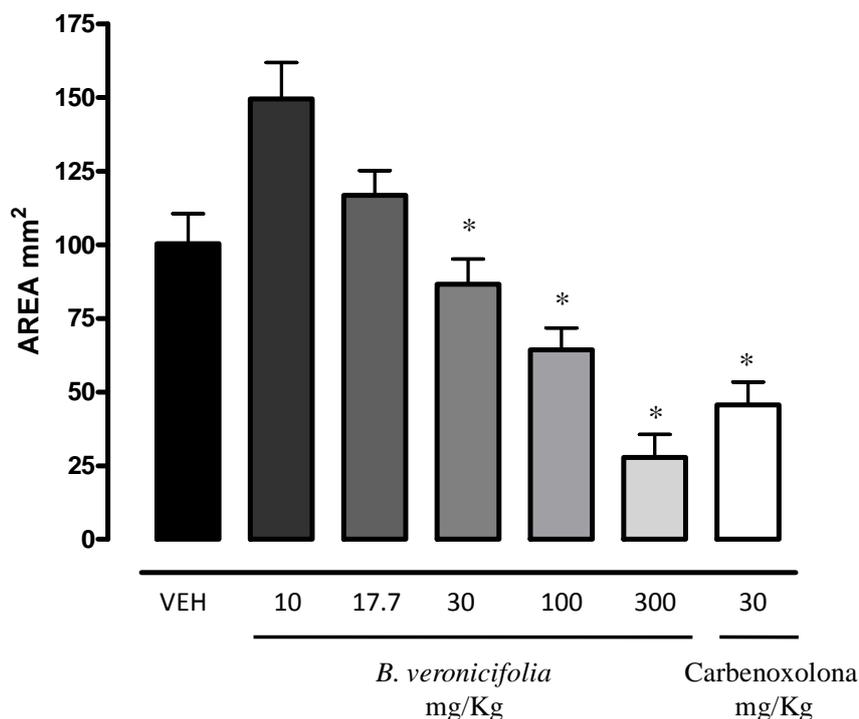


Figura 19. Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. veronicifolia* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$.

5.2. *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray (Asteraceae)

El estudio de *B. cavanillesii* fue más extenso debido a que no se cuenta con estudios farmacológicos o químicos que comprueben su eficacia y seguridad preclínicas o que permitan determinar la calidad de la droga cruda. La investigación de esta especie incluyó:

- Evaluación preliminar de la toxicidad aguda del extracto orgánico de la especie.
- Establecimiento de las pruebas de identidad que incluyeron la caracterización molecular mediante el análisis de la región ITS nuclear, perfiles cromatográficos del extracto orgánico y aceite esencial, además de la determinación del compuesto marcador.

- Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación del principio marcador en el aceite esencial.
- Determinación del potencial antinociceptivo, antidiabético, espasmolítico, gastroprotector y anti-*H. pylori* de los extractos, esencias y algunos compuestos de la especie.

5.2.1. Pruebas de inocuidad de *Brickellia cavanillesii*. Efectos tóxicos agudos

La OMS, a través de varias publicaciones, ha establecido algunas metodologías para evaluar la seguridad de especies medicinales de amplio uso. Por ejemplo, aquellas especies medicinales que no cuenten con reportes bien documentados acerca de su uso medicinal deben seguir los lineamientos de esta organización para la evaluación de su eficacia y toxicidad. En caso de contar con la historia bien documentada acerca de su uso tradicional, el seguimiento de los lineamientos de la OMS es opcional (WHO, 2000). Por lo anterior y a pesar de la documentación histórica que apoya el uso médico de la especie, en este trabajo se estableció la toxicidad aguda preliminar de un extracto orgánico de *B. cavanillesii* utilizando la metodología de Lorke (1983).

El ensayo de Lorke para determinar la toxicidad aguda se realiza en ratones y permite calcular la dosis letal 50 (DL₅₀) utilizando un número pequeño de animales durante un periodo de tiempo relativamente corto. Los resultados de esta prueba permitieron establecer que el extracto orgánico de la droga cruda derivada de *B. cavanillesii* no provoca efectos tóxicos agudos importantes en animales. Durante la realización del experimento, los animales no presentaron un comportamiento distinto a aquellos que sirvieron como control, ni tampoco se observaron daños visibles. Al cabo del ensayo, se realizó la necropsia de los animales y se encontró que los órganos vitales no se afectaron con los distintos tratamientos. Aunque no se calculó la DL₅₀, se puede concluir que su valor es mayor a 5000 mg/Kg y que la planta no presenta efectos tóxicos agudos de acuerdo con los criterios de Lorke (1983).

5.3. Pruebas de identidad

5.3.1. Caracterización molecular de *B. cavanillesii*

La identificación y autenticación inequívoca de las plantas usadas para la producción de fitomedicamentos es un paso importante para el aseguramiento de la calidad de las drogas crudas. Además, estos análisis permitirán detectar la sustitución de materiales vegetales en preparados herbolarios, ya sea intencional o no (Sucher y Carles, 2008). La identificación botánica de las plantas medicinales, tradicionalmente se realiza mediante cuidadosos exámenes microscópicos y macroscópicos de la morfología de las drogas. Este trabajo generalmente debe realizarlo un experto. Sin embargo, en ocasiones no es posible realizar la identificación morfológica debido que el material vegetal ha sido procesado, por lo tanto, deben utilizarse otros métodos para realizar las pruebas de control de calidad. Algunos de estos métodos están basados en el aislamiento y análisis del ADN de la planta. Estos procedimientos se han desarrollado de manera exitosa gracias a la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a la introducción de la ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*. Estas dos herramientas han permitido que los análisis basados en el ADN sean accesibles para trabajar en todos los campos que involucren una matriz viviente. De hecho, los taxónomos moleculares prevén catalogar todas las especies vivas en la tierra usando los llamados códigos de barras (barcode) del ADN, una secuencia de nucleótidos de un fragmento pequeño de material genético.

En este trabajo, mediante el empleo de técnicas de biología molecular, una muestra de planta fresca de *B. cavanillesii* fue procesada en la Universidad de Arkansas U.S.A. para aislar y purificar sus ácidos nucleicos (DNA). El procedimiento utilizado fue el descrito por Schmidt y Schilling (2000) para amplificar por PCR el “DNA internal transcriber spacer” (ITS por sus siglas en inglés). La relevancia de este análisis radica en el hecho de haber generado el primer reporte sobre la secuenciación del ADN de la planta. Estos resultados,

sin duda, serán de gran utilidad para las pruebas de identidad de la planta. La secuencia determinada se incluye en el anexo I.

5.3.2. Establecimiento de perfiles cromatográficos del extracto orgánico y aceite esencial de *B. cavanillesii*

En asociación con la investigación en productos naturales, se han desarrollado numerosas técnicas analíticas para la separación y caracterización prospectiva de los compuestos presentes en el extracto de una especie medicinal. En este sentido, la aplicación de la espectrometría de masas y su acoplamiento a técnicas de separación en fase líquida, como la cromatografía de líquidos (LC-MS) han sido reconocidas como herramientas que han revolucionado el análisis y la caracterización de los productos naturales. Ambas técnicas nos permiten, por un lado, la separación precisa de los compuestos que componen a una mezcla compleja de origen natural, especialmente en pasos múltiples o tándem, y la cuantificación de los analitos con una sensibilidad y una selectividad muy alta (Cheng *et al.*, 2008).

Por lo tanto, para el establecimiento de los principales constituyentes del extracto orgánico íntegro se desarrolló una metodología por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada (CLAE) a Espectrometría de Masas (EM) en la modalidad de Ionización Química a Presión Atmosférica y un Detector de Arreglo de Fotodiodos (HPLC-PAD-APCI/MS).

La combinación de estas técnicas nos permitió obtener un método para el análisis del perfil de compuestos fenólicos del extracto orgánico de *B. cavanillesii*. Para el desarrollo del método fue necesario ensayar varios sistemas de elución. Los mejores resultados se obtuvieron empleando un gradiente lineal de acetonitrilo-agua y la adición de ácido fórmico al 0.1 % (v/v) (**Figura 20**). El tiempo de análisis fue de 30 minutos con un flujo de 0.4 ml/min y una temperatura de 45 °C. El escaneo del espectrómetro de masas se

realizó en la modalidad de ionización negativa con un rango de detección entre 150-800 *umas*. Los compuestos identificados inequívocamente por esta metodología están descritos en la **Cuadro 5**.

La identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto orgánico se logró usando los datos obtenidos del análisis cromatográfico, los espectros de absorción ultravioleta (UV) y los de masas (EM). Estos resultados fueron cotejados, en la mayoría de los casos, con aquellos obtenidos de muestras auténticas e inyectados en el equipo de cromatografía en las mismas condiciones de análisis. Algunos otros fueron identificados por los datos que están reportados en la literatura.

El análisis del extracto orgánico nos condujo a identificar seis metabolitos derivados del ácido cinámico, cinco glicósidos de flavonoides y el cromeno 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno (**40**). En el primer grupo, fue posible identificar a los ácidos clorogénico (**41**), cafeíco (**42**) y diferúlico (**50**), así como al clorogenato de glicerilo (**51**), el ácido 1,3-dicafeoil quínico (**53**) y a la lactona del ácido 3-*O*-feruloil-4-*O*-cafeoil quínico (**57**). En el segundo grupo se identificaron los flavonoides rutina (**43**), hiperósido (**52**) el 3-*O*-rutinosido y 3-*O*-glucosido del kamferol (**54** y **55**) y el 3-*O*-rutinosido de la isoramnetina (narcisina, **56**).

Los derivados del ácido clorogénico **41** y **42** se caracterizaron mediante co-elución con estándares de referencia y por comparación de sus espectros de masas con los descritos previamente (Pedrosa *et al.*, 2000; Kweon *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008) y con las de muestras auténticas que mostraron los picos característicos del ácido clorogénico (353, 191 *m/z*) y el fragmento diagnóstico del ion cafeato (179 *m/z*). Ambos compuestos son ubicuos en frutas, vegetales y plantas medicinales y tienen propiedades biológicas interesantes. De tal forma que son buenos agentes antioxidantes, antidiabéticos, anti-aterosclerosis y antimutagénicos, solo por mencionar algunos (Han *et al.*, 2007; Alonso-Castro *et al.*, 2008; Cristians *et al.*, 2009).

El compuesto **50** fue identificado como el ácido 5,5'-diferúlico; en su espectro de masas este metabolito mostro un pico en una *m/z* de 387, además el peso molecular

obtenido es congruente con la presencia de dos unidades de ácido ferúlico. En su espectro de UV se apreció el máximo de absorción característico de este compuesto (323 nm) (Funk *et al.*, 2005). El patrón de fragmentación mostrado por el compuesto **51** resulto interesante, ya que presenta los fragmentos típicos para el ácido clorogénico (m/z 353 y 179) y también una pérdida de 76 uma que corresponde al grupo glicerilo que esterifica al ácido quínico.

El compuesto **53** se caracterizo como el ácido 2,3-dicafeoilquinico, con base en los criterios desarrollados por Clifford y cols (2005). De acuerdo a Clifford, si el derivado del ácido dicafeoilquinico presenta un ion molecular en una relación de m/z de 515 unidades con una abundancia relativa del 50 %, un pico base en una relación m/z de 353, un fragmento en 335 con una abundancia relativa menor o igual al 30 % y un pico intenso en una relación m/z de 179, el isómero corresponderá a la estructura del 1, 3-dicafeoilquinico (Clifford *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Esta descripción concuerda con el espectro de masas presentado por el compuesto **53**. El último de los derivados del ácido clorogénico identificados en este trabajo fue un compuesto de tipo 1,5 γ -quinolactona, una molécula poco común en la familia de los clorogénicos. El espectro de masas mostro un pico diagnóstico en una relación m/z de 511 correspondiente al ion M-H. De manera adicional, el espectro tiene dos picos en una relación m/z de 353 y de 179 asignables a los ácidos clorogénico y cafeico (Marquez and Farah, 2009).

Los glicósidos de flavonoides **45**, **46**, **48**, **49** y **50** se identificaron empleando sus espectros de masas, ultravioleta y tiempos de retención con aquellos obtenidos de muestras auténticas analizadas en las mismas condiciones que el extracto orgánico.

La rutina (**45**) fue identificada por los picos diagnósticos obtenidos en su espectro de masas, en una relación m/z de 609 y 301, los cuales corresponden a la pérdida del grupo rutinósido y la aglicona quercetina, respectivamente (Püsa *et al.*, 2008). El hiperósido (**46**) fue identificado después del análisis de su espectro de masas, este reveló la presencia de dos fragmentos abundantes en una m/z de 463 y 301. El primero permitió el establecimiento del peso molecular del compuesto y el segundo corresponde a la quercetina, y por lo tanto a la pérdida de la glicona. En el espectro de UV se observaron dos máximos de absorción a

266 y 346 nm (Stobiecki, 2000; Cuyckens y Claeys, 2004; Rijke et al., 2006; Lai et al., 2007).

Los metabolitos **48** y **49** fueron identificados de la misma manera que los descritos anteriormente. Ambos compuestos presentaron en sus espectros de masas un pico con una m/z de 285 correspondiente al núcleo kamferol; la principal diferencia entre ambos espectros es el pico a 593 una asignable al ión molecular de **48** y que concuerda con la pérdida del rutinósido mientras que para el compuesto **49** la presencia de un pico con una m/z de 447 m/z que corresponde al ion molecular del compuesto y también exhibe la pérdida de 162 una asignable a la una unidad de glucosa(Stobiecki, 2000; Cuyckens y Claeys, 2004; Rijke et al., 2006; Lai et al., 2007).

Por último, el espectro de masas obtenido para el compuesto **50** concuerda con los datos reportados para el flavonoide el 3-*O*-rutinosido de la isoramnetina. Este presenta dos picos principales: el ión molecular con una m/z de 623 y el pico base de 315 m/z debido a la pérdida del grupo rutinósido (Krasteva y Nikolov, 2008).

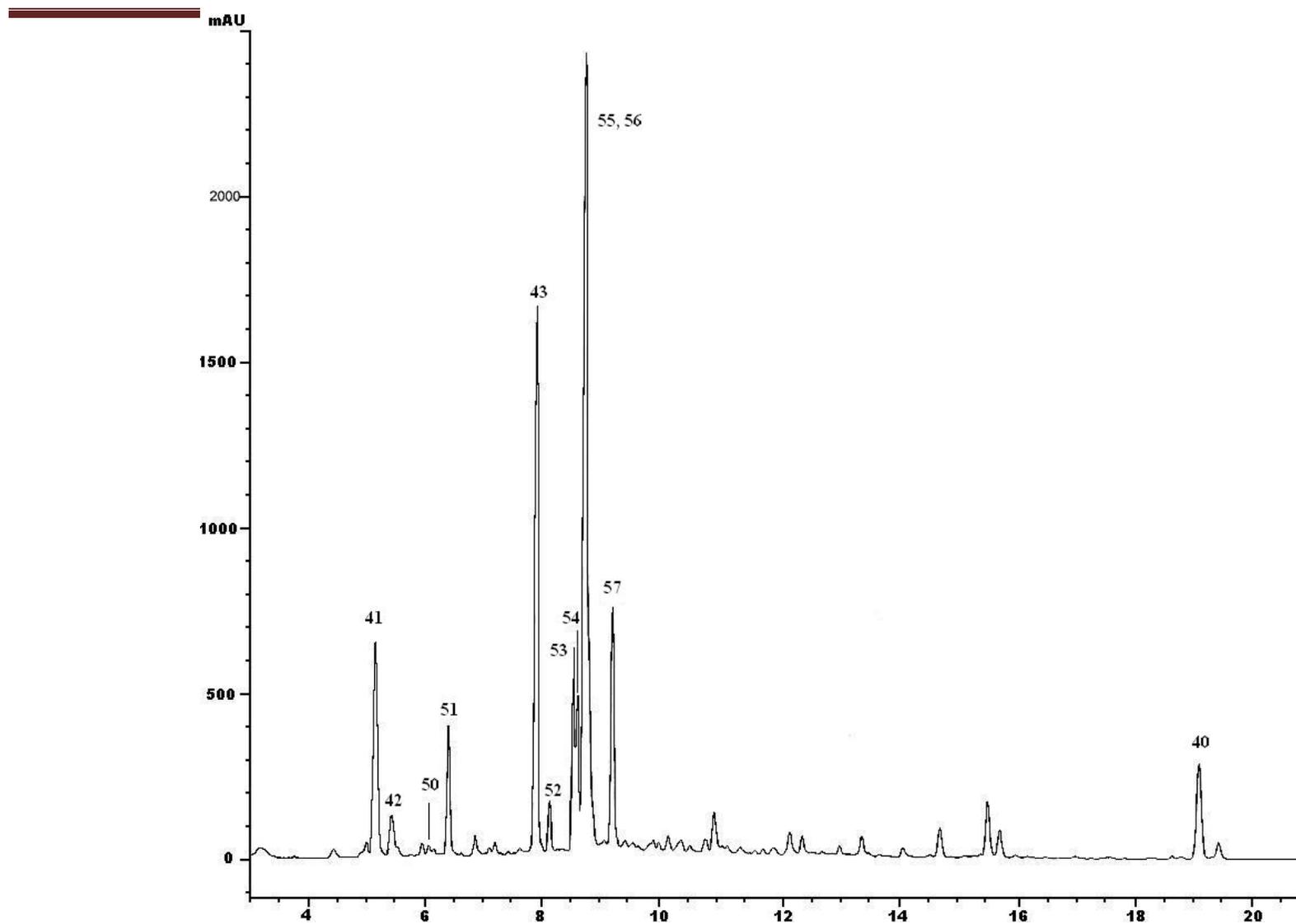
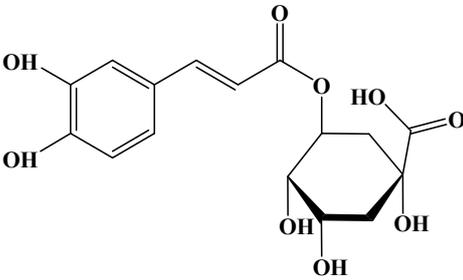
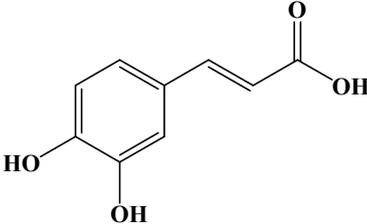
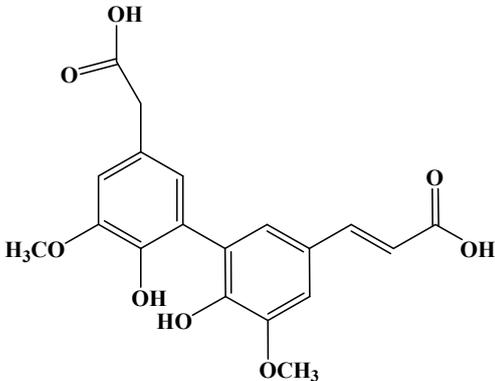
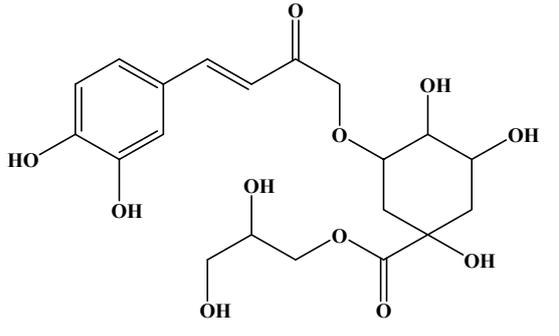
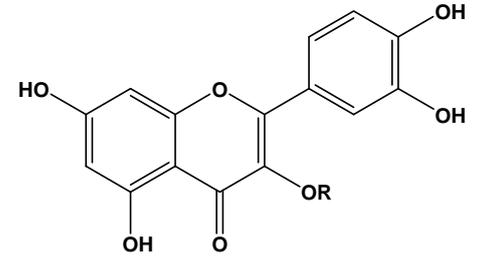
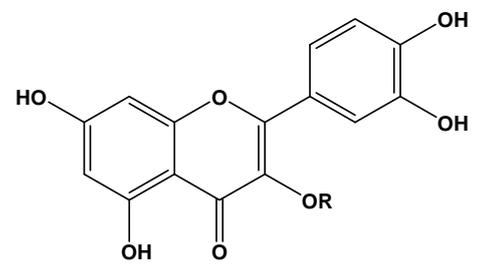
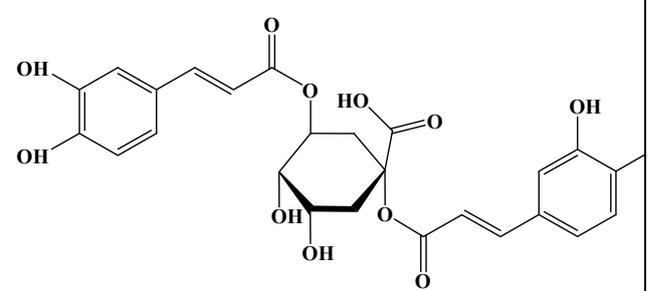
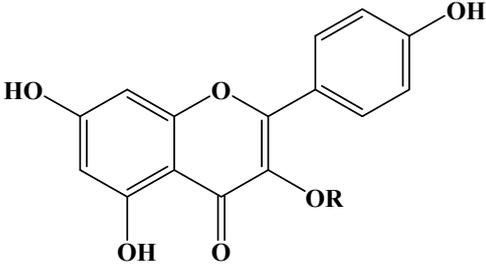
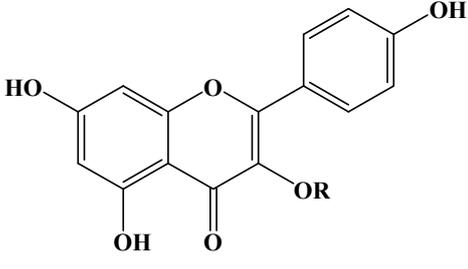
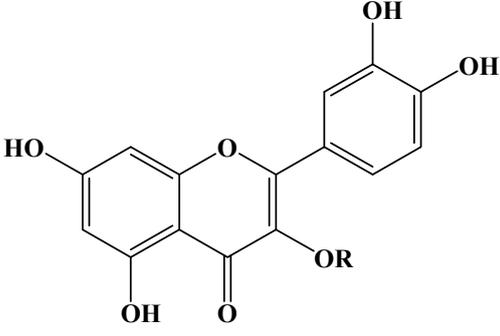


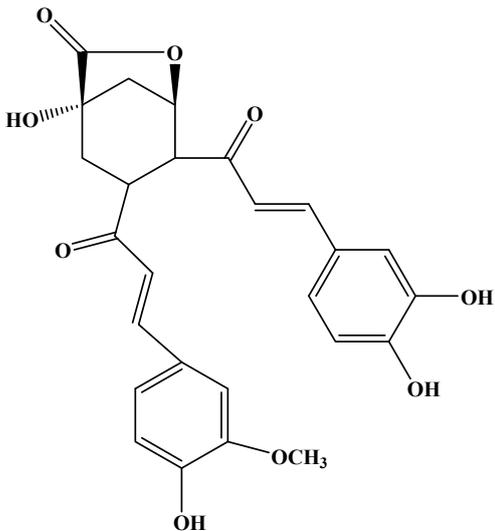
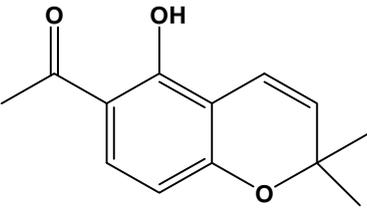
Figura 20. Cromatograma obtenido por HPLC-PDA/APCI-MS del extracto orgánico de *B. cavanillesii*

Cuadro 5. Compuestos fenólicos identificados en el extracto orgánico íntegro de *Brickellia cavanillesii* mediante HPLC HPLC-DAD-APCI/MS.

No	R _t (min)	Fragmentos (m/z)	Compuesto	λ _{max} (nm)
41	5.2	353 (10), 191 (100)	 <p>Ácido clorogénico</p>	298 325
42	5.5	179 (100)	 <p>Ácido cafeíco</p>	323 303
50	6.2	387 (100)	 <p>Ácido diferúlico</p>	298 325

51	6.4	429 (10), 353 (20), 179 (100)	 <p style="text-align: center;">Clorogenato de glicerilo</p>	298 325
43	7.8	609 (100), 301 (10)	 <p style="text-align: center;">R = ramnosido</p> <p style="text-align: center;">Rutina</p>	255 350
52	8.1	463 (100), 301 (40)	 <p style="text-align: center;">R = galactosido</p> <p style="text-align: center;">Hiperósido</p>	266 346
53	8.5	515 (50), 353 (100), 179 (20)	 <p style="text-align: center;">Ácido 1,3-dicafeoliquínico</p>	298 325

54	8.6	593 (100) 425 (15), 285 (10)	 <p data-bbox="738 533 1082 562">3-O-rutinosido del Kamferol</p>	265 345
55	8.725	447 (100) 285 (10)	 <p data-bbox="743 1010 1078 1039">3-O-glucosido del Kamferol</p>	265 345
56	8.725	623 (100) 315 (10) 300 (5)	 <p data-bbox="703 1480 1118 1509">3-O-rutinosido de la Isoramnetina</p>	255 270 355

57	9.2	511 (10) 353 (100) 191 (5) 179 (5)	 <p>Lactona del ácido 3-<i>O</i>-feruloil-4-<i>O</i>-cafeoilquínico</p>	298 325
40	19.07	217 (100) 215 (5)	 <p>6-Acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2<i>H</i>-cromeno</p>	265 304

El extracto íntegro se fraccionó de manera preliminar mediante sucesivas particiones con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol acuoso. También se preparo un aceite esencial.

La fracción primaria restante de la partición con hexano (**FH**) y el aceite esencial fueron analizados por la misma técnica que el extracto. Los perfiles se indican en la figura X. Como se puede apreciar, en ambos, el producto mayoritario fue el cromeno **40**. Como se discutirá en la sección 4.3.4. tanto la fracción **FH** como el aceite esencial mostraron el mejor efecto contra la bacteria *H. pylori*. Este hallazgo permite proponer al cromeno como compuesto marcador de la especie.

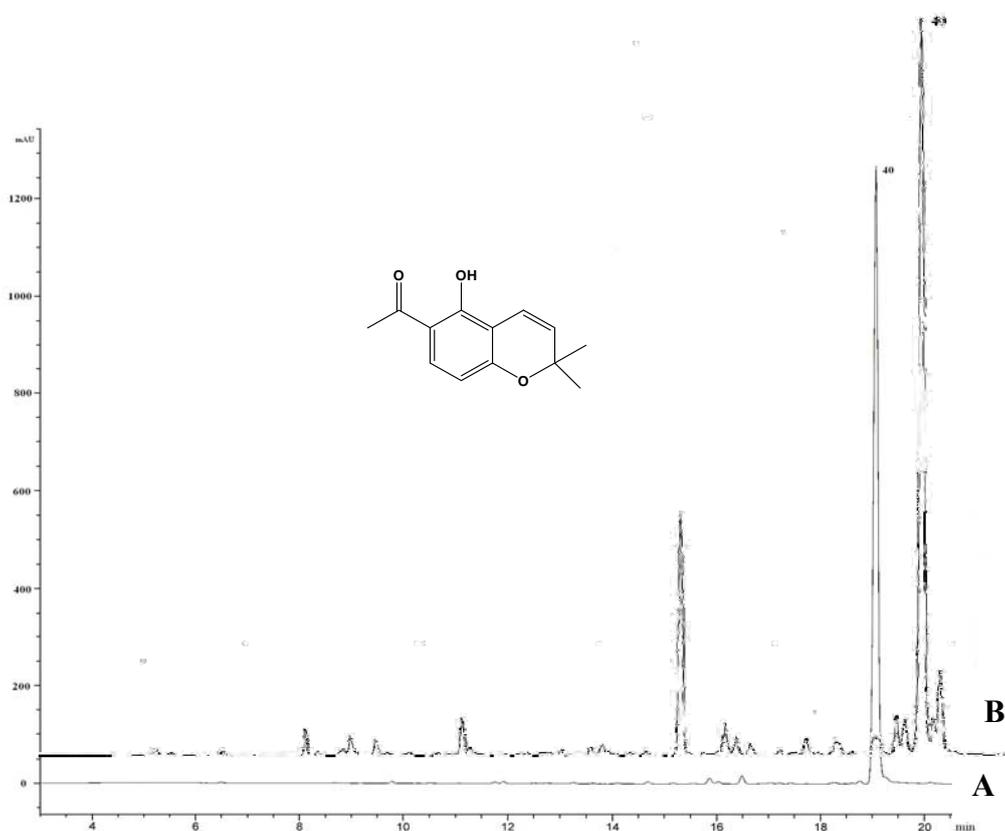


Figura 22. Cromatogramas del aceite esencial (**A**) y de la fracción primaria hexánica (**B**) realizados por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia acoplada a Espectroscopia de Masas en la modalidad de Ionización Química a Presión Atmosférica y un Detector de Arreglo de Fotodiodos

5.3.3. Identificación de los compuestos mayoritarios de la esencia por CG-EM

El análisis realizado mediante una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió generar el perfil cromatográfico que se indica en la figura X:

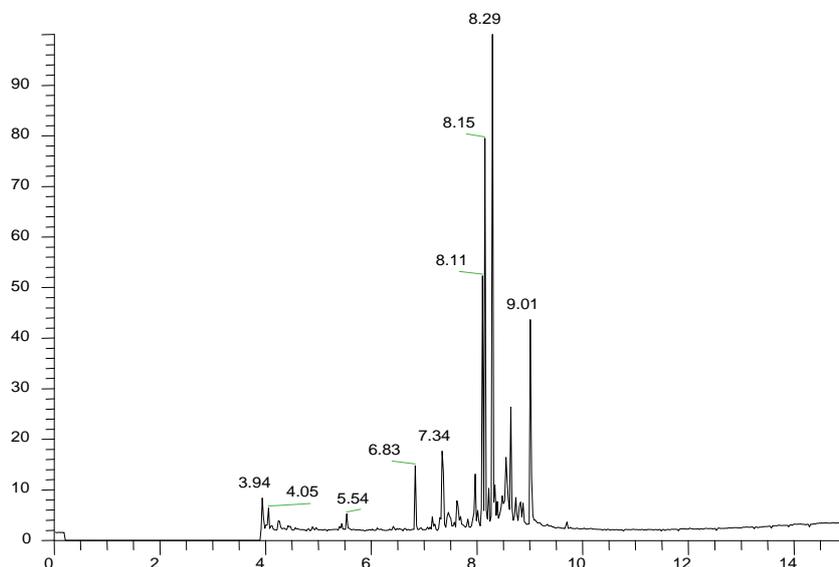


Figura 22. Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. cavanillesii*

Los componentes de la esencia (**Cuadro 6**) fueron caracterizados por comparación de los espectros de masas generados con los de una base de datos del equipo o con aquellos de muestras auténticas. Así mismo, el compuesto **40**, el cariofileno y el óxido de cariofileno fueron identificados mediante la técnica de coelución.

Cuadro 6. Metabolitos secundarios caracterizados mediante CG-EM en la esencia de <i>B. cavanillesii</i> .		
t_r (min)	Compuesto	PM (g/mol)
6.83	Cariofileno	204
7.34	Curcumeno	202
8.11	(-) Espotulenol	220
8.15	Oxido de cariofileno	220
8.29	Carotol	204
9.01	6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno	218

5.3.4. Aislamiento del compuesto **40**, marcador de la especie *B. cavanillesii* y caracterización.

Con la finalidad de aislar el compuesto mayoritario de la fracción hexánica, se realizó su fraccionamiento por cromatografía en columna abierta. Mediante este proceso el compuesto **40** precipitó como un sólido cristalino verde-amarillo, en gran cantidad (1.2 g), el cual presentó un punto de fusión de 102 °C. Para identificar este sólido, se registraron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . Este compuesto se caracterizó como el 6-acetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2*H*-cromeno, el cual fue descrito previamente por Rodríguez-López y cols. (2006). Las constantes físicas y espectroscópicas concuerdan con las reportadas por estos autores.

Considerando que el compuesto **40** es una sustancia químicamente definida y característica para algunos géneros de la familia asteraceae, se puede proponer al mismo como el compuesto marcador de la especie y por lo tanto de utilidad para propósitos analíticos.

5.3.5. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación del compuesto activo marcador **40** en la esencia

Considerando que el producto marcador **40** es el principio mayoritario del aceite esencial y el extracto íntegro, se decidió desarrollar un método para cuantificar el contenido del mismo en el aceite esencial. Se escogió el aceite esencial en primera instancia por la menor complejidad que presentaba su cromatograma de líquidos de alta resolución. El compuesto utilizado como estándar durante el desarrollo del método analítico fue aislado de la misma especie y tiene una pureza del 99% de acuerdo a los análisis realizados por RMN, IR y Cromatografía de Gases acoplada a EM. Para la validación del método se procedió de acuerdo a los lineamientos establecidos por la FDA. Los parámetros considerados incluyen: selectividad, linealidad del sistema y del método, límite de detección y cuantificación, entre otros.

En el presente estudio, los parámetros de calidad evaluados de acuerdo a las Guías de Validación publicadas por la FDA (ICH Q2 (R1), 2005).

5.3.5.1. Selectividad

Un método es selectivo cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se relaciona únicamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en una muestra de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). La selectividad se determinó comparando los cromatogramas obtenidos al UV en un barrido comprendido entre 210 a 400 nm (Figuras X) de tres muestras correspondientes al estándar (10 µg/mL), a la matriz de trabajo (250 µg/mL) y a la matriz de trabajo enriquecida con el estándar a la concentración de 1 µg/mL. Estos resultados indican que la respuesta es debida sólo a la presencia de la cromeno (40).

5.3.5.2. Linealidad del sistema

Se dice que el sistema es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con cinco diferentes niveles de concentración (100 a 1000 µg/mL), que comprenden un rango entre el 50 y 400% de la concentración estimada como el 100%, mediante la realización de ensayos preliminares con diferentes muestras del aceite. Los resultados de estos experimentos se resumen en la **Cuadro 7** y se ilustran en la **Figura 24**.

El método analítico desarrollado es lineal en el rango de concentraciones analizadas, ya que cumple con los criterios de aceptación especificados en la guía de validación ICH Q2 (R1) (2005). Así, la magnitud del coeficiente de determinación (R^2) fue mayor de 0.98 y el intervalo de confianza de la pendiente (IC (β_1)), no incluyó al cero.

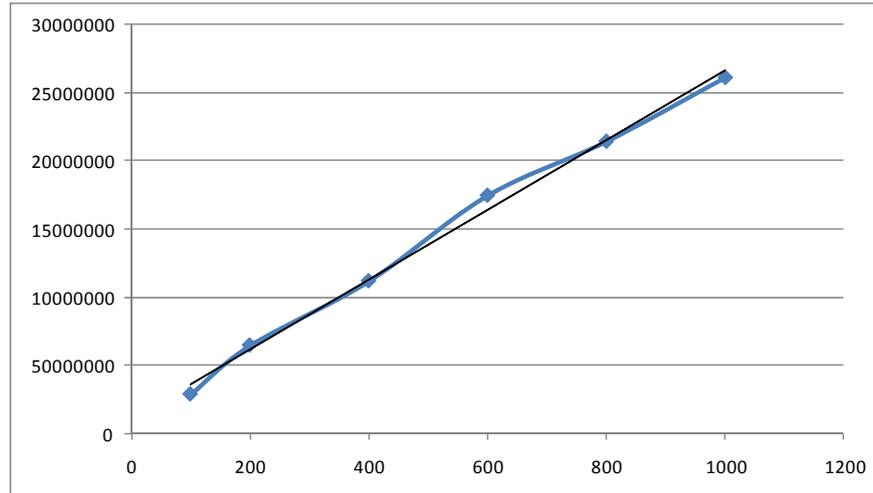


Figura 24. Curva de calibración para la cuantificación del compuesto **40** y el establecimiento de la linealidad del sistema.

Cuadro 7. Valores experimentales obtenidos para la construcción de la curva de calibración del compuesto **40**.

Solución	Concentración (µg/mL)	Área (µV*s)	Estadístico	Resultado
1	1000	256726903	b_1	256713.913
2	1000	259808910	b_0	9834489.46
3	1000	266991120	R	0.9994
4	800	211113488	R^2	0.994
5	800	220281026	IC (β_1)	267941.473-245486.352
6	800	211558804		
7	600	171672036		
8	600	178718254		
9	600	173368130		
10	400	112342371		
11	400	110644099		
12	400	112252817		
13	200	63762785		
14	200	64384885		
15	200	65206477		
16	100	27895023		
17	100	28221980		
18	100	29511090		

5.3.5.3. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005; WHO, 2007). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de una curva de calibración con cinco niveles de concentraciones comprendidas entre un rango de 10 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados obtenidos se resumen en la **Cuadro 8** y en la **Figura 25**.

Cuadro 8. Valores experimentales obtenidos para la construcción de la curva del límite de cuantificación y límite de detección del compuesto **40**.

Solución	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Estadístico	Resultado
1	100	34884961	b_1	256713.913
2	100	35732652	b_0	9834489.46
3	100	36350690	R	0.9994
4	80	30765518	R^2	0.994
5	80	30791713	IC (β_1)	267941.473-245486.352
6	80	31369884		
7	40	18101027		
8	40	19438456		
9	40	19176427		
10	20	13514665		
11	20	13794860		
12	20	14311494		
13	10	10003121		
14	10	10061438		
15	10	10138655		

Así, utilizando los parámetros estadísticos resumidos en la **Cuadro 8** y utilizando las fórmulas indicadas en el inciso **3.8.3** de la sección experimental, los valores del límite de detección y de cuantificación calculados fueron 6 y 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

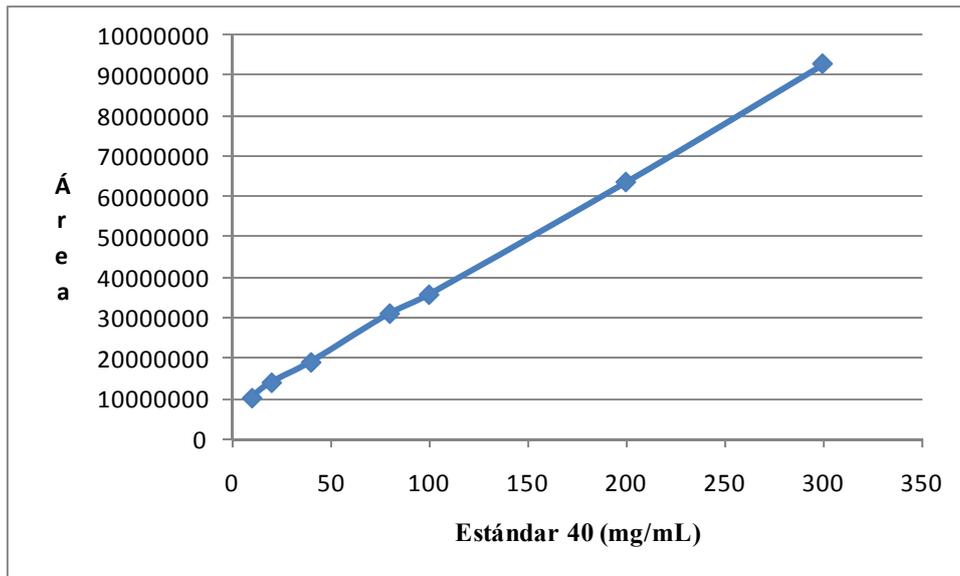


Figura 25. Curva de calibración para el cálculo del límite de detección y límite de cuantificación del compuesto **40**.

5.3.5.4. Linealidad del método y exactitud

Se dice que un método es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito adicionado en la muestra objeto de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007). La linealidad del método se evaluó a partir de la curva de calibración construida a partir de disoluciones de la matriz de trabajo enriquecidas con una muestra estándar del compuesto (**40**). Las cantidades de estándar que se adicionaron a la matriz fueron 125, 250 y 375 $\mu\text{g/mL}$ de compuesto (**40**), que representan el 50, 100 y 150 % del analito, respectivamente.

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia (cantidad utilizada para enriquecer la matriz) (Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007).

Cuadro 9. Valores experimentales obtenidos para el porcentaje de recobro para estimar la linealidad y exactitud método con el estándar 40.

Solución	Nivel	Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Área ($\mu\text{V}^*\text{s}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% recobro
1	150	375	48553472	373.27	99.54
2	150	375	49670678	385.87	102.9
3	150	375	49556072	384.37	102.5
4	100	250	82025437	248.75	99.5
5	100	250	80478748	251.25	100.5
6	100	250	80611357	252.5	101
7	50	125	94368274	124.9	99.9
8	50	125	95247040	125.7	100.5
9	50	125	97295222	128.1	102.5

Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en la tabla anterior. Estos resultados indican que el promedio del porcentaje de recobro (100.38%) se encuentra dentro del rango establecido para un método cromatográfico (98-102 %) y el intervalo de confianza calculado (96.9-101.2%) incluye el 100%. Por lo tanto, el método analítico es exacto en el rango de concentraciones ensayadas.

5.3.5.5. Precisión del método

La precisión de un sistema o método analítico se refiere a la concordancia entre las respuestas analíticas individuales que resultan de varias estimaciones de la concentración de un analito, en una misma solución homogénea, bajo las mismas condiciones de análisis. La precisión se debe calcular considerando la dispersión de los datos individuales con respecto a la media y se expresa como desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

En el presente trabajo, la precisión fue determinada en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad es la medida de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un solo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analistas, equipos o días de análisis (García *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2004; ICH Q2 (R1), 2005, WHO, 2007).

La repetibilidad se evaluó a través de la respuesta analítica de seis soluciones con una concentración aproximada del compuesto (**40**) de 250 µg/mL. Este análisis se realizó por duplicado (**Cuadro 10**). Los parámetros estadísticos evaluados en este análisis fueron: Media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV).

El coeficiente de variación (CV) calculado para este análisis fue de 0.85 % (criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$) con lo que se concluye que el método analítico es preciso (Guía de Validación Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002).

Cuadro 10. Valores experimentales de repetibilidad obtenidos para el analista uno y estimar la precisión del método con el estándar **40**.

Solución	Área (µV*s)
1	75663753
2	75715747
3	76380684
4	74955777
5	76839832
6	75984769

La precisión intermedia (**Cuadro 11**) se evaluó mediante el análisis de seis muestras independientes (250 µg/mL) en dos días y por dos analistas diferentes.

Los resultados estadísticos obtenidos: Media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) nos permiten concluir que el método es preciso (criterio de aceptación: $CV \leq 2\%$)

Cuadro 11. Valores experimentales obtenidos para los analistas uno y dos para el cálculo de la precisión intermedia del método con el estándar **40**.

		Analista	
		1	2
Día	1	87604076	87078681
		86696402	85352370
		85396924	84231191
	2	84254948	82922950
		84243431	83844842
		86024720	83862884
promedio		85639156.2	84548819.7
D. E.		1491763.8	1466719.1
C.V.		1.74	1.73

5.3.5.6. Estabilidad

El objetivo de los estudios de estabilidad es establecer la posible variación de la concentración de una muestra en un tiempo determinado y bajo la influencia de la temperatura y condiciones de almacenaje (NOM-073-SSA1-2005). Para la validación de un método es deseable que esta concentración solo varíe en un rango $\leq 2\%$.

La estabilidad de las muestras de análisis se evaluó bajo condiciones de refrigeración (-4°C), a temperatura ambiente y a 37°C . Los resultados son expresados como la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje, respecto de la media aritmética del análisis inicial (**40**). Una muestra se considera

estable cuando el valor de $|40| \leq 2\%$. Estos análisis se realizaron en dos períodos, siete y quince días, y se resumen en la **Cuadro 12**.

Cuadro 12. Resultados de la evaluación de estabilidad representados por $|d_i|$

Solución estándar del cromeno (10)	40 (%)					
	7 días			15 días		
	-4°C	37°C	Ambiente	-4°C	37°C	Ambiente
	0.35	0.83	0.33	0.68	1.03	0.84

En base a los resultados obtenidos, así como los análisis cromatográficos realizados a cada una de las muestras, indican que, todas las muestras son estables al no presentar descomposición o degradación química del compuesto marcador. De manera adicional, los cromatogramas resultantes del análisis de todas las muestras no mostraron picos adicionales.

5.3.5.7. Cuantificación del compuesto 40 en tres lotes diferentes de *B. cavanillesii*

Una vez validado el método analítico se procedió a cuantificar el contenido del compuesto 40 en tres distintos lotes de aceite esencial de *B. cavanillesii* (Lotes I-III), utilizando el método recién desarrollado y validado. Los resultados se resumen en la **Cuadro 13**.

Las muestras se prepararon de la misma forma que el aceite con el cual se desarrollo el método analítico. Todos los lotes fueron colectado e identificados por el Dr. Robert Bye del Instituto de Biología. Como se desprende de los resultados, la cantidad del compuesto 40 cuantificado en los lotes I y III fueron muy cercanos entre ellos, sin embargo, la cantidad presente en el lote II fue menor, esto puede deberse a varios factores.

Cuadro 13. Cuantificación del compuesto **40** en los Lotes I-III de material vegetal.

Muestra	Cantidad de Analito (mg/100g)
Lote I B&L34567 Ecatzingo, Edo. México	2.324
Lote II B&L34572 San Miguel Atlautla, Edo. México	0.167
Lote III B&L34570 Yecapixtla, Morelos	2.522

5.4. Pruebas de eficacia

Las pruebas de eficacia a las que se sometió el extracto orgánico de *B. cavanillesii* consistieron en la evaluación de su efecto antinociceptivo, antidiabético y gastroprotector; de igual forma, se estudiaron las propiedades antiespasmódicas y el potencial para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivo y gram negativo, incluyendo a *H. pylori* del extracto orgánico y aceite esencial de la planta. A continuación se describen los resultados de estas evaluaciones:

5.4.1. Potencial analgésico del extracto orgánico íntegro en ratones

El efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *B. cavanillesii* fue evaluado utilizando las mismas pruebas descritas para la especie *B. veronicifolia*; los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 26**.

La administración oral del extracto orgánico (100-794 mg/kg) a los animales de experimentación, provocó una disminución en el número de estiramientos producidos por el tratamiento químico algésico (ácido acético 0.6 % v/v). A partir de las dosis de 316 mg/kg, en la prueba de la placa caliente se observó en los animales de experimentación un aumento en la latencia de respuesta al estímulo térmico.

Como se desprende de los resultados, el extracto orgánico mostró una actividad antinociceptiva significativa en ambos modelos que bien puede contribuir al efecto terapéutico de la planta y que corrobora la presencia de agentes antinociceptivos en la planta. Los flavonoides caracterizados en la planta pueden ser los principios responsables de estos efectos ya que en estudios previos se demostró que algunos de

estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Por ejemplo, se ha reportado que el kamferol y algunos de sus derivados son potentes inhibidores de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), enzima que participa en la respuesta inflamatoria; el mismo flavonoide ha demostrado tener potente actividad inhibitoria sobre la liberación de oxido nítrico (NO) y la expresión de la iNOS. Por otro lado, el 3-*O*-soforosido del kamferol- obtenido de las hojas de *Cassia alata* demostró actividad analgésica en las pruebas de “tail flick”, de inmersión y en la de estiramiento abdominal en ratones y ratas. También el kamferol y el 3-*O*-glucosido del kamferol poseen propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias relevantes *in vivo* ya que inhibieron la inducción del edema plantar inducido con carragenina, la formación del edema en inducido con xileno en oreja de ratón; además de disminuir los estiramientos inducidos con ácido acético (Parveen *et al.*, 2007). Otro flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza es la quercetina, este compuesto posee propiedades biológicas interesantes y ha sido ampliamente estudiado. En varios reportes se ha demostrado que este compuesto inhibe la respuesta nociceptiva en varios modelos animales de dolor (Rylski *et al.*, 1979; Picq *et al.*, 1991; Cechinel Filho *et al.*, 1996; Anjaneyulu and Chopra, 2004; Toker *et al.*, 2004; Comalada *et al.*, 2005; Kauer *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2009). De manera adicional, en estudios clínicos, la quercetina también ha sido efectiva en estudios piloto contra el síndrome de la vejiga dolorosa y la cistitis intersticial (PBS/IC), una enfermedad con etiología desconocida y que se caracteriza por una presión y dolor severos en el área de la vejiga o la región baja de la pelvis (Theoharides, 2007). De la misma forma, el derivado galactosídico de la quercetina, el hiperosido, presente también en el extracto orgánico de *B. cavanillesii*, ha demostrado propiedades analgésicas relacionadas con la reducción del influjo de calcio en las terminales de los nervios aferentes sin una acción anestésicas significativas (Chen *et al.*, 1989).

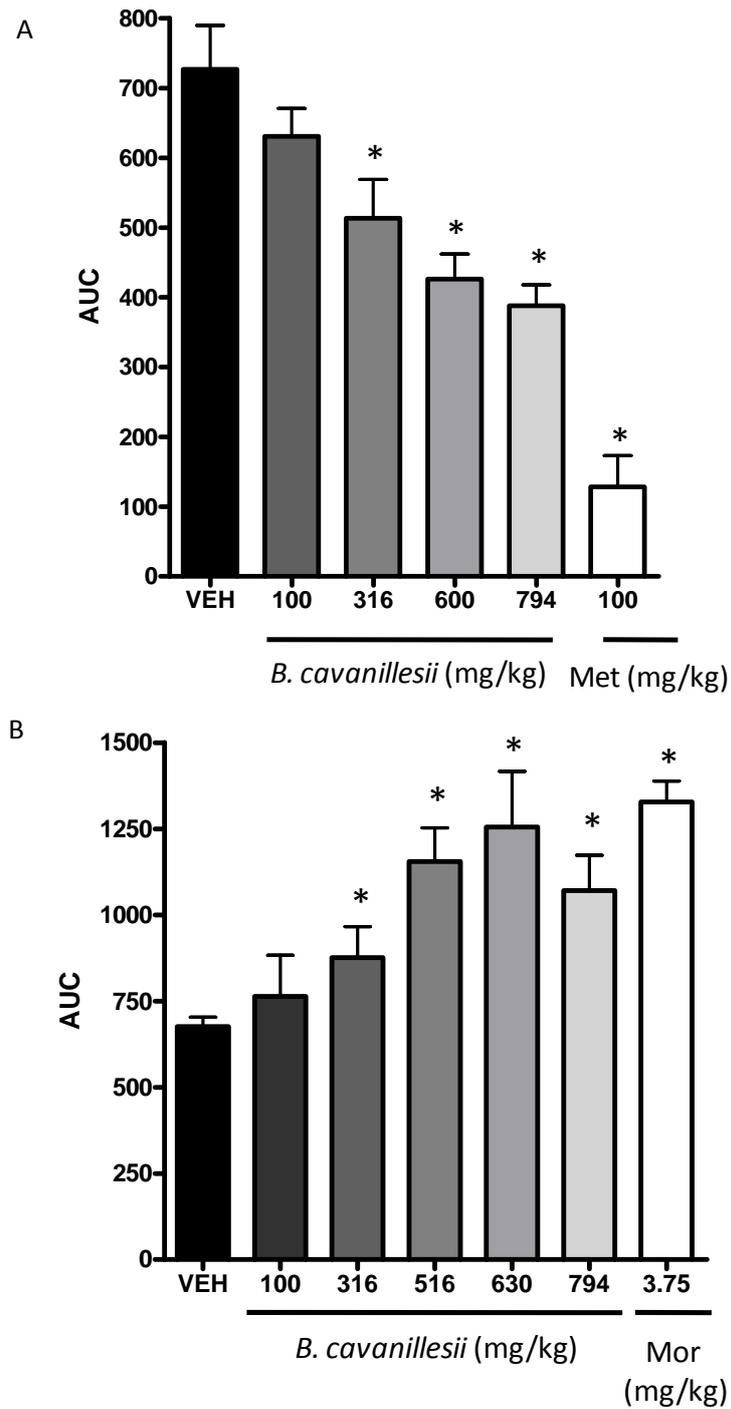


Figura 26. Efecto antinociceptivo del extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (1:1) de *Brickellia cavanillesii* (BCEO) en ratones. En la gráfica A se presenta el número de contorsiones-estiramientos totales y en la gráfica B la latencia de respuesta al estímulo térmico en la prueba de la placa caliente. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n = 6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba de t-Dunnet. * $p < 0.05$.

Los otros compuestos polifenólicos detectados en el extracto también presentan propiedades antiinflamatorias y analgésicas. Así, mediante evidencias epidemiológicas, se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en polifenoles reduce la incidencia de cáncer, enfermedades de tipo coronarias e inflamatorias, específicamente el ácido clorogénico, y antinociceptivos *in vitro* e *in vivo*. Dos Santos y colaboradores demostraron las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de este ácido fenólico en ratas utilizando las pruebas del edema plantar inducido con carragenina y la formalina. El CGA inhibió la formación del edema plantar a las dos horas después de la administración del tratamiento y también disminuyó el número de levantamientos o fliches de la pata tratada con formalina en la segunda fase de la prueba, en la cual se ha demostrado la generación de un proceso inflamatorio (Dos Santos *et al.*, 2006; Le Bars *et al.*, 2001). Por lo anterior, se deduce que el efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *B. cavanillesii*, se debe a la acción de los compuestos polifenólicos identificados.

5.4.2. Evaluación del potencial antidiabético del extracto orgánico

Para la evaluación del potencial antidiabético del extracto orgánico de *B. cavanillesii* se utilizó un protocolo similar al de *B. veronicifolia*.

Los resultados obtenidos de la acción hipoglucemiante en animales normoglucémicos permitieron evidenciar que a las dosis evaluadas (10-300 mg/kg) los niveles de glucosa sanguínea disminuyen significativamente. El mejor efecto se obtuvo a las 7 horas después de administración a una dosis de 10 mg/kg del extracto.

Sin embargo, la administración del extracto (10-300 mg/kg) a ratas diabéticas provocó solo una disminución moderada (-25%) de los niveles de glucosa sanguínea, a las 9 horas después del tratamiento indicando que el efecto hipoglucémico del extracto es moderado.

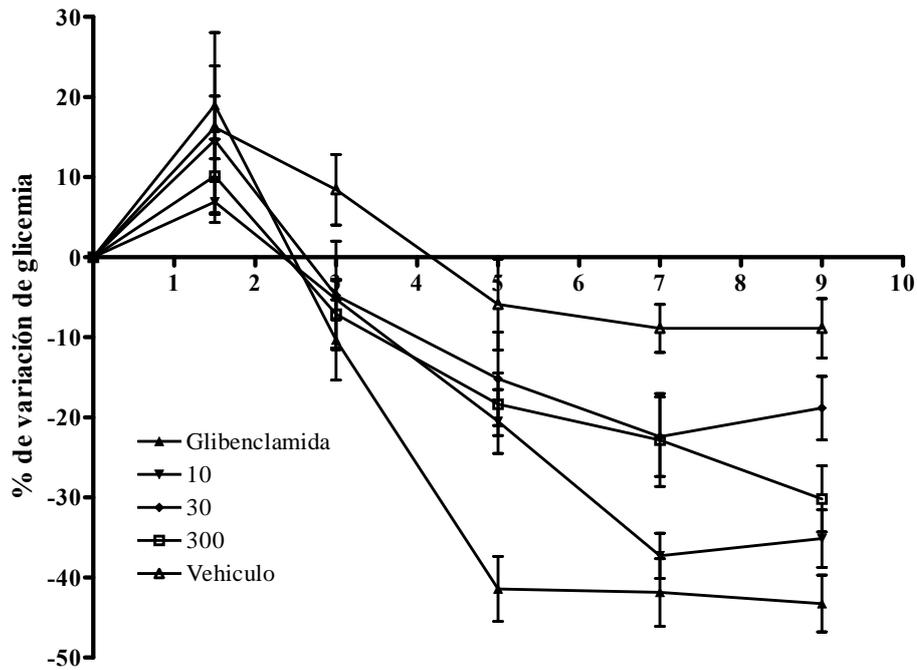


Figura 27. Efectos hipoglicemiante del extracto orgánico de *B. cavanillesii* evaluado en ratas normoglicémicas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm E.E.M.$ Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$

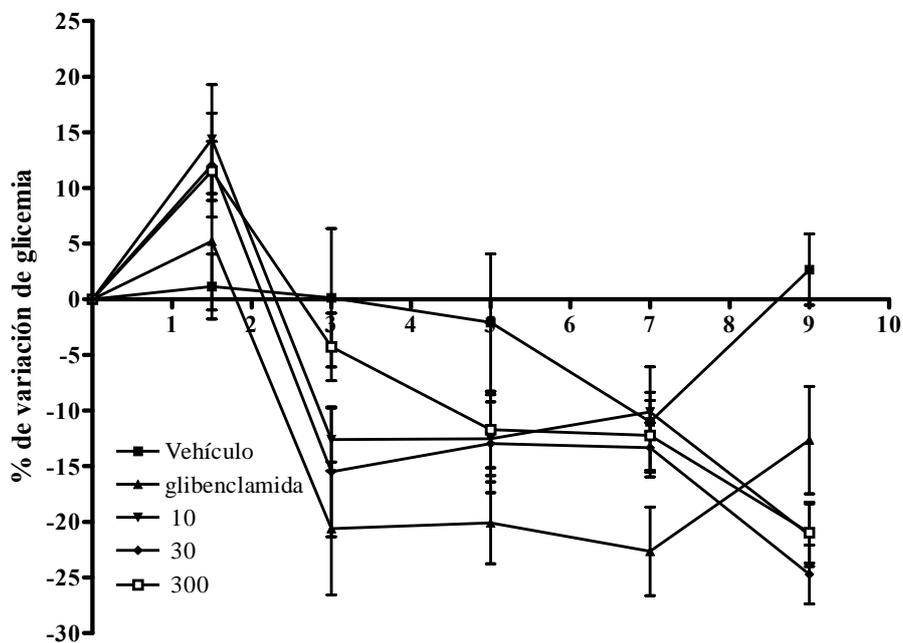


Figura 28. Efectos hipoglicemiante del extracto orgánico de *B. cavanillesii* evaluado en ratas diabéticas. Cada punto representa la media de $N=6 \pm E.E.M.$ Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas con un análisis ANADEVa seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$

La presencia de flavonoides como la quercetina y de polifenoles como el ácido clorogénico presente en los extractos de *B. cavanillesii* es de gran importancia para explicar el efecto hipoglucemiante. Varios reportes indican la utilidad de estos compuestos en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. Por ejemplo, la administración de quercetina a la dosis de 1 g/Kg como parte de la dieta de animales diabéticos mejora su estado físico. El volumen de orina, los niveles de glucosa urinaria y sanguínea disminuyeron hasta en un 25 % después de un periodo de ayuno. La disminución del estrés oxidante (Bopana *et al.*, 1987; Jang *et al.*, 2001) así como el incremento en la secreción de insulina o la captura de glucosa provocada por la quercetina también pueden estar relacionadas con uso de la planta como agente antidiabético (Bradharst *et al.*, 2000). La quercetina también inhibe a la aldosa reductasa, enzima clave en la transformación de la glucosa a sorbitol en la ruta de los polioles. En condiciones normales la enzima tiene poca afinidad por su sustrato, la glucosa; por lo tanto, su conversión a sorbitol es muy baja, sin embargo, en una condición diabética la disponibilidad de este sustrato es muy alta, particularmente en el ojo, nervio óptico y en la retina incrementando la formación de sorbitol, un producto muy poco difusible a través de las membranas celulares. Su acumulación es la causa de complicaciones tales como la formación de cataratas, neuropatía y retinopatía (Matsuda *et al.*, 2002). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto la quercetina como el kamferol, aislados de *Euonymus alatus*, una planta medicinal china de amplio uso para el tratamiento de la diabetes, mejoran de manera significativa la captura de glucosa inducida por insulina en adipocitos maduros 3T3-L1. Experimentos adicionales también demostraron que ambos compuestos actúan como agonistas parciales débiles del receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), aunque a diferencia de los agonistas tradicionales, estos dos compuestos no promueven la diferenciación de los pre-adipocitos 3T3-L1. De igual forma, la presencia del ácido clorogénico, un metabolito cuyas propiedades antidiabéticas han sido ampliamente descritas en la literatura, podría contribuir al efecto hipoglucemiante de *Brickellia cavanillesii* (Cristians *et al.*, 2009). En síntesis, estos hallazgos pueden explicar los efectos benéficos de la planta en un estado diabético (Fang *et al.*, 2008).

5.4.3. Efecto sobre la motilidad gastrointestinal del extracto orgánico (BC-EO), aceite esencial (BC-AE) y las fracciones derivadas de la infusión (IFD e IFA)

El potencial espasmolítico de esta *B. cavanillesii* también se determinó mediante la prueba de tránsito intestinal en ratones. De todas las muestras ensayadas, el extracto orgánico (BC-EO), el aceite esencial (BC-AE) y una de las fracciones de la infusión (IFD) disminuyeron significativamente el tránsito gastrointestinal a las dosis de 3.16, 10 y 31.6 mg/Kg. Como se puede observar en la **Figura 29**, la administración del aceite esencial inhibió casi en un 30 % el avance del carbón activado a la dosis de 31.6 mg/kg, mientras que el tratamiento con la fracción de CH₂Cl₂ (IFD) de la infusión provocó una inhibición de cerca del 30 % a la misma dosis, sin embargo el comportamiento no fue dependiente de la dosis. El extracto orgánico inhibió de igual manera, la motilidad intestinal en ratones. La atropina fue utilizada como fármaco de referencia a la dosis de 1 y 3.16 mg/kg

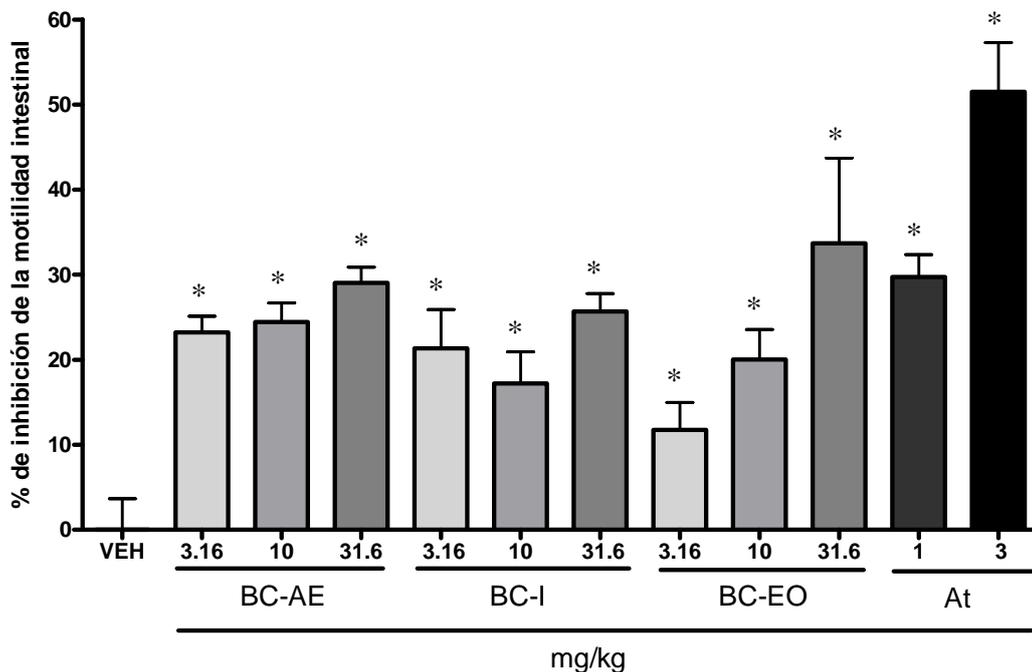


Figura 29. Efecto inhibitorio sobre la motilidad gastrointestinal del aceite esencial (BC-AE), la fracción extraída con diclorometano de la infusión (BC-IFD) y el extracto orgánico (BC-EO) obtenidos de la especie *B. cavanillesii*. Cada barra representa la media de seis determinaciones (n=6) ± E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * P<0.05

Nuevamente, la presencia de compuestos de tipo fenólico tanto en el extracto orgánico como en la infusión permite señalarlos como los principios espasmolíticos. La quercetina, su derivado 3-*O*-glucosido y la rutina inhiben de manera dependiente de la concentración las contracciones espontáneas en íleon aislado de cobayo. Investigaciones subsecuentes mostraron que la quercetina posee una gran actividad antiespasmódica con una CL₅₀ de 7.8 µMol/L. Además, de estos principios espasmolíticos, es probable que los co-metabolitos de la quercetina en *B. cavanillesii* sean también espasmolíticos (Lemmens-Bruber *et al.*, 2006).

5.4.4. Efecto gastroprotector del extracto orgánico.

Para corroborar la eficacia atribuida a la planta para aliviar la gastritis y padecimientos relacionados, se evaluaron las propiedades gastroprotectoras de un extracto orgánico de la planta utilizando el modelo de lesiones inducidas con etanol absoluto en ratas (Navarrete *et al.*, 2002; 2005). Los resultados (**Figura 30**) demostraron que el extracto orgánico (10-300 mg/kg) posee propiedades gastroprotectoras significativas con respecto al grupo que recibió el vehículo. El efecto fue dosis dependiente y la DE₅₀ calculada para el extracto orgánico en este modelo fue de 30 mg/Kg.

Con la finalidad de establecer el rol de las prostaglandinas endógenas, el óxido nítrico y los grupos sulfhídricos en la acción gastroprotectora del extracto orgánico de *B. cavanillesii* se realizaron una serie de experimentos utilizando el mismo modelo con algunas modificaciones que se detallaron en el inciso 4.2.4.1. de la sección experimental.

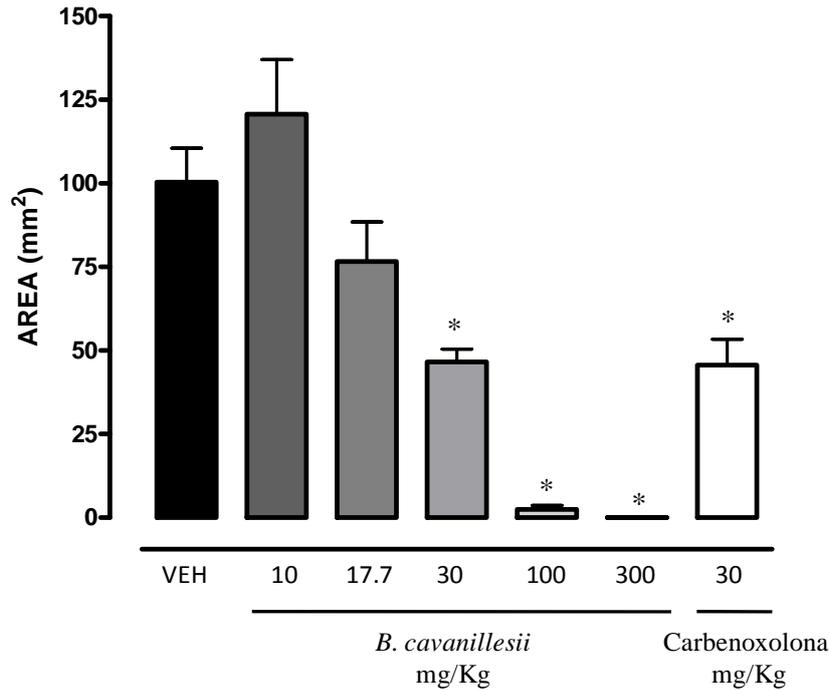


Figura 30. Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. cavanillesii* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas. Cada barra representa el promedio de 6 animales \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P < 0.05$.

Como se observa en la **Figura 31-C**, el pretratamiento con un bloqueador de los grupos tioles, como la N-etilmaleimida, no redujo el grado de protección de la mucosa gástrica producido por el extracto orgánico de *B. cavanillesii*, sugiriendo que un incremento en los niveles de grupo -SH no está relacionado con el mecanismo de acción del extracto. Por otro lado, la administración del L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, tampoco atenuó el efecto protector de la mucosa gástrica del extracto orgánico de *B. cavanillesii*, sugiriendo que el óxido nítrico no está involucrado como blanco de acción del efecto gastroprotector de la planta. Sin embargo, el pretratamiento de los animales de experimentación con un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, la indometacina, si revirtió parcialmente y de manera significativa el efecto protector de la mucosa del estómago. Este hallazgo indica la participación de las prostaglandinas como mediadores de la acción gastroprotectora.

El papel de las prostaglandinas en la gastroprotección ha sido estudiado por diversos grupos de investigación y hoy se sabe que participan como factores para acelerar la cura de las quemaduras provocadas por un tratamiento irritante,

probablemente por un proceso de angiogénesis, proliferación de células epiteliales, en la reconstrucción de matrices extracelulares, supresión de la infiltración de células inflamatorias y la producción de factores de crecimiento (Park *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008). Nuestros resultados muestran que el uno de los mecanismos gastroprotectores de la planta podría ser la producción de prostaglandinas. Ejemplos claros de esto son los casos de las especies *Alchornea triplinervia* y *A. castaneaefolia*, las cuales produjeron un aumento de los niveles basales de PG's; específicamente, la fracción extraída con acetato de etilo, rica en derivados de la quercetina, indujo la producción al doble de PGE₂, estos resultados explicaron el efecto gastroprotector en los modelos de úlceras inducidas con etanol así como en la acción anti-secretora en el método de la ligadura del píloro (Lima *et al.*, 2008). Además, los flavonoides presentes en la especie *Scutellaria baicailensis* exhibieron propiedades citoprotectoras, los autores del trabajo infirieron una inducción en la expresión de la COX-2.

De nueva cuenta, los flavonoides quercetina, rutina y kamferol, así como los ácidos polifenólicos cafeíco, clorogénico y quínico podrían ser los responsables del efecto gastroprotector como se demostró en los estudios realizados en el seno de numerosos grupos de investigación (Zayachkivska *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007; de Lira Mota *et al.*, 2009).

Estos hallazgos representan los primeros reportes sobre las propiedades gastroprotectoras de la especie *B. cavanillesii* y también es el primer bosquejo sobre su probable mecanismo de acción.

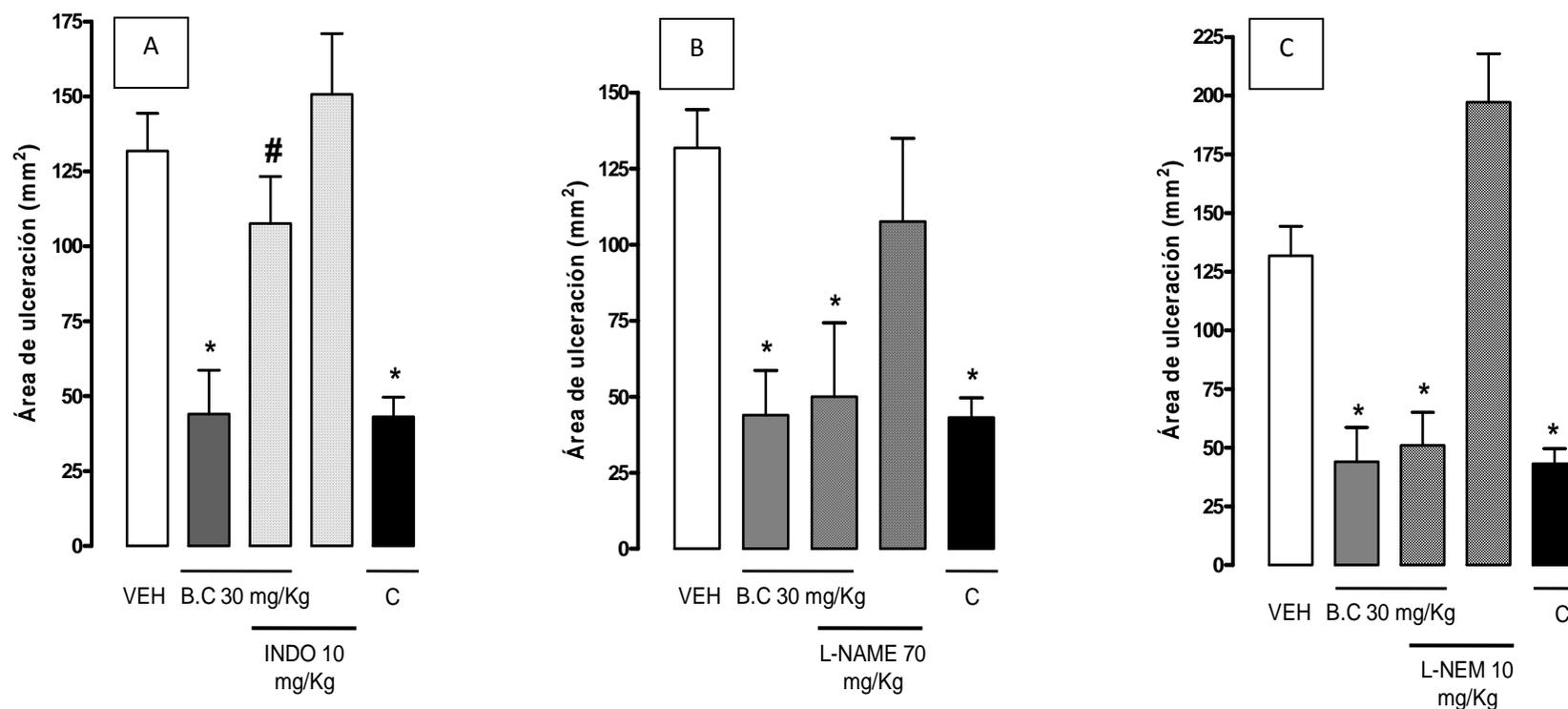


Figura 31. Efecto gastroprotector del extracto orgánico de *B. cavanillesii* en el modelo de lesiones gástricas inducidas con etanol absoluto en ratas pretratadas con indometacina (A), L-NAME (B), N-etilmaleimida (C). Cada punto representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVIA seguida de una prueba de Dunnet * $p<0.05$. y # $p<0.05$ con respecto al tratamiento con el extracto de *B. cavanillesii* a la dosis de 30 mg/Kg.

5.4.5. Establecimiento del efecto anti-*Helicobacter pylori*

Para completar los estudios relacionados con el uso de la planta para tratar la gastritis y las úlceras se considero pertinente establecer su efecto anti-*Helicobacter pylori*.

Para ello se evaluó el efecto del extracto íntegro, las fracciones primarias (FH, FD, FA y FW) y aceite esencial sobre el crecimiento de la bacteria. Los resultados obtenidos (**Figura 32**) revelaron que el extracto íntegro inhibió de manera significativa el crecimiento de *H. pylori*. La concentración mínima inhibitoria (MIC) calculada fue 2.5 µg/mL.

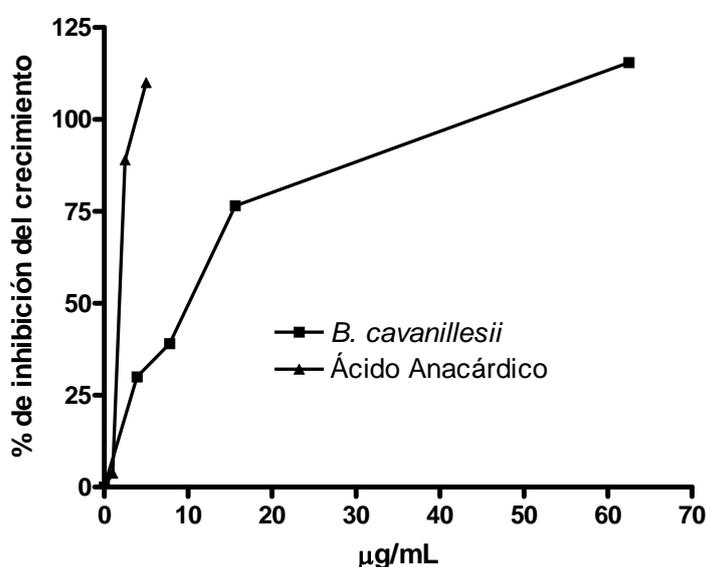


Figura 32. Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori* del extracto orgánico de *B. cavanillesii*. Cada punto representa el promedio de 2 experimentos realizados por triplicado. Como control se utilizó el DMSO y al ácido anacárdico como producto natural de referencia.

Una vez determinado el potencial anti-*H. pylori* del extracto íntegro, se evaluaron también el aceite esencial y las fracciones primarias obtenidas de la partición del extracto orgánico (**Cuadro 14**), que de igual forma presentaron un efecto importante contra la bacteria gram negativa.

Cuadro 14. Actividad Anti-*H. pylori* del aceite esencial (BCAE) y las fracciones extraídas con hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etilo (FA) y acuosa (FW) del extracto orgánico de *B. cavanillesii*

Tratamiento	BCAE	FH	FD	FA	FW	*Metro	*Amox
MIC ($\mu\text{g/mL}$)	20	10	> 20	ND	ND	200	0.01

*Los antibióticos Metronidazol (Metro) y Amoxicilina (Amox) fueron utilizados como controles positivos y DMSO como control negativo.

Entonces, *B. cavanillesii* además de presentar un efecto gastroprotector importante, puede ser eficaz para la erradicación de *H. pylori*.

5.4.6. Establecimiento del potencial antibacteriano de *B. cavanillesii*

La evaluación del potencial antibacteriano del extracto íntegro y el aceite esencial sobre una batería de bacterias gram positivas y negativas se realizó utilizando el método de difusión en agar. Los resultados obtenidos muestran una actividad modesta solo contra la bacteria *Bacillus subtilis* a las concentraciones de 750 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para ambos preparados.

Aún cuando los resultados obtenidos fueron negativos para esta batería de bacterias, esto nos indica que los compuestos presentes en la especie pueden ser selectivos contra *H. pylori*.

5.5. Pruebas biológicas realizadas al metabolito **40** derivado de la especie *B. cavanillesii*

Con base en los resultados de la evaluación antinociceptiva, la actividad inhibitoria sobre la motilidad intestinal y el crecimiento de la bacteria *H. pylori* del extracto de *B. cavanillesii*, se decidió evaluar al compuesto **40** en estos modelos para determinar su posible contribución al efecto total de la planta.

Los resultados de la evaluación del compuesto **40** (10-131.6 mg/kg) en la prueba de la placa caliente muestran una actividad moderada y de manera dependiente de la dosis, sin embargo su efecto no es comparable con el provocado por el fármaco de

referencia (Morfina, 3.16 mg/kg), ni con el del extracto por lo tanto este producto no es el responsable de las propiedades analgésicas de la planta. Sin embargo, el cromeno fue eficiente como agente espasmolítico, ya que inhibe la motilidad intestinal de manera significativa y dependiente de la dosis (3.16-31.6 mg/kg). De manera adicional, el producto presentó un efecto anti-*Helicobacter pylori* importante. Su CMI fue de 10 µg/mL.

La mayoría de los cromenos aislados de fuentes naturales, hasta ahora solo han mostrado tener propiedades acaricidas, antifúngicos, fototóxicos, antitumorales, anti-fértiles y tóxicos en algunas pruebas donde se utilizan a peces como modelos biológicos (Proksch y Rodríguez, 1983; Burkhardt *et al.*, 1994; Agarwal *et al.*, 1999; Ferraz *et al.*, 2005; Lago *et al.*, 2007). En este trabajo se propone que el cromeno aislado podría ser uno de los responsables del alivio de espasmos típicos de la dispepsia y la gastritis, además de constituir un potencial agente antibiótico contra *Helicobacter pylori*.

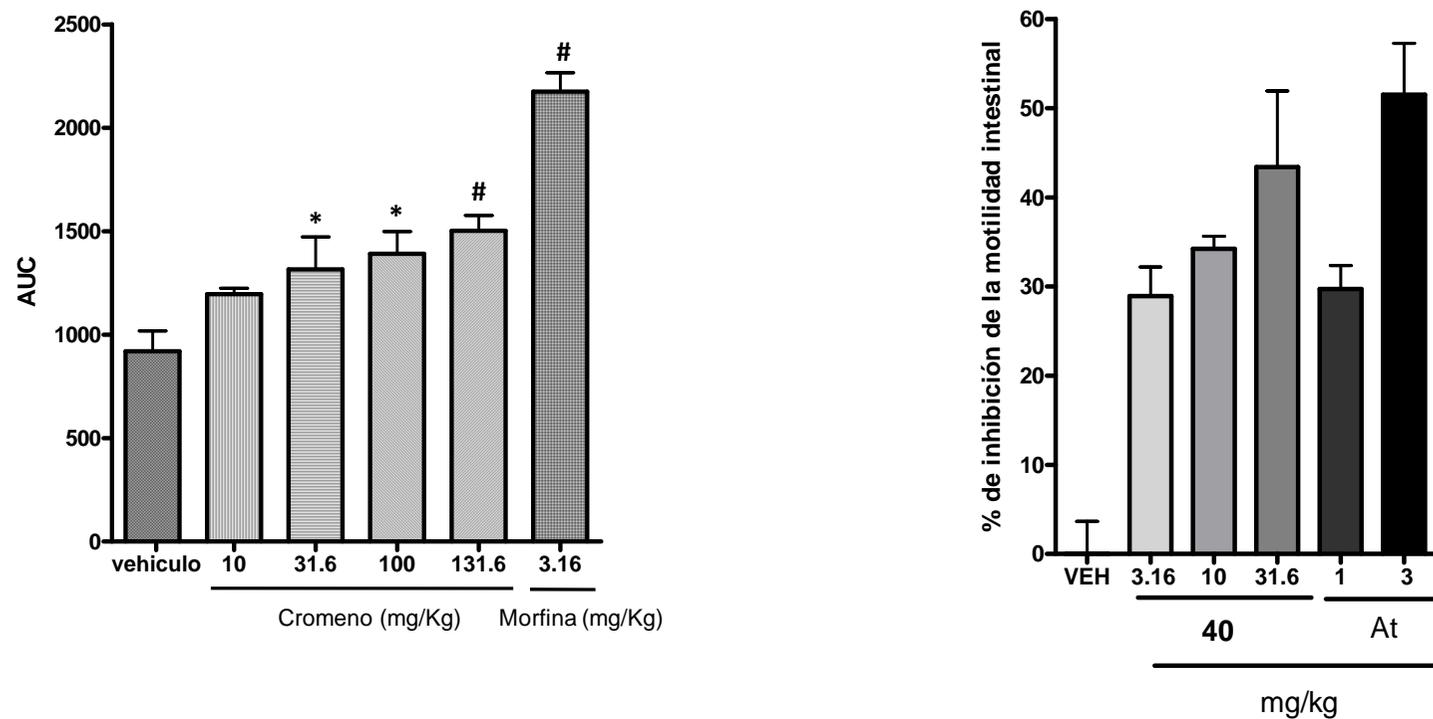


Figura 33. Efecto antinociceptivo y antiespasmódico del compuesto **40** aislado de la especie *B. cavanillesii* en las pruebas de la placa caliente y sobre el tránsito intestinal de carbón activado, ambas en ratones. Cada barra representa la media de seis determinaciones ($n=6$) \pm E.E.M. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo fueron determinadas mediante un ANADEVVA seguida de una prueba de Dunnet * $P<0.05$, # $P<0.01$.

VI. CONCLUSIONES

Los estudios fitoquímicos realizados a los extractos de la especie *Brickellia cavanillesii* indicaron la presencia de varios metabolitos de tipo flavonoide y ácidos fenólicos así como de la demetilisoencecalina. Este último metabolito también representó el constituyente mayoritario y biodinámico del aceite esencial, que contiene además cariofileno, curcumeno, espatulenol, óxido de cariofileno y carotol. La demetilisoencecalina se seleccionó como el compuesto marcador de la especie con base en sus características.

El contenido metabólico de las dos especies de *Brickellia* analizadas en este estudio es distinto por lo que bastará comparar los perfiles cromatográficos de los extractos íntegros y aceite esencial de la planta, así como, la detección cromatográfica de la demetilisoencecalina en *B. cavanillesii* y del 2,6-dimetoxi-benzoato de bencilo en *B. veronicifolia* para diferenciarlas desde el punto de vista químico. De tal manera que la hipótesis formulada al inicio del proyecto donde se planteaba que si las especies son distintas era probable que además de diferencias anatómicas y morfológicas presentasen algún compuesto marcador y que las mezclas complejas de productos que de ellas se obtengan presenten perfiles cromatográficos distintos que permitan diferenciarlas químicamente fue comprobada. De manera adicional, el establecimiento del código de barras genético correspondiente a la región ITS nuclear permitirá caracterizar inequívocamente a la droga cruda derivada de la especie, ya sea sola o en combinación con otras plantas.

Los estudios farmacológicos sobre la especie medicinal *Brickellia cavanillesii* indican el inmenso potencial de esta planta para el tratamiento de cólicos abdominales, gastritis y diabetes. De igual forma, resulto efectiva como agente analgésico y para erradicar a la bacteria *Helicobacter pylori*. Estos hallazgos dejan de manifiesto el amplio potencial de esta planta para el tratamiento de padecimientos del tracto gastrointestinal, en particular para dispepsia, asociada o no a una gastritis y eventualmente para la prevención del cáncer estomacal. De igual forma, el establecimiento preliminar de su nula toxicidad, en

conjunto con su uso tradicional prolongado, indica que la especie puede usarse con cierta seguridad, sin embargo deben de realizarse estudios adicionales en este sentido.

El conjunto de los resultados de los estudios farmacológicos y químicos indicaron una buena correlación entre los usos populares de la especie y la naturaleza de los principios activos. De tal manera que la presencia de diversos metabolitos de tipo fenólico, incluyendo derivados del ácido clorogénico y flavonoles, y en particular de la quercetina, es congruente con las propiedades antinociceptivas, gastroprotectoras, anti-*H. pylori* y espasmolíticas de *B. cavanillesii*. Este conjunto de productos tan diferentes actúan sobre distintos blancos de acción, y algunos de ellos de manera sinérgica, confiriéndole a la droga cruda las ventajas propias de un preparado fitoterapéutico. Tan solo la presencia de quercetina en grandes cantidades, con efectos gastroprotectores, antinociceptivas y espasmolíticas demostrados, explica la gran actividad farmacológica de la planta.

Los estudios farmacológicos sobre la especie *Brickellia veronicifolia* ampliaron el conocimiento de su eficacia preclínica mediante la comprobación de sus propiedades analgésicas, antidiabéticas, antiespasmódicas y gastroprotectoras *in vivo*. Los resultados permitirán la actualización de su monografía científica.

En este caso también fue posible determinar la participación de los benzoatos de bencilo en el efecto antinociceptivo. Este hallazgo permitió demostrar por vez primera las propiedades antinociceptivas de este tipo de metabolitos.

Afortunadamente se cuentan con métodos analíticos para cuantificar estos productos por lo que no resultaría difícil estandarizar preparados fitofarmacéuticos analgésicos a base de esta especie.

Finalmente, los resultados globales de este trabajo permitieron comprobar todas las hipótesis formuladas al inicio de este proyecto de investigación.

VII. PERSPECTIVAS

Como todo proyecto de investigación, los resultados del estudio de la especie *Brickellia cavanillesii* generaron las siguientes perspectivas:

- 1) Continuar con los estudios fitoquímicos del extracto orgánico y la infusión para profundizar en el conocimiento de la composición química de la especie
- 2) Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar los metabolitos mayoritarios presentes en la infusión
- 3) Profundizar en los estudios sobre el modo de acción gastroprotector, espasmolítico y anti-*H.pylori* de los extractos y metabolitos de la planta.
- 4) Realizar la descripción microscópica de la especie mediante la realización de cortes histológicos de las distintas partes aéreas de la planta, esto con la finalidad de establecer las pruebas de identidad botánicas necesarias en una monografía.
- 5) Explorar el efecto antiparasitario potencial, ya que la literatura acerca de sus usos medicinales en las prácticas médicas de nuestro país indica que la planta es efectiva para el tratamiento de parásitos intestinales.
- 6) Evaluar los posibles efectos genotóxicos mediante la experimentación adecuada.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Anales del Instituto Médico Nacional.
- Aguilar Salinas, C. A. (2002). Avances en el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Ciencia*. Julio-Septiembre. 63-71.
- Aguirre-Crespo, F., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Guerrero-López, J. J., y Estrada-Soto, S. (2005). Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharmaceutical Biology*, **43**, 540-546.
- Allescher, H. D. (2006). Functional dyspepsia-A multicausal disease and its therapy. *Phytomedicine*, **13**, SV 2-11.
- Andrede-Cetto, A., y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**, 325-348.
- Atay, S., Tarnawski, A. y Dubois, A. (2000). Eicosanoids and the stomach. *Prostaglandins Other Lipids Mediators*, **61**, 105-124.
- Bailey, C. J., y Flatt, P. R. (1990). Models for testing new hypoglycemic drugs. En: Bailey, C. J., y Flatt, P. R. (Eds). *New antidiabetic drugs*. Smith-Gordon. London. 65-82.
- Bandaranayake, W. Quality control, screening, toxicity and regulation of herbal drugs. En: *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*. Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil y Mohammad Owais (Eds). 2006. 25-53 pp. (libro)
- Borrelli, F., e Izzo, A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytotherapy research*, **14**, 581-591.
- Calapai, G. (2008). European Legislation on Herbal Medicines. A Look into the Future. *Drug Safety*, **31**, 428-431.

- Calixto, J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 179-189.
- Carson, M., Han, R. J. L., Lemahieu, R. y Madison, V. S. (1994). Substituted benzolic acids, inhibitors of phospholipases A2. Patente.
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H. y Romero, I. (2007). Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **114**, 72-77.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaimes-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R. y Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **122**, 402-405.
- Chen, S. T., Dou, J., Temple, R., Agarwal, R., Wu, K-M and Walker, S. (2008). New therapies from old medicines. *Nature Biotechnology*, **26**, 1077-1083.
- Chen, Z. W., Ma, C. G. y Xu, S. Y. (1989). Mechanism of analgesic action of hyperin. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **24**, 326-330.
- Cheng, K. W., Chen, F. y Wang, M. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Natural Product Research. In: Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. (2008). Editores: Colegate, S. M. and Molyneux, R. J. Second edition. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Chiang, C. Y., y Zhuo, M. (1989). Evidence for the involvement of a descending cholinergic pathway in systemic morphine analgesia. *Brain research*, **478**, 293-300.
- Choi, S. M., Shin, J. H., Kang, K. K., Ahn, B. O. y Yoo, M. (2007). Gastroprotective effects of DA-6034, a new flavonoid derivative, in various gastric mucosal damage models. *Digestive Diseases and Sciences*, **52**, 3075-3080.

- Collier, H. O., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., y Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology*, **32**, 295–310.
- Cordell, G. A. (2007). A vision for medicinal plants. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **6**, 89-91.
- Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F., y Flahaut, M. (1980). Release of prostaglandins E and F in an allergic reaction and its inhibition. *European Journal of Pharmacology*, **67**, 17-24.
- Dietary Supplement Health and Education Act of 1994. Food and Drug Administration. Approved October 25, 1994. URL: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCAct/SignificantAmendmentstotheFDCAct/ucm148003.htm> (visitada el día 12 de Mayo de 2009).
- Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. 6 de Noviembre de 2001.
- Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council 31 March 2004 [online]. Available from URL; http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/pmf/2001_83-EC.pdf (visitada el día 12 de Mayo de 2009).
- Dos Santos, M. D., Almeida, M. C., Lopes, N. P. y Petto de Souza, G. E. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of natural polyphenol chlorogenic acid. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, **29**, 2236-2240.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001.
- Falcão, H. S., Mariath, I. R., Diniz, M. F. F. M., Batista, L. M., y Barbosa-Filho, J. M. (2008). Plants of the American continent with antiulcer activity. *Phytomedicine*, **15**, 132-146.

- Fang, X. K., Gao, J. y Zhu, D. N. (2008). Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sciences*, **82**, 615-622.
- Ford, A. C., y Moayyedi, P. (2008). Currente guidelines for dyspepsia management. *Digestive diseases*, **26**, 225-230.
- Fleming, S. L. *Helicobacter pylori*. In: *Deadly diseases and epidemics*. Foreword by David Heyman. 1a ed. Editorial Chelsea House. New York.
- Fröde, T. S. y Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **115**, 173-183.
- Gao, D., Li, N., Li, Q., Li, J., Han, Z., Fan, Y. y Liu, Z. (2008). Study for the extraction, purification and antidiabetic potential of ursolic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Therapy*, **5**, 697-705.
- Gillespie, K, M. (2006). Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Canadian Medical Association Journal*. **175**, 165-170.
- Gómez Castellanos, J. R. (2009). Health regulation on phytomedicines in Mexico. Bacground, current situation and perspectives for the year 2025. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **8**, 33-40.
- Guth, P. (1973). Experimental production of peptic ulcer. *Gastroenterology*, **64**, 1187-1188.
- Gyres, K. (2005). Gastric mucosal protection: From prostaglandins to gene-therapy. *Current Medicinal Chemistry*. **12**, 203-215.
- Hardin, J. F., y Wright, R. A. (2002). *Helicobacter pylori*: Review and Update. *Hospital Physician*, **38**, 23-31.
- 10th International Conference of Drug Regulatory Authorities. Hong Kong, China, 24-27, June 2002.

- 11th International Conference of Drug Regulatory Authorities. Madrid, Spain, 16-19, February 2004.
- Instituto Nacional Indigenista (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Argueta, V. A., (comp), Vol. 3., México.
- IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) (2004). Úlcera Péptica hemorrágica. Med. Urg. Prim. Niv. Aten, 1-4.
- Jezewski, M. A., y Poss, J. (2002). Mexican American's explanatory model of Type 2 Diabetes. *Western Journal of Nursing Research*, **24**, 840-858.
- Johnson, L., Strich, H., Taylor, A., Timmermann, B., Malone, D., Teufel-Shone, N., Drummond, R., Woosley, R., Pereira, E., y Martinez, A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the Southern United States. *Phytotherapy Research*, **20**, 259-255.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., y Zinkernagel, R. M. Medical Microbiology. 2005. 10^a ed. Editorial Thieme. New York.
- Keith, C. T., Borisy, A. A. y Stockwell, B. R. (2005). Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **4**, 71-78.
- Kemper, F. H. and Bruhn, J. G. (2005). The ESCOP Research Committee- A further step in the scientific advancement of phytotherapy. *Phytomedicine*, **12**, 702-703.
- Kirimer, N., Tunalier, Z., Baser, K. H. C., y Cingi, I. (1997). Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta Medica*, **63**, 556-558.
- Le Bars, D., Gozariu, M., y Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, **53**, 597-652.
- Lemmensa-Gruber, R., Marchant, E., Rawnduzi, P., Engel, N., Benedek, B. y Kopp, B. (2006). Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea pig ilea. *Drug Research*, **56**, 582-586.

- Li, Y., Huang, T. H. W. y Yamahara, J. (2008). Salacia root, a unique Ayurvedic medicine, metes multiple targets in diabetes and obesity. *Life Sciences*, **82**, 1045-1049.
- Liao, D-H., Zhao, J-B, y Gregersen, H. (2009). Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*, **15**, 169-176.
- Lima, Z. P., Calvo, T. R., Silva, E. F., Pellizzon, C. H., Vilegas, W., Brito, A. R. M. S., Bauab, T. M. y Hiruma-Lima, C. A. (2008). Brazilian medicinal plant acts on prostaglandin level and *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food*, **11**, 701-708.
- Martínez, A. L., González-Trujano, M. A., Aguirre-Hernández, E., Moreno, J., Soto-Hernández, M. y López-Muñoz, F. J. (2009). Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*, **56**, 564-571.
- Martínez, M. Las plantas medicinales de México. Editorial Botas, México, D.F. 1989.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, T., Bye, R. y Linares, E. (1997). Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*, **63**, 31-35.
- Matsda, H., Morikawa, T., Toguchida, I. y Yoshikawa M. (2002). Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **50**, 788-795.
- Mimidis, K., y Tack, Jan. (2008). Pathogenesis of dyspepsia. *Digestive diseases*. **26**, 194-202.
- Mönkemüller, K., y Malfertheiner, P. (2006). Drug treatment of functional dyspepsia. *World Journal of Gastroenterology*, **12**, 2694-2700.

- Morphy, R., Kay, C. y Rankovic, Z. (2004). From magic bullet to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today*, **9**, 641-651.
- Nardi, G. M., DalBó, S., Monache, F. D., Pizzolatti, M. G. y Ribeiro-do-Valle, R. M. (2006). Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **107**, 73-78.
- Navarrete, A., Trejo-Miranda, J. y Reyes-Trejo, L. (2002). Principles of root bark *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *Journal of Ethnopharmacology*, **79**, 383-388.
- Navarrete, A., Arrieta, J., Terrones, L., Abou-Gazar, H. y Calis, I. (2005). Gastroprotective effect of astragaloside IV: role of prostaglandins, sulfhydryls and nitric oxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**, 1059-1064.
- Oh, C. J., Park, C. I., Yang, C. H. y Park, J. W. (2007). Ursolic acid regulates high glucose-induced apoptosis. *Free Radical Research*, **41**, 638-644.
- Organización Mundial de la Salud. Situación Reglamentaria de los Medicamentos, Una Reseña Mundial. 2000. WHO 60 pp.
- Organización Mundial de la Salud (2002). Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. OMS, Ginebra.
- Ovesná, Z., Vachálková, A., y Horváthová, K. (2004). Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma*, **51**, 407-414.
- Park, S., Hahm, K. B., Oh, T. Y., Jin, J. H. y Choue, R. (2004). Preventive effect of the flavonoid, wogonin, against ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, **49**, 384-394.
- Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M. K., Dai, R., Ahamad, W. y Yu, Y. H. (2007). Antiinflammatory and analgesic of *Thesium chinese* Turcz extracts and its major

- flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-*O*-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1275-1279.
- Poss, J. E., Jezewski, M. A., y González Stuart, A. (2003). Home remedies for Type 2 Diabetes used by Mexican Americans in El paso, Texas. *Clinical Nursing Research*, **12**, 304-323.
 - Prieto, J. M. (2007). The global regulation of herbal medicines. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, **6**, 92-101.
 - Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. y Flower, R. J. (2007). Rang and Dale's Pharmacology. 6th Ed. Churchill Livingstone.
 - Rivero-Cruz, B., Rojas, M. A., Rodríguez-Sotres, R., Cerda-García-Rojas, C. M., y Mata, R. (2005). Smooth muscle relaxant action of benzyl benzoates and salicylic acid derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on isolated Guinea-Pig ileum. *Planta Medica*, **71**, 320-325.
 - Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez, J. M., Cerda-García-Rojas, C. M., y Mata, R. (2006). Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Natural Products*, **69**, 1172-1176
 - Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R., y Mata, R. (2007). Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry*, **68**, 1147-1155.
 - Robert, A. (1979). Cytoprotection by prostaglandins. *Gastroenterology*, **77**, 761-767.
 - Samara de Lira Mota, K., Nunes Dias, G. E., Ferreira Pinto, M. E., Liuz-Ferreira, A., Monteiro Souza-Brito, A. R., Hiruma-Lima, C. A., Barbosa-Filho, J. M y Batista, L. M. (2009). Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecule*, **14**, 979-1012.

- Sánchez-Mendoza, M. E., Arrieta, J. y Navarrete, A. (2007). Role of prostaglandins, nitric oxide, sulfhydryls and capsaicin-sensitive neurons in gastroprotection of stigmasterol and b-sitosterol. *Natural Product Communications*, **3**, 505-510.
- Secretaría de Salud y Asistencia. 1984. Ley General de Salud, (última Reforma 14 de Julio de 2008).
- Secretaría de Salud y Asistencia .1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización, (última Reforma 28 de Julio de 2006).
- Secretaría de Salud y Asistencia. 1998. Reglamento de Insumos para la Salud, (última Reforma, 2 de Enero de 2008)
- Sharma, S., Dwivedi, S., y Swarup, D. (1997). Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seed in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **58**, 39-44.
- Skopinski, P., Szafilik, J., Duda-Krol, B., Nartowska, J., Sommer, E., Chorostowska-Wynimko, J., Demkow, U. y Skopinska-Rozewdka, E. (2004). Suppression of angiogenic activity of sera from diabetic patients with non-proliferative retinopathy by compounds of herbal origin and sulindac sulfone. *International Journal of Molecular Medicine*, **14**, 707-711.
- Sodeman, A., y Sodeman, M. (1984). Fisiopatología clínica. Mecanismos de producción de los síntomas. 6ª ed. Ed. Interamericana. México, D. F.
- Soumyanath, A. (2006). Traditional medicines for modern times. Vol. 6. Antidiabetic plants. Taylor and Francis Group Editors. 1a Edi. Boca Raton, Florida. 1-314.
- Subash-Babu, P., y Stanley-Mainzen, P. (2004). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponidd, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **56**, 1435-1442.

- Sucher, N. J., y Carles, M. C. (2008). Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta medica*, **74**, 603-623.
- Szabo, S., Trier, J., y Frnakel, P. (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science*, **214**, 200-202.
- Talley, N. J., Ruff, K., Jiang, X. y Jung, H. K. (2008). The Rome III classification of dyspepsia: Will it help research. *Digestive Disease*, **26**, 203-209.
- Takasaki, M., Konoshima, T., Tokuda, H., Masuda, K., Arai, Y., y Shiojima, K. (1999). Anti-carcinogenic activity of Taraxacum plant. II. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **22**, 606-610.
- Traditional Medicines and Modern Health Care. Progress report by the Director General. Geneva, World Health Organization, 31 October 1990.
- Verspohl, E. J. (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*. **68**, 581-90.
- Wagner, H. (2006). Multitarget therapy-The future of treatment for more than just functional dyspepsia. *Phytomedicine*, **13**, 122-129.
- Wegener, T. y Wagner, H. (2006). The active components and the pharmacological multi-target principles of STW 5 (Iberogast®). *Phytomedicine*, **13**, SV 20-35.
- Williamson, E. M., Opako, D. T., y Evans, F. J. (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. Volume 1. Ed. John Wiley & Sons. New York. 1-228.
- World Health Organization (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. Geneva.
- WHO. 2002. Traditional Medicines. Secretariat Report. 111th Session 12 December 2002.
- Wyngaarde, S. (1985). Tratado de medicina interna. Vol. 1 16^a ed. Ed, Interamericana. México D.F.
- Schmeda-Hirschmann, G. y Yesilada, E. (2005). Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 61-66.

- Zayachkivska, O. S., Konturek, S. J., Drozdowicz, D., Konturek, P. C., Brzozowski, T. y Ghegotsky, M. R. (2005). Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **56**, 219-231.
- Zhang, H. Y. (2005). One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *The FEBS Letters*, *579*, 5260-5264.
- Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Li, J., Hu, L. y Li, J. (2006). Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, **10**, 1505-1512.

ANEXO 1.

Secuencia genética de las regiones ITS's obtenida para *B. cavanillesii*

	10	20	30	40	50	60	70
B. squa	TTTCCTCCGG	CTTATTGATA	TGCTTAAACT	CAGCGGGTAA	TCCCGCCTGA	CCTGGGGTCG	CGATCGAAGC
B. eup	-----	--TAT-GATA	TGCTTAAACT	CAGCGGGTAG	TCCCGCCTGA	CCTGGGGTCA	CGATCGAAGC
	80	90	100	110	120	130	140
B. squa	ATCATCACAA	TACAATGCGT	TAGGGTTT--	--TTAAGAGT	TCCTCCCTTC	AAGAATCAAA	ATACACGACA
B. eup	GTTGTAAACAA	GACAACACAT	CAGGGTTTGC	TTTTATGAGT	TTTCCCCTCC	AAGAATCGAA	ACACACGACA
	150	160	170	180	190	200	210
B. squa	TGAGACGACT	GTCTTATCAA	CCACCACTAG	TCGTGCAT--	CCTTCTATGA	AGTGACTCCT	ATTTAGGCCA
B. eup	CTAGACGACT	GAANAGTCAA	CCACCACTAA	TCGTGCATAT	CACCCCTTG-	-GGGGCTCGT	ATTTGGGTCA
	220	230	240	250	260	270	280
B. squa	ACTGCACCGT	AGGGCACAGG	AGACCAATCT	CCGCCTCCGT	CCAATGCGCC	CCGTAAAAGG	ATGCATGGTG
B. eup	ACCGCAACAT	-GGGCACGGG	AGACCAGTCT	CCGCCACAT	NCATAACATT	CCAGAGTGGG	ATGTCTTATG
	290	300	310	320	330	340	350
B. squa	GAAGCAATGT	GATACGTGAC	GCCCAGGCAG	ACGTGCCCTC	GACCGAATGG	CTTTGGGCGC	AACTTGCCTT
B. eup	TGGGCAGCTT	GATCGGGGAC	GCCCAGGCAG	ACGTGCCCTC	AACCAGGTGG	CTTCGGGCGC	AACTTGCCTT
	360	370	380	390	400	410	420
B. squa	CAAAAACTCG	ATGGTTCACG	GGATTCTGCA	ATTCACACCA	AGTATCGCAT	TTTGCTACGT	TCTTCATCGA
B. eup	CAAAAACTCG	ATGGTTCACG	GGATTCTGCA	ATTCACACCA	AGTATCGCAT	TTTGCTACGT	TCTTCATCGA
	430	440	450	460	470	480	490
B. squa	TGCGTGAGCC	GAGATATCCG	TTGCCGAGAG	TCGTTTA--A	TTTAAAAAAA	AGCCACATGC	AATGCAAACA
B. eup	TGCGTGAGCC	GAGATATCCG	TTGCCGAGAG	TCATTTATGA	TT-ACACAGA	AGCCACATAC	AATGAATGCA
	500	510	520	530	540	550	560
B. squa	CCACAA--AT	GGTGCCACAA	TGCATGAACC	CT-TTCAGTT	TCATTCTCCT	TGGCACGTGC	CGTGCCGGGG
B. eup	CCACATTCAT	GGGATCATCG	CACATG--CC	CTCTTAAGTT	TTGTTTTTCT	TGGCACGTGC	TGTGCCGGGG
	570	580	590	600	610	620	630
B. squa	GTTTGT--TT	GA-TGACGAC	ATGACATCCA	TGAG-ACCCT	GTATGAGC-C	CTCATGAACA	CATATCGACA
B. eup	GTT-GTTGTT	CGTCAAAAC	ATGATGTICA	CGAGTACCAT	AAAGGGACGC	CGCA--AACA	CACGTCGACA
	640	650	660	670	680	690	700
B. squa	AGGCTTCCCG	AGGATCGAAT	--AAAGCTAT	CAATCCCCGA	AAAGCGGTGT	TGTGGGTACA	AATTCACATG
B. eup	AGGCTTCCAG	TGGTTTGAAA	CAAAAG----	-----	-----	-----	-----
	710	720	730	740	750	760	770
B. squa	TTGTTCTGCT	ATGCAGGATT	CGACAATGAT	CCTTCCGCAG	GTTACCTAC	GGAAACCTTG	TTACGACTTT
B. eup	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
B. squa	TTACTTCCA						
B. eup	-----						

Comparación de la secuencia genética de *B. cavanillesii* (Query) con la secuencia de *Ambrosia trifida* (% similitud 82)

```

>| gb|DQ005970.1| Ambrosia trifida voucher Wiser 30 US 18S ribosomal RNA gene,
partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal
transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=721. Score = 632 bits (342), Expect = 5e-178. Identities = 609/734 (82%),
Gaps = 37/734 (5%)

Query 26  TCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAAGCATCATCACAATACAATGCGTTAGGGT-TTT 84
          |||
Sbjct 719  TCCCGCCTGACCTGGGGTCGCGATCGAAGCATCATCGCAAGACAACGCGTTAGGGTACTT 660

Query 85  TAAGAGT-TCCTCCCTCAA-GAATCAAAATACACGACATGAGACGACTGTCTTATCAAC 142
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 659  TAAGAGTAT-CT-ACAACAAGGAATGAAAACGCACGACGACGAGACGACTGTGTATCAAC 602

Query 143 CACCACTAGTCGTCATCCTTCTATGAAGTGACTCCTATTTAGGCCAACTGCACCGTAGG 202
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 601  CACCACTAGCCGTGCGTCCCTCT-TGATGAGACTCCCATTTAGGCCAACCACACCAT-GG 544

Query 203  GCACAGGAGACCAATCTCCGCTCCGTCCAATG-CGCCCGTAAAAGG-ATGCATGGTGG 260
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 543  GCACGGGAGACCAATCTCCGCC-CCAACCAAGTAGTCCCTTGATGGGAATGTTTGGTGG 485

Query 261  AAGCAATGTGATACGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCGACCGAATGGCTTTGGGCGCA 320
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 484  GGGCGACGTGATGCGTGACGCCCAGGCAGACGTGCCCTCAACCGSATGGCTTCGGGCGCA 425

Query 321  ACTTGCCTTCAAAAACFCGATGGTTCACGGGATTTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT 380
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 424  ACTTGCCTTCAAAAACFCGATGGTTCACGGGATTTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATT 365

Query 381  TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGTGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTAA--T 438
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 364  TTGCTACGTTCTTCATCGATGCGTGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTATAGT 305

Query 439  TTaaaaaaa-GCCACATGCAATGCAAAACACCACAAATGGTGCCACAAT-GCATGAACCC 496
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 304  TTAACAAAGATGCCACATACAACACGCACACCGCGAACGGGGCG-CAATAGCACGGGCC 246

Query 497  TTTCAAGTTTCA-TTCTCCTTGGCACGTGCCGTGCCGGGGTTTGT'TT-GATGACGACAT 554
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 245  TTTAAGTTT-AGTTTTCTTGGCACGTACCGTGCCGGGGTTTGT'TATCG-TGTCTCCAT 188

Query 555  GACATCCATGA-GACCC---TGTATGAGCCCT--CAT-GAACACATATCGACAAGGCTTC 607
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 187  GAAATCCATGATGCCCCAAATGTTTG-GCGCAAGCATAGA-CACACGTGACAAGGCCTC 130

Query 608  CCGAGGATCGAA---TAAAGTATCAATCCCCGAAAAGC-GGTGTTGTGGGTACAAATTC 663
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 129  ACAAAGATCGAAACGTAA-GCT-TCGGTCCCRCTTAGCCGGTGT'TT---TACATGTTT 75

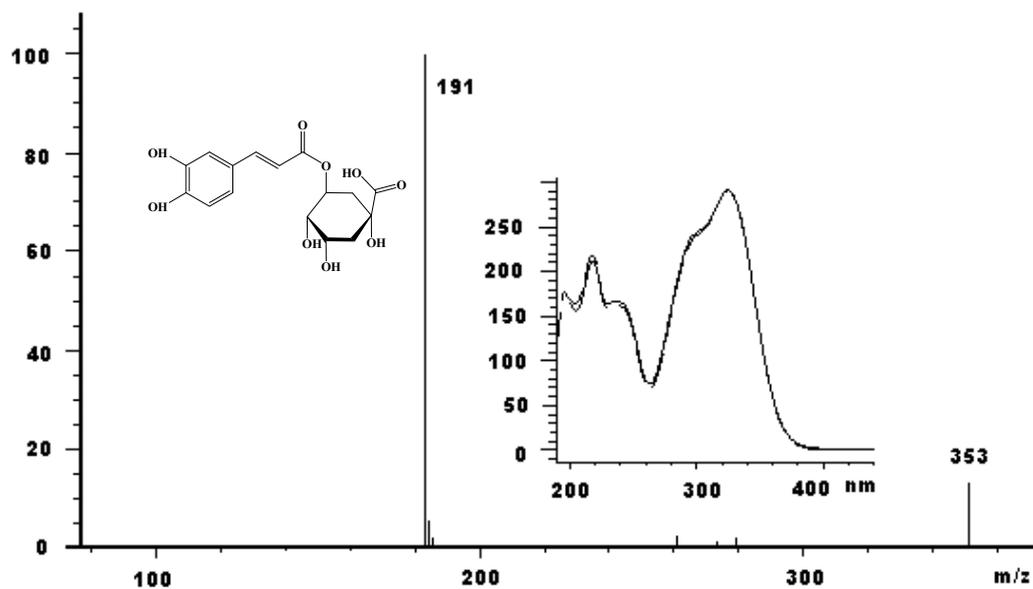
Query 664  ACTAGTTGTTCTGCTATGCAGGATTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA 723
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 74  ACGGGTCGTTCTGCTATGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAA 15

Query 724  CCTTGTTACGACTT 737
          |||
Sbjct 14  CCTTGTTACGACTT 1

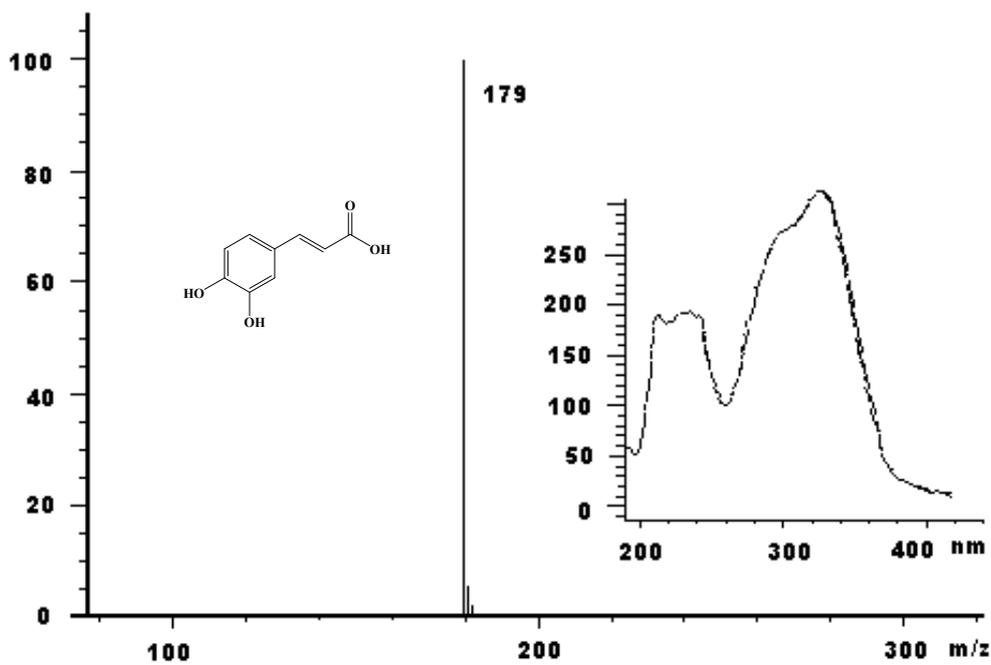
```


ANEXO 2. Espectros de Masas y de Absorción UV de los metabolitos identificados por HPLC-PDA/APCI-MS.

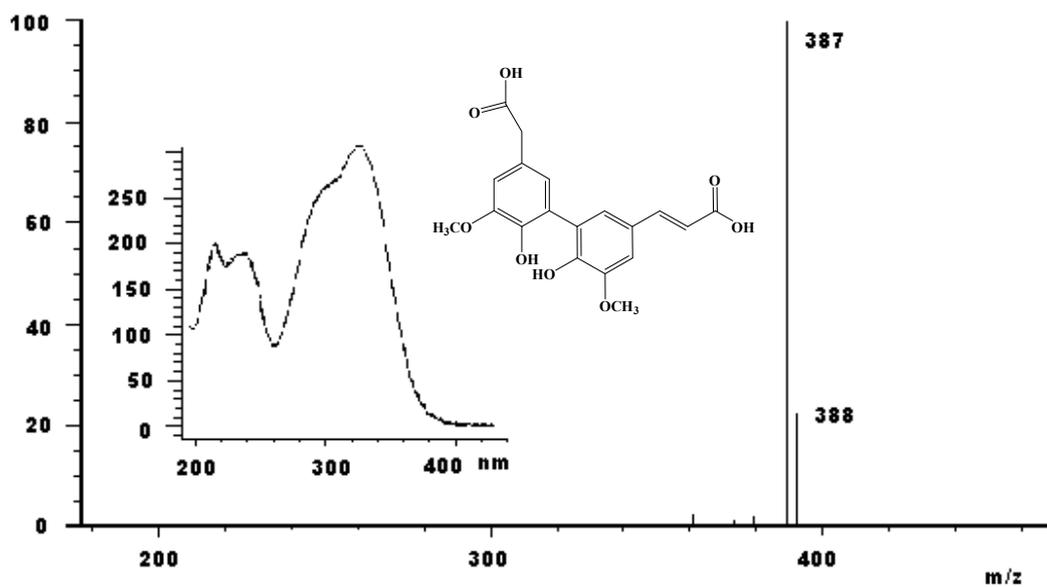
1) Ácido Clorogénico



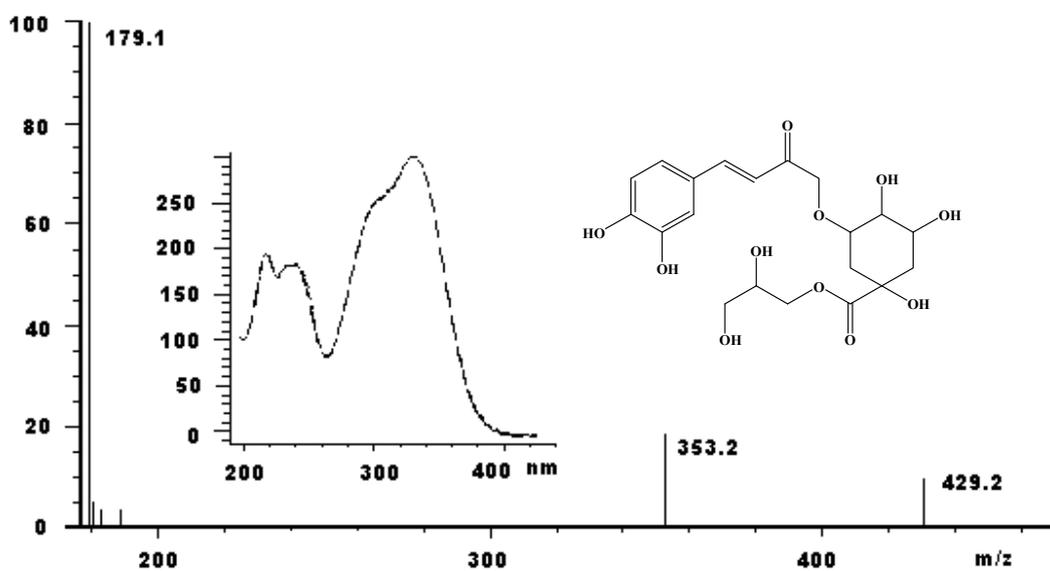
2) Ácido Cafeico



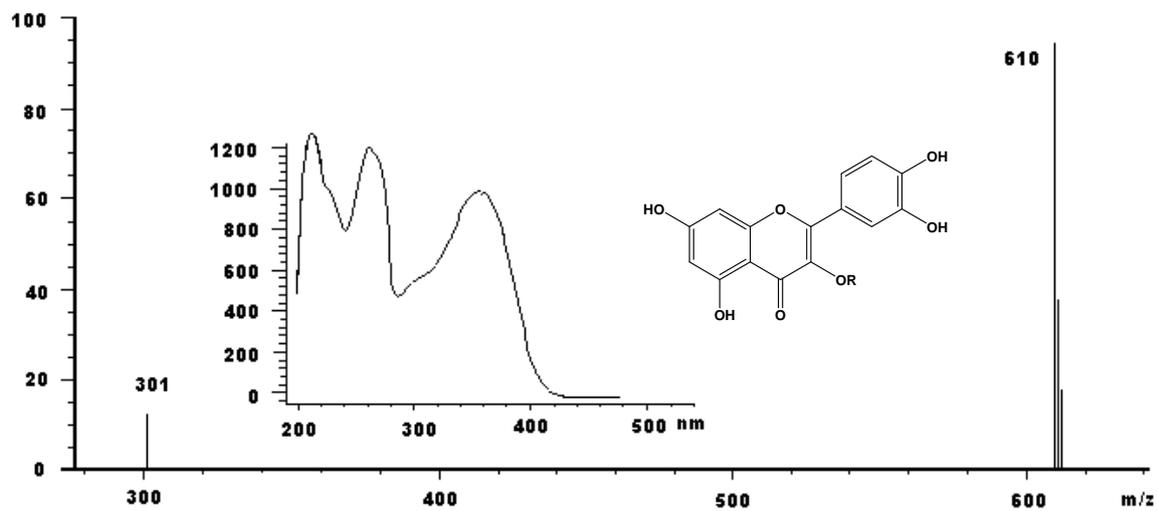
4) Ácido Diferulico



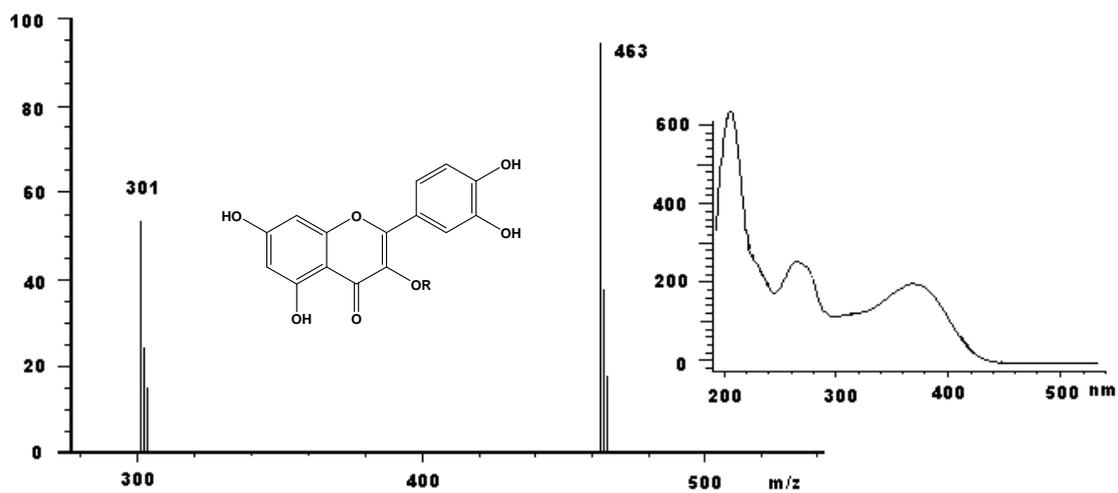
5) Clorogenato de Glicerilo



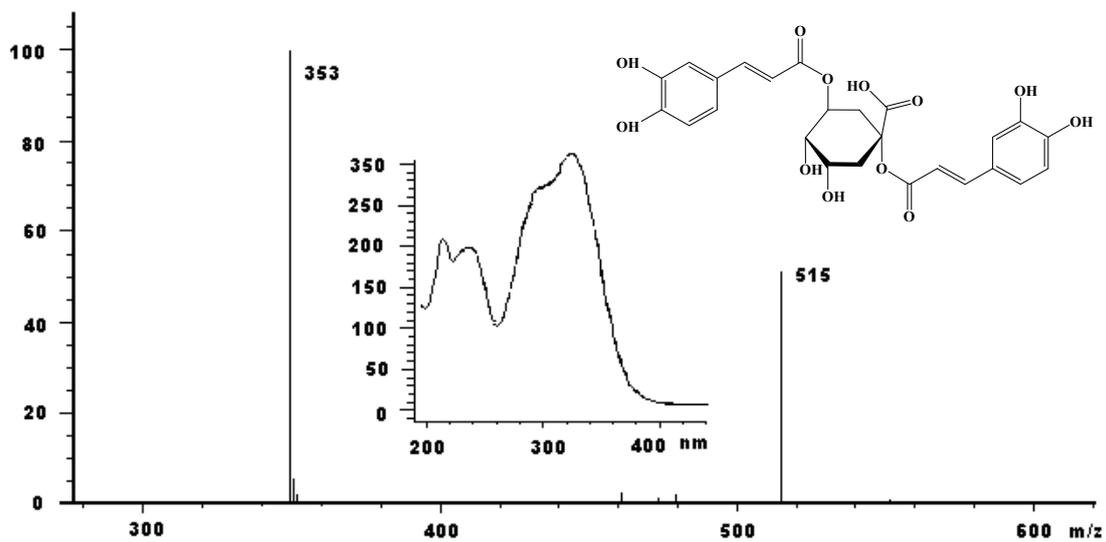
6) Rutina



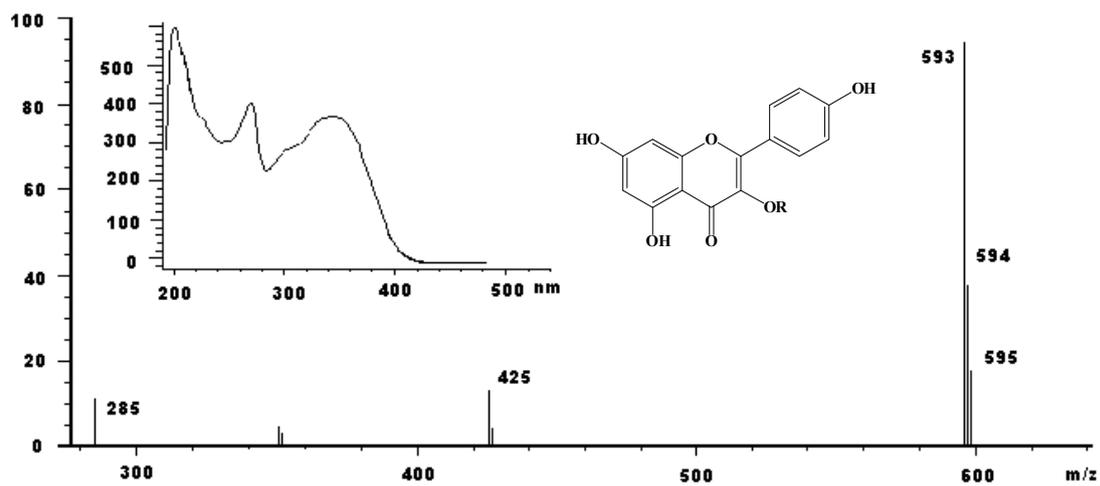
7) Hiperósido



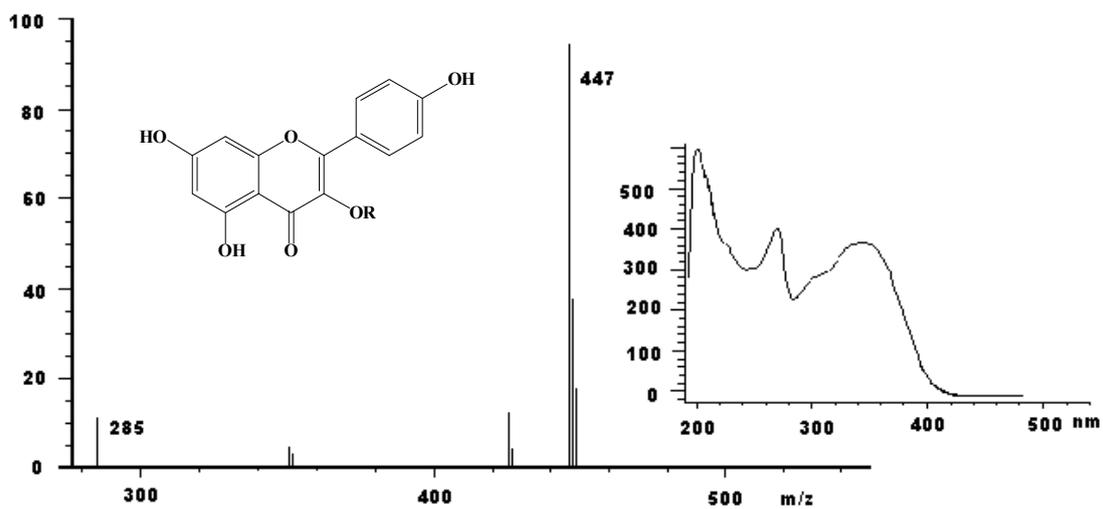
8) Ácido 1,3-dicafeoilquínico



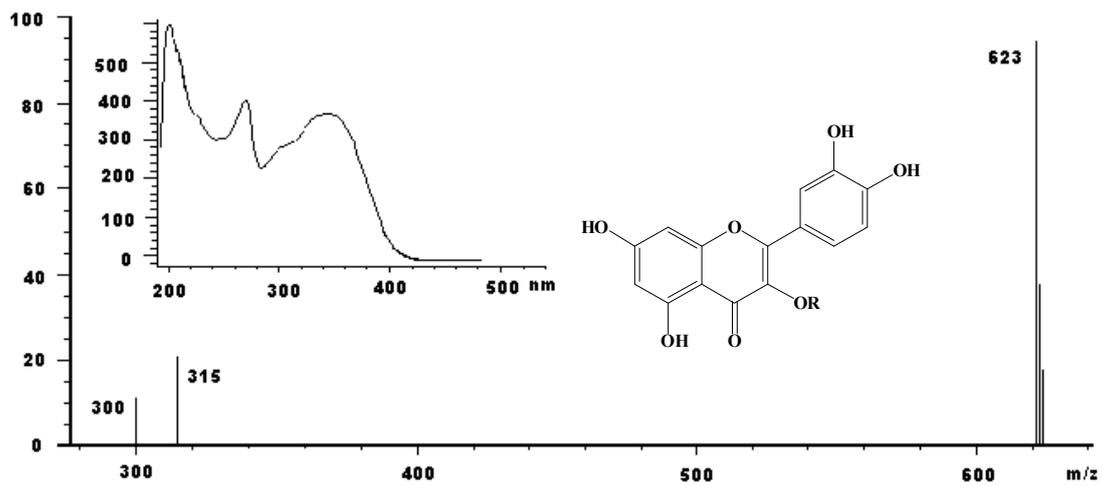
9) 3-O-rutinosido del kamferol

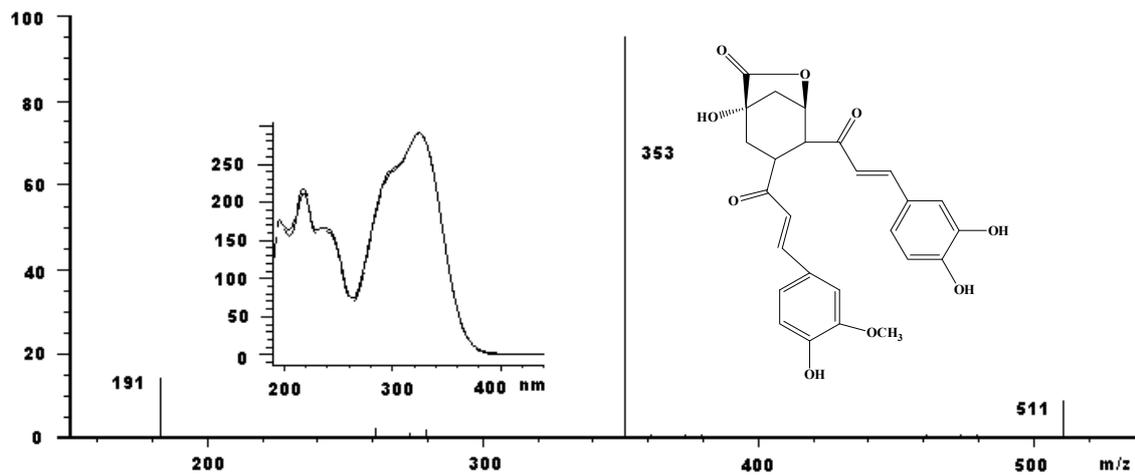


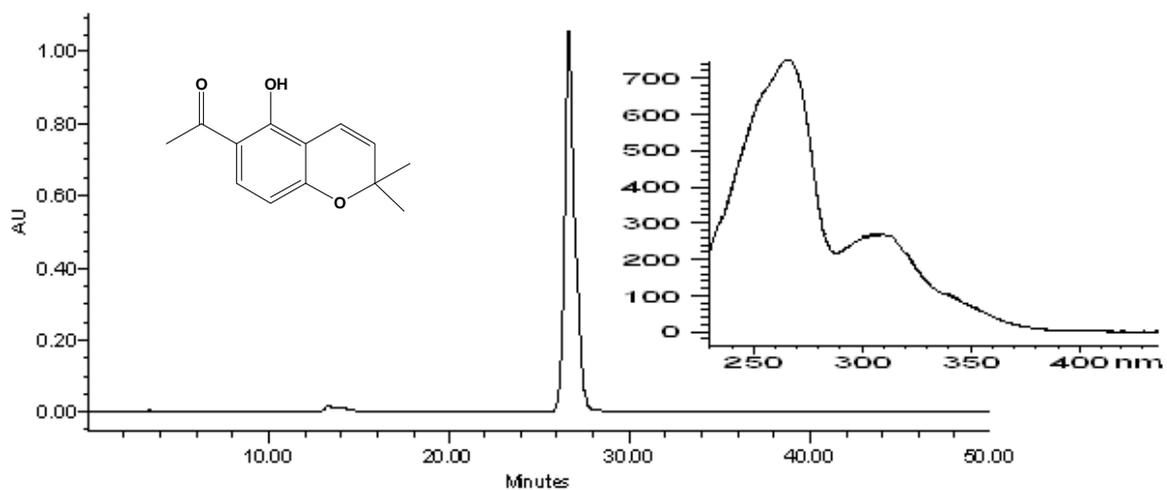
10) 3-O-glucósido del kamferol



11) 3-O-rutinósido de la isoramnetina



12) Lactona del ácido 3-*O*-feruloil-4-*O*-cafeoilquínico

ANEXO 3. Perfil del aceite esencial obtenido por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.



Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*^{☆,☆☆}

Francisco Palacios-Espinosa^a, Myrna Déciga-Campos^b, Rachel Mata^{a,*}

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

^b Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2007

Received in revised form 30 April 2008

Accepted 12 May 2008

Available online 18 May 2008

Keywords:

Brickellia veronicifolia

Asteraceae

Antinociceptive

Hypoglycemic

6-Methoxysalicylic acid

2-Methoxybenzoic acid

Benzyl-2,6-dimethoxybenzoate

ABSTRACT

Introduction: *Brickellia veronicifolia* (Kunth) Gray (Asteraceae) (BV) is broadly commercialized for treating gastrointestinal diseases (stomach aches, biliary colics and dyspepsia), arthritis, diabetes and painful inflammatory complaints.

Aims of the study: In order to complete the preclinical pharmacological profile of BV, first the antinociceptive effect of an organic extract (BVE) and isolated metabolites on the hot plate and writhing tests was assessed.

Experimental: Then, their potential hypoglycemic effects were analyzed in normoglycemic and diabetic rats; in addition, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed. Finally, the spasmolytic activity of BVE was assessed *in vivo* using the gastrointestinal motility test (GMT) in mice.

Results: The results revealed that BVE (100–600 mg/kg), 6-methoxysalicylic acid (**1**), 2-methoxybenzoic acid (**2**), benzyl-2,6-dimethoxybenzoate (**3**), and taraxasteryl acetate (**4**) showed significant analgesic effects. Compounds **2** and **3** were the most active (1–100 mg/kg) in the hot plate and writhing tests, respectively. In the antidiabetic assays, BVE (100 mg/kg) showed an important hypoglycemic action. Furthermore, at the same dose, it provoked a significant postprandial decrease of blood glucose level after 30 min of a glucose challenge. Finally, the GMT in mice revealed the spasmolytic activity *in vivo* of BVE (31.6 mg/kg).

Conclusion: The overall information tends to support the vernacular uses of the plant.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The aerial parts of *Brickellia veronicifolia* (Kunth) Gray (Asteraceae) are broadly commercialized to cure gastrointestinal disorders including stomach aches, biliary colics, gastritis and dyspepsia. In addition, the species is highly valued for the treatment of arthritis, diabetes, infectious diseases, as well as other painful inflammatory complaints (Andrade-Cetto and Heinrich, 2005; Argueta, 1994; Martínez, 1989). In central Mexico the herb is commonly known as “pexto”, “peiston”, “Gobernadora de Puebla” or “Prodigiosa”. Previous pharmacological investigation demonstrated the antidiarrhoeal (Perez-G, 1996), antioxidant and hypoglycemic activities (Pérez et al., 2000; Pérez-G et al., 2004;

Pérez-Gutiérrez et al., 1998) of an organic extract prepared from the aerial parts of the plant. The hypoglycemic effect was assessed in mice treated intraperitoneally with a hexane extract of the whole plant at the doses of 100, 200 and 300 mg/kg. Chemical studies conducted also with the aerial parts of the plant led to the isolation of several 6-methoxy-flavonols and labdane-type diterpenes (Calderón et al., 1983; Inhuma et al., 1985; Roberts et al., 1980, 1984). More recently, bioassay-guided fractionation of a spasmolytic organic extract and an essential oil, both from the aerial parts of the plant, led to the isolation of new salicylic acid and benzyl benzoates derivatives with *in vitro* smooth muscle relaxant properties (Rivero-Cruz et al., 2005). These compounds inhibited also the ability of calmodulin (CaM) to activate PDE1 (Rivero-Cruz et al., 2007), therefore it was suggested that CaM was involved in their spasmolytic action. The active extract was not toxic to mice neither mutagenic according to the Lorke and Ames tests, respectively (Déciga-Campos et al., 2007). Finally, a sensitive and accurate analytical ¹H NMR method was developed for quantify the anti-spasmodic principles of the essential oil (Rivero-Cruz et al., 2006).

As part of our investigations dealing with the preclinical efficacy of *Brickellia veronicifolia* (BV), the present work was undertaken to

[☆] This work was taken in part from the Ph.D. thesis of Francisco Palacios-Espinosa.

^{☆☆} This study was performed according to international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. It has ethnopharmacological importance for evaluating antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic actions of *Brickellia veronicifolia* extracts and compounds.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 5622 5289; fax: +52 5 5622 5329.

E-mail address: rachel@servidor.unam.mx (R. Mata).

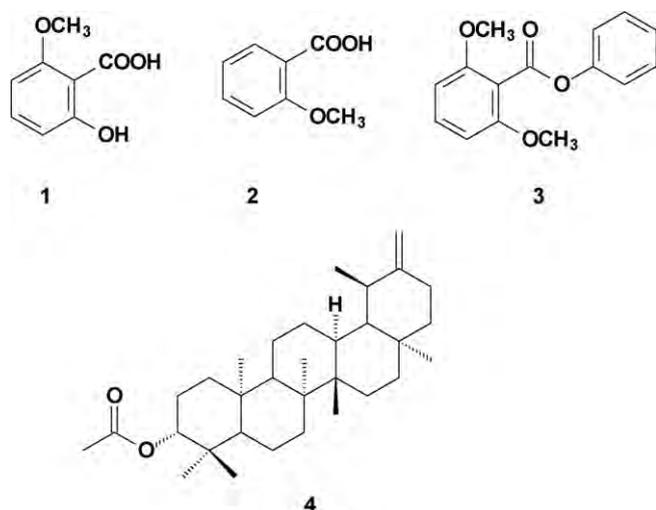


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–4.

establish the spasmolytic and antinociceptive effects *in vivo* of an extract (BVE) and compounds (Fig. 1) from this species. In addition, the hypoglycemic effect of BVE, administered orally, was also investigated in order to find out if carbohydrate absorption was linked to the antidiabetic properties of the plant (Fröde and Medeiros, 2008).

2. Material and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *Brickellia veronicifolia* (Kunth) Gray (Asteraceae) (2.5 kg) were collected in Municipio de La Soledad, Aculco, State of Mexico, Mexico on December 10, 2000. An authenticated voucher specimen (BRC-1M) is deposited in the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

2.2. General experimental procedures

The melting point of the synthetic compound was determined on a Fisher-Johns apparatus. The IR spectrum was recorded as KBr pellet on a PerkinElmer 59913 spectrophotometer. NMR (¹H and ¹³C) spectra were recorded on a Varian Mercury 300 spectrometer in CDCl₃, at 300 MHz (¹H) and 75 (¹³C) MHz respectively, using tetramethylsilane (TMS) as an internal standard. EIMS were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. TLC analyses were performed on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck), and visualization of the plates was carried out using a ceric sulphate (10%) solution in H₂SO₄.

2.3. Extract preparation

Dried and shredded aerial parts (500 g) were macerated with CH₂Cl₂–MeOH (1:1) (1 L × 3) during 6 days at room temperature. After filtration, the extract was concentrated under vacuum to yield 68 g of a greenish residue.

2.4. Essential oil from the aerial parts

The essential oil (EOBV) from the aerial parts was prepared by hydrodistillation from 100 g of plant material, according with the procedure previously described. The yield was 0.2 g (WHO, 1998).

2.5. Chemicals and drugs

Morphine (MOR) and metamizol (MET) were purchased from Laboratorios Pisa (Mexico City) and Aventis Pharma (Mexico City), respectively. Streptozotocin (STZ), glibenclamide (GLIB) and atropine sulphate (AS) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 6-Methoxysalicylic acid (6-MSA) (1), 2-methoxybenzoic acid (2-MBA) (2) and taraxasteryl acetate (TA) (4) were isolated from BV while benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (B-2,6-DMB) (3) was prepared by synthesis as previously described (Rivero-Cruz et al., 2007).

2.6. Animals

ICR male mice (*Mus domesticus*) weighing 20–25 g and Wistar male rats (*Ratus norvegicus*) with body weight range 180–200 g were used in the experiments. Both types of animals were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.). They were housed under standard laboratory conditions and maintained on standard pellet diet and water *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. After the experiments, all animals were sacrificed in a CO₂ chamber. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.7. Measurement of antinociceptive activity

2.7.1. Acetic acid-induced writhing test

The test was carried out using a procedure previously described (Déciga-Campos et al., 2006; Le Bars et al., 2001; Zimmerman, 1983). Briefly, twelve hours before the experiments food was withheld, but the animals had free access to drinking water. The organic extract of *Brickellia veronicifolia* (BVE, 100–600 mg/kg) or pure compounds (1–3, 10–100 mg/kg) were suspended with Tween[®] 80 (0.05%) in saline solution (SS) and administered by intragastric route 30 min before intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid (10 mL/kg). The mice were then kept individually for observation in single boxes, and subsequently the number of abdominal contractions between 0 and 30 min after acid injection were counted. Control animals received an appropriate volume of vehicle; metamizol [MET, 100 mg/kg suspended in Tween[®] 80 (0.05%) in SS] was used as positive control. The data represent the average of total number of writhes observed. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal contractions 30' after treatments, *i.e.* the differences between control animals and animals pretreated with the extract or pure compounds 30' after treatments.

2.7.2. Hot-plate test

The method was applied as previously described (Déciga-Campos et al., 2006; Le Bars et al., 2001; Zimmerman, 1983) using a conventional hot-plate Ugo Basile apparatus. Mice were placed into the acrylic cylinder on the heated surface (55.5 ± 0.2 °C); the time between placement of the mouse in the platform and shaking/licking of the paws or jumping was recorded as the response latency. Mice received an oral administration of vehicle (0.05% Tween-80 in SS) or increasing doses of BVE [100–600 mg/kg and suspended with Tween[®] 80 (0.05%) in SS] or pure compounds 1–4 [1–100 mg/kg, *p.o.* suspended with Tween[®] 80 (0.05%) in SS] 30 min before the thermal noxious stimuli in the hot-plate test. MOR (3.16 mg/kg, *i.p.*) was used as positive control. Mice were observed before and 30, 60, 90, 120 and 150 min after treatments. A cut-off of 30 s was employed; this time of exposition to the treatments

was enough to observe the animal responses without provoking tissue damage. The cumulative antinociception effect during the whole observation period was determined as the area under the curve of the time of course (AUC) to obtain the dose–response curve and to analyze the whole antinociceptive effect elicited by the treatments.

2.8. Measurement of hypoglycemic activity

2.8.1. Induction of diabetes in rats

Diabetes mellitus type 2 was induced by a single intraperitoneal injection of freshly prepared STZ (50 mg/kg bw) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) to overnight fasted rats (Guerrero-Analco et al., 2005). After 7 days of STZ administration, blood glucose levels of each rat were measured. Animals with blood glucose levels higher than 250 mg/dL were considered diabetic and were included in the study (Guerrero-Analco et al., 2005, 2007).

2.8.2. Preparation of the test samples and collection of blood samples

All samples were suspended in saline solution with Tween® 80 (0.05%). Blood samples were collected from caudal vein by means of a little incision in the end of the tail. Blood glucose levels (mg/dL) were estimated by enzymatic glucose oxidase method using a commercial glucometer (*One Touch Ultra*, Jonhson-Jonhson, California, USA).

Percentage variation of glycemia for each group was calculated with respect to initial (0 h) level according to:

$$\% \text{Variation of glycemia} = [(G_t - G_i) / G_i] \times 100$$

where G_i is initial glycemia values and G_t is the glycemia value at different times after samples administration. Control rats group only received the vehicle (0.05% Tween® 80 in saline solution). GLIB (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) was used as a hypoglycemic model drug and it was suspended in the same vehicle.

2.8.3. Acute hypoglycemic assay

Normoglycemic rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food for 12 h before experimentation but allowed free access to tap water throughout. BVE treatments (30, 100 and 300 mg/kg of bw) were suspended in 0.05% of Tween® 80 in saline solution. The samples were prepared freshly immediately before experimentation and administered by intragastrical route. Control rats received only the vehicle (0.05% Tween® 80 in SS) and GLIB (10 mg/kg of bw) respectively; by the same route. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after treatments (Day and Bailey, 2006; Guerrero-Analco et al., 2005).

2.8.4. Acute antihyperglycemic assay

STZ-induced diabetic rats were placed in single cages with wire-net floors and deprived of food for 12 h before experimentation but allowed free access to tap water throughout. BVE (30, 100 or 300 mg/kg of bw) was suspended in 0.05% of Tween® 80 in SS. The samples were prepared freshly immediately before experimentation and administered by intragastrical route. Control rats received only the vehicle (0.05% Tween® 80 in SS) or GLIB (10 mg/kg of bw) respectively; by the same route. Blood samples were collected at 0, 1.5, 3, 5, 7, and 9 h after drugs administration (Day and Bailey, 2006; Guerrero-Analco et al., 2005).

2.9. Oral glucose tolerance test

Eighteen rats were fasted during 16 h and assigned randomly into 3 equal groups ($n=6$). These rats were orally treated in the

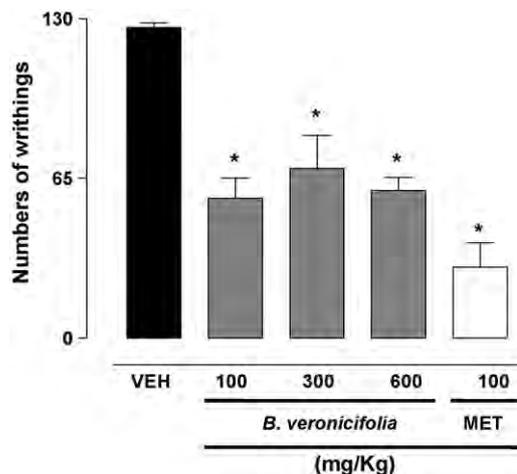


Fig. 2. Antinociceptive effect of BVE (100–600 mg/kg, p.o.) in mice submitted to the writhing test. The extract was administered orally 30 min before the intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid solution. Number of writhes was counted over a 30 min period. MET (100 mg/kg, p.o.) was used as positive controls and administered 30 min before the noxious stimulation. Bars are the means of six mice \pm S.E.M. *Significantly different from vehicle group ($P < 0.05$) as determined by analysis of variance followed by Dunnett's test.

following manner: Group 1 (100 mg/kg of BVE), Group 2 (vehicle, 0.05% of Tween® 80 in SS) and Group 3 (10 mg/kg of GLIB). Thirty minutes later, all these rats were orally loaded with a glucose solution [1 g/kg of 10% (w/v)]. Blood samples were collected from the tails of these rats immediately prior to commencement of treatment and at 30, 60, 90, 120 and 180 min after glucose challenge (Ojewole et al., 2006; Williamson et al., 1996).

2.10. Intestinal motility test in mice

A black marker (0.5 mL per mouse; 10% charcoal suspension in 5% acacia gum) was given orally to 24 h fasted ICR mice (water *ad libitum*) 15 min after an oral administration of BVE (3.16–316 mg/kg), positive control (AS, 1–3 mg/kg) or vehicle (5% acacia gum). After 20 min, the animals were killed by cervical dislocation and the entire length of the small intestine, from the pylorus to the caecum, was removed carefully. The distance traveled by the

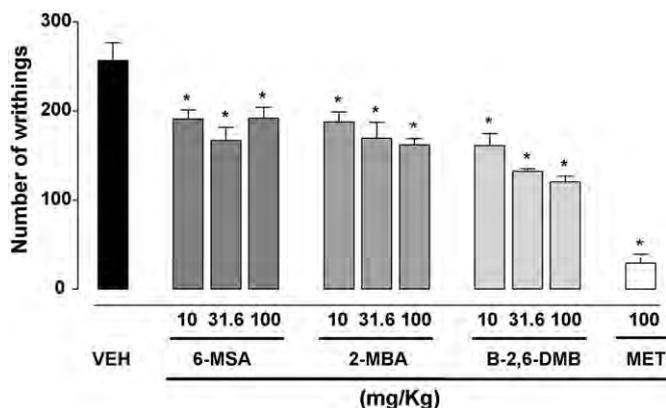


Fig. 3. Antinociceptive effect of 6-MSA, 2-MBA and B-2,6-DMB (1–100 mg/kg, p.o.) in mice submitted to the writhing test. Drugs were administered orally 30 min before the test. Number of writhes was counted over a 30-min period following the injection of 0.6% acetic acid. Data are the total number of writhes in 30 min. MET (100 mg/kg, p.o.) was used as positive controls and administered 30 min before the noxious stimulation. Bars are the means of six mice \pm S.E.M. *Significantly different from vehicle group ($P < 0.05$) as determined by analysis of variance followed by Dunnett's test.

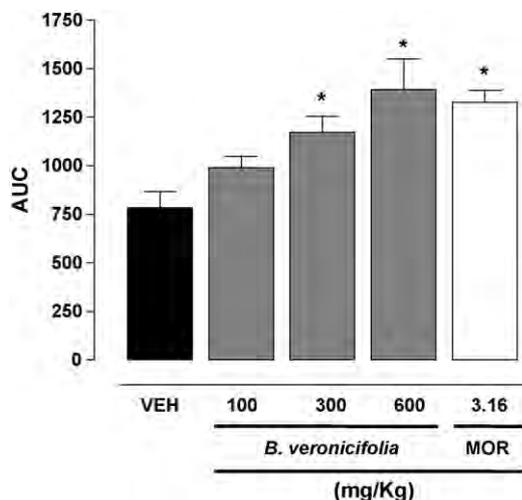


Fig. 4. Antinociceptive effect of BVE (100–600 mg/kg, p.o.) in mice submitted to the hot-plate test. The extract was administered orally 30 min before the test. Thermal latency was assessed during 2 h. Data in the hot-plate test are the area under the latency against time curve (AUC). MOR (3.16 mg/kg, i.p.) was used as positive controls and administered 15 min before the noxious stimulation. Bars are the means of six mice ± S.E.M. *Significantly different from vehicle group (*P<0.05) as determined by analysis of variance followed by Dunnett's test.

marker in the intestine (A) and the total length of the intestine (B) was measured. The intestinal transit was calculated for each mouse in the different groups (control and treated with BVE or AS) as (A/B) × 100 and reported as % of inhibition (Astudillo et al., 2004; Williamson et al., 1996).

2.11. General data analysis

Data are expressed as the mean ± S.E.M. for the number (n=6) of animals in each group. In all cases the results of treated-animal (compounds, extracts and reference drugs) groups were compared with the appropriate control (vehicle) groups. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Dunnett post hoc to determine the source of significant differences where appropriate; *P<0.05 was considered statistically significant. Prisma Graph-Pad (version 4.0) software was used for statistics and plotting.

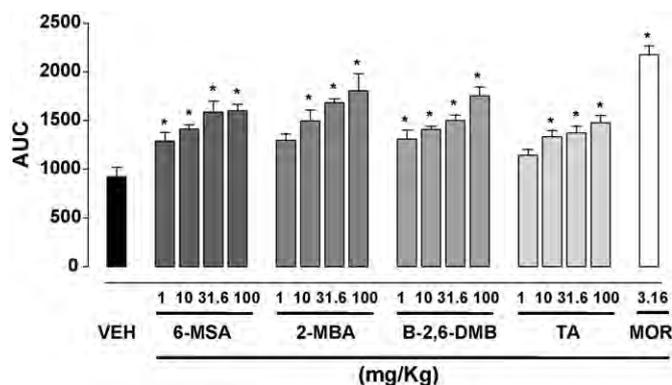


Fig. 5. Antinociceptive effect of 6-MSA, 2-MBA, B-2,6-DMB and TA (1–100 mg/kg, p.o.) in mice submitted to the hot-plate test. Drugs were administered orally 30 min before the test. MOR (3.16 mg/kg, i.p.) was used as positive controls and administered 15 min before the noxious stimulation. Thermal latency was assessed during 2 h and data are the area under the latency against time curve (AUC). Bars are the means of six mice ± S.E.M. *Significantly different from vehicle group (*P<0.05) as determined by analysis of variance followed by Dunnett's test.

Table 1 Acute effect of the extract and essential oil of *Brickellia veronicifolia* on blood glucose levels in normal rats

Test samples	Blood glucose concentration (mg/dL)									
	Dose (per os) mg/kg of bw	0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h			
Control (vehicle)	-	92.33 ± 1.20	107.30 ± 2.29 (16.21)	100.11 ± 2.74 (8.42)	86.89 ± 3.26 (-5.90)	84.12 ± 1.41 (-9.09)	84.13 ± 2.71 (-8.88)			
Glibenclamide	10	91.83 ± 3.35	90.66 ± 1.93 (-1.28)*	78.83 ± 5.13 (-13.48)*	60.82 ± 3.04 (-33.77)*	58.77 ± 2.70(-36.01)*	65.05 ± 2.85 (-29.17)*			
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	30	92.0 ± 3.13	100.46 ± 2.88 (9.19)	81.83 ± 2.64 (-11.05)*	76.84 ± 1.96(-16.48)*	72.48 ± 1.56(-21.22)*	72.66 ± 3.18 (-21.02)*			
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	100	97.83 ± 3.03	101.38 ± 2.56 (3.62)	84.28 ± 1.78 (-13.86)*	71.13 ± 2.39(-27.30)*	60.97 ± 3.55(-37.68)*	67.05 ± 1.15(-31.46)*			
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	300	103.83 ± 1.49	103.65 ± 2.36 (-0.18)*	75.98 ± 2.88 (-26.83)*	64.55 ± 2.24 (-37.83)*	68.85 ± 0.98 (-33.69)*	66.49 ± 0.98 (-35.96)*			
Essential oil from <i>Brickellia veronicifolia</i>	10	99.50 ± 1.78	88.49 ± 1.48 (-11.06)*	71.54 ± 1.71 (-28.10)*	61.06 ± 1.93 (-38.63)*	59.52 ± 0.99 (-40.18)*	67.62 ± 1.63 (-32.04)*			

Each value is the mean ± S.E.M. for 6 rats in each group. *P<0.05 significantly different ANOVA followed by Dunnett's t-test for comparison with respect to initial levels in each group. %Variation of glycemia is in parentheses.

Table 2
Acute effect of the extract and essential oil of *Brickellia veronicifolia* on blood glucose levels in STZ-diabetics rats

Test samples	Blood glucose concentration (mg/dL)					
	0 h	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehicle)	315.17 ± 0.94	298.55 ± 1.84 (-5.27)	291.80 ± 0.92 (-7.41)	291.95 ± 1.26 (-7.37)	286.21 ± 1.33 (-9.19)	310.49 ± 1.21 (-1.49)
Glibenclamide	308.17 ± 2.73	312.59 ± 2.55 (1.43)	261.17 ± 3.17 (-15.25)	215.80 ± 3.62 (-30.37)*	237.24 ± 4.28 (-23.01)	253.39 ± 5.74 (-17.77)
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	316.13 ± 3.08	267.16 ± 2.14 (-15.49)*	224.31 ± 3.72 (-29.04)*	202.35 ± 2.58 (-35.99)*	236.70 ± 3.04 (-25.12)	230.22 ± 2.98 (-27.17)*
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	310.17 ± 4.42	292.99 ± 3.26 (-5.54)	267.18 ± 3.32 (-13.86)	239.85 ± 3.62 (-22.67)*	244.74 ± 3.18 (-21.09)*	242.97 ± 3.57 (-21.67)*
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	315.0 ± 4.97	322.05 ± 4.75 (2.24)	277.66 ± 5.59 (-11.85)	242.81 ± 5.15 (-22.92)*	274.53 ± 4.26 (-12.85)	255.57 ± 3.07 (-18.87)
Essential oil from <i>Brickellia veronicifolia</i>	322.50 ± 3.54	280.91 ± 2.98 (-12.90)*	264.64 ± 3.21 (-17.94)*	251.91 ± 4.07 (-21.89)*	242.45 ± 2.97 (-24.82)*	280.24 ± 3.40 (-13.11)

Each value is the mean ± S.E.M. for 6 rats in each group. * $P < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to initial levels in each group. % Variation of glycemia is in parentheses.

3. Results

3.1. Measurement of antinociceptive activity

Graded doses of BVE (100, 300 or 600 mg/kg, *p.o.*) caused a significant decrease of acetic acid-induced contortions in mice (Fig. 2). The effect of the extract was not dose dependent since the pharmacological action was similar at 100 and 600 mg/kg. The pure compounds isolated from the crude extract (Fig. 1), namely 6-MSA (1), 2-MBA (2) and B-2,6-DMB (3), were also assayed at the doses of 10, 31.6 and 100 mg/kg; the pharmacological action of B-2,6-DMB (3) and 2-MBA (2) was dose dependent, however that of 6-MSA (1) was not (Fig. 3). In all cases the effect was significantly different than the vehicle. B-2,6-DMB (3) showed the best effect since at the dose of 100 mg/kg reduced by 47% the number of writhing-movements in treated animals.

The results presented in Figs. 4 and 5 indicated that the extract and the four isolates provoked a dose dependent antinociceptive effect when tested in the hot-plate model. The most active compound was 2-MBA (2).

3.2. Measurement of hypoglycemic activity

Oral administration of BVE tested at the doses of 30, 100 and 300 mg/kg caused a significant reduction in blood glucose levels in normal rats when compared with vehicle-treated group ($P < 0.05$) (Table 1); EOBV at the dose of 10 mg/kg provoked also a significant reduction of glucose levels after 5 h (Table 1). In the case of the experiments with STZ-diabetic rats, BVE (30, 100 and 300 mg/kg) and EOBV (10 mg/kg) induced significant decrease on blood glucose levels; the best activity for BVE was observed at the dose of 30 mg/kg decreasing blood glucose levels by 36%. EOBV at the single dose tested reduced significantly blood glucose levels up to 25% (Table 2). The results of the OGT test (Table 3) revealed that at the dose of 100 mg/kg the extract induced a significant decrement of blood glucose levels after 30 min of the glucose challenge. In the control group the peak value was attained almost within 30 min after glucose feeding, then, the value returned to normal fasting limit at the end of the second h. Once the blood glucose value attained the normal fasting limit (at the end of 2 h), it was maintained almost at the same level, even at the end of 3 h after glucose feeding. The blood glucose concentration in the treated group rose to a peak value (174.83 mg/dL) at 30 min after the glucose load; next, it fell to near normal fasting level (0 h) by the end of the third h.

3.3. Intestinal motility test

In the study of the gastrointestinal motility in mice (Fig. 6), BVE at the dose of 10 mg/kg and 31.6 mg/kg reduced GI transit by 25.6% and 32.1%, respectively. Atropine (positive control) at 1 mg/kg reduced GI transit by 31%.

4. Discussion and conclusions

In Mexico an important segment of the population relies on botanical raw materials for primary health care, therefore it is very important to investigate these herbs from the pharmacological point of view to establish their real preclinical and clinical efficacy. In addition, this information will be useful to integrate their scientific monographs and promote the rational use of herbal drugs in Mexico. Consequently, the present investigation was undertaken to complete the preclinical pharmacological profile of *Brickellia veronicifolia*, widely commercialized in Mexico to treat gastrointestinal diseases, diabetes and painful complaints. Different activities including antinociceptive, antidiabetic and

Table 3
Effect of the extract of *Brickellia veronicifolia* on Oral Glucose Tolerance Test in normal rats

Test samples	Blood glucose concentration (mg/dL)						
	Dose (per os) mg/kg of bw	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
Control (vehicle)	–	87.17 ± 2.27	174.83 ± 5.08	140.0 ± 4.75	119.50 ± 4.98	111.0 ± 3.44	97.67 ± 1.80
Glibenclamide	10	90.33 ± 2.47	171.17 ± 4.49	117.0 ± 3.34*	98.83 ± 2.52*	94.0 ± 2.76*	81.83 ± 1.69*
Extract of <i>Brickellia veronicifolia</i>	100	88.50 ± 2.67	149.33 ± 3.04*	138.33 ± 2.88	112.50 ± 2.54	105.67 ± 3.99	93.83 ± 3.33

Each value is the mean ± S.E.M. for 6 rats in each group. * $P < 0.05$ significantly different ANOVA followed by Dunnett's t -test for comparison with respect to initial levels in each group.

spasmolytic were assessed using well known *in vivo* pharmacological models; in all cases the primary target for testing was the plant crude extract considering that it is similar to the preparations used in traditional medicine, although some pure compounds isolated from the plant were also evaluated.

In the first place, the antinociceptive effect on two well known methods, namely the hot plate and writhing tests, was determined. The hot-plate test is based on the use of a short-duration nociceptive thermal stimulus (phasic pain) while writhing use a long-duration chemical stimulus (tonic pain). Tissue injury leads to a persistent afferent input in the latter. The nociceptive response in the hot-plate model seems to result from direct activation of nociceptors and is inhibited by drugs which act mainly at central sites; this antinociception is hypothesized to reflect analgesia at supraspinal level. The writhing test has been reported to be useful to investigate peripheral antinociceptive activity. This activity is attributed mainly to the development of an inflammatory reaction at the site of injection and increased synaptic transmission in the spinal cord (Chiang and Zhuo, 1989; Collier et al., 1968; Le Bars et al., 2001). In the present work, the results revealed that the extract of the plant as well as some of its secondary metabolites possessed significant analgesic effect in both models. Accordingly, the plant is effective for treating central and peripheral pains. Compounds 6-MSA (**1**), 2-MBA (**2**), B-2,6-DMB (**3**) and TA (**4**) are the major secondary metabolites of *Brickellia veronicifolia* (Rivero-Cruz et al., 2005) and were assayed for their potential antinociceptive effect. In the case of B-2,6-DMB (**3**), its synthesis was easily performed by condensing benzyl alcohol and 2,6-dimethoxy benzoyl chloride (Rivero-Cruz et al., 2007), whereas **1**, **2** and **4** were available from previous phytochemical work (Rivero-Cruz et al., 2005). Among the tested compounds, the best antinociceptive effect in

the hot-plate model was exerted by 2-MBA (**2**) which in the range of doses between 10 and 100 mg/kg induced an important increment of the latency response in treated mice. On the other hand, in the writhing test the benzyl benzoate B-2,6-DMB (**3**) was the most active compound, provoking an important reduction of the writhing responses in the test animals. In both cases the compounds were more active than the original extract indicating that they are the antinociceptive principles of the plant, although other analgesic principles might be present. Furthermore, the concentration of compounds **1–4** (0.002%, 0.001%, 0.003% and 0.02% of the dry plant material wt., respectively), in the crude drug (Rivero-Cruz et al., 2005) correlates well with the antinociceptive activity found in this work. To our knowledge this is the first report of the analgesic properties of benzyl benzoate-type of compounds.

Previous work by Pérez-Gutiérrez et al. (1998) demonstrated the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of an extract of *Brickellia veronicifolia* (100, 200 and 300 mg/kg) administered *i.p.* Considering that the study of at least two different routes of administration (*i.p.* vs oral route) can help in the analysis of the possible site of action of an extract or pure compound, in the present investigation, the hypoglycemic and antihyperglycemic effects of an extract of *Brickellia veronicifolia* administered *p.o.* was analyzed. The results indicated that the BVE (100 mg/kg) administered *p.o.* to normal rats, had a hypoglycemic effect similar to the hexane extract (100 mg/kg) administered *i.p.* in the work of Pérez-Gutiérrez et al. (1998). Altogether, this information suggests that inhibition of carbohydrate absorption is not linked to the antidiabetic properties of *Brickellia veronicifolia* (Fröde and Medeiros, 2008). Furthermore, the OGT performed in this work showed that BVE provoked a significant postprandial decrease of blood glucose level after 30 min of the glucose challenge. Blood glucose levels in the control group throughout the experiment followed the general trends usually observed for normal animals and human beings as well (Kar et al., 1999), since the peak value was attained almost within 30–60 min after glucose feeding.

The spasmolytic action *in vitro* of *Brickellia veronicifolia* previously described by Rivero-Cruz et al. (2005) encouraged us to determine the effect of BVE on GI motility *in vivo*. The results indicated that the crude extract was also effective *in vivo*; the effect of BVE at the dose of 31.6 mg/kg was comparable to that of atropine at the dose of 1 mg/kg. For the extract the gastrointestinal motility assay showed a typical biphasic pattern indicative of hormesis (Calabrese and Baldwin, 2003; Jonas and Ives, 2005). Hormesis is a dose response phenomenon characterized by a low dose inhibition and high dose stimulation or vice versa, resulting in either a J-shaped or an inverted U-shaped dose response. The biochemical mechanisms by which hormesis work are not well understood (Rosales-Reyes et al., 2008).

In summary, the overall information tends to support the efficacy of *Brickellia veronicifolia* for the treatment of painful complaints, diabetes and stomach aches. Both the extract and active principles of the plant are useful for treating inflammatory and central pains. The information generated in this and previous works

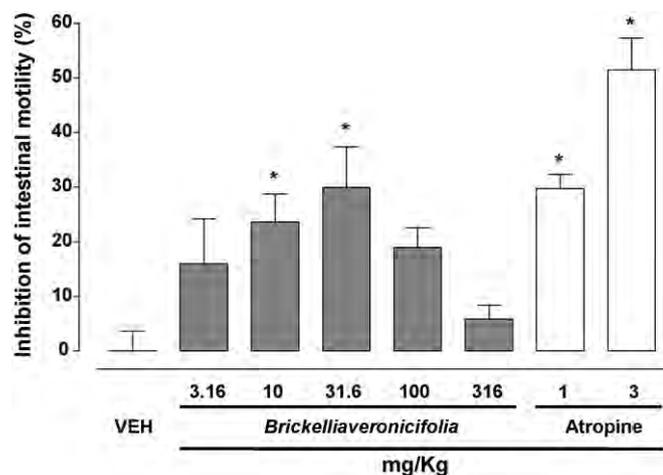


Fig. 6. Effect of BVE (3.16–316 mg/kg, *p.o.*) on gastrointestinal motility in mice. Atropine sulphate (1–3 mg/kg, *p.o.*) was used as positive control. Bars are the means of six mice ± S.E.M. *Significantly different from vehicle group ($P < 0.05$) as determined by analysis of variance followed by Dunnett's test.

will be useful for integrating a scientific monograph on *Brickellia veronicifolia*, which in turn will contribute to its rational use.

Acknowledgements

This work was supported by grants of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Proyecto C01-018) and DGAPA-UNAM IN212005. The technical assistance of Isabel Rivero-Cruz, Laura Acevedo, Rosa del Villar, Marisela Gutiérrez and Georgina Duarte-Lisci is also recognized. Francisco Palacios-Espinosa acknowledges fellowships from CONACyT, to carry out graduate studies.

Appendix A

2-MBA	2-methoxybenzoic acid
6-MSA	6-methoxysalicylic acid
ANOVA	analysis of variance
B-2,6-DMB	benzyl-2,6-dimethoxybenzoate
BE	<i>Brickellia veronicifolia</i> extract
CDCl ₃	deuterated chloroform
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
EIMS	electronic impact mass spectrum
EOBV	essential oil from <i>Brickellia veronicifolia</i>
GI	gastrointestinal
h	hour
¹ H NMR	proton nuclear magnetic resonance
i.p.	intraperitoneal
MeOH	methanol
MET	metamizol
mg/kg	milligrams per kilogram of body weight
min	minutes
MOR	morphine
OGTT	oral glucose tolerance test
p.o.	per os
STZ	streptozotocin
TA	taraxasteryl acetate

References

- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325–348.
- Argueta, V.A. (Comp), 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, vol. 3. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F.
- Astudillo, A., Hong, E., Bye, R., Navarrete, A., 2004. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytotherapy Research* 18, 102–106.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Inorganics and hormesis. *Critical Reviews in Toxicology* 33, 215–304.
- Calderón, J.S., Quijano, L., Cristia, M., Gómez, F., Ríos, T., 1983. Labdane diterpenes from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytochemistry* 22, 1783–1785.
- Chiang, C.Y., Zhuo, M., 1989. Evidence for the involvement of a descending cholinergic pathway in systemic morphine analgesia. *Brain Research* 478, 293–300.
- Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesics drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology* 32, 295–310.
- Day, C., Bailey, C.J., 2006. Preclinical and clinical methods for evaluating antidiabetic activity of plants. In: Soumyanath, A. (Ed.), *Traditional Medicines for*

- Modern Times. *Antidiabetic Plants*. Taylor and Francis Group, New York, pp. 83–98.
- Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Rivero-Cruz, I., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 334–342.
- Déciga-Campos, M., Guerrero-Analco, J.A., Quijano, L., Mata, R., 2006. Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 83, 342–348.
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S., 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 173–183.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martínez, P., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2005. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica* 71, 1099–1105.
- Guerrero-Analco, J., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata, R., 2007. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry* 68, 2087–2095.
- Inhuma, M., Roberts, M.F., Matlin, S.A., Stacey, V.E., Timmermann, B.N., Mabry, T.J., Brown, R., 1985. Synthesis and revised structure of the flavone brickellin. *Phytochemistry* 24, 1367–1368.
- Jonas, W.B., Ives, J.A., 2005. Should we explore the clinical utility of hormesis? *BELLE Newsletter* 13, 2–4.
- Kar, A., Choudhary, B.K., Bandyopadhyay, N.G., 1999. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hypoglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 179–184.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53, 597–652.
- Martínez, M., 1989. *Las Plantas Medicinales de México*, 6^a Ed. Ediciones Botas, México D.F, pp. 85–87.
- Ojewole, J.A.O., Drewes, S.E., Khan, F., 2006. Vasodilatory and hypoglycaemic effects of two pyrano-isoflavone extractives from *Eriosema kraussianum* rootstock in experimental rat models. *Phytochemistry* 67, 610–617.
- Pérez, R.M., Cervantes, H., Zavala, M.A., Sánchez, J., Pérez, S., Pérez, C., 2000. Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine* 7, 25–29.
- Pérez-G, R.M., 1996. Effect of aqueous extract of *Brickellia veronicaefolia* on the gastrointestinal tract of guinea-pig, rats and mice. *Phytotherapy Research* 10, 677–679.
- Pérez-G, R.M., Vargas, S.R., Martínez, M.F.J., Cordova, R.I., 2004. Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytotherapy Research* 18, 428–430.
- Pérez-Gutiérrez, R.M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S., 1998. Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*, 40. *Salud Pública de México*, pp. 354–358.
- Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez, J.M., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R., 2006. Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Natural Products* 69, 1172–1176.
- Rivero-Cruz, B., Rivero-Cruz, I., Rodríguez-Sotres, R., Mata, R., 2007. Effect of natural and synthetic benzyl benzoates on calmodulin. *Phytochemistry* 68, 1147–1155.
- Rivero-Cruz, B., Rojas, M.A., Rodríguez-Sotres, R., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R., 2005. Smooth muscle relaxant action of benzyl benzoates and salicylic acid derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on isolated guinea-pig ileum. *Planta Medica* 70, 320–325.
- Roberts, M.F., Timmermann, B.N., Mabry, T.J., 1980. 6-Methoxyflavonols from *Brickellia veronicaefolia* (Compositae). *Phytochemistry* 19, 127–129.
- Roberts, M.F., Timmermann, B.N., Mabry, T.J., Brown, R., Matlin, S.A., 1984. Brickellin, a novel flavone from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. *Phytochemistry* 23, 163–165.
- Rosales-Reyes, T., De la Garza, M., Arias-Castro, C., Rodríguez-Mendiola, M., Fattel-Fazenda, S., Arce-Popoca, E., Hernández-García, S., Villa-Treviño, S., 2008. Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 381–386.
- WHO, 1998. *Quality Control for Medicinal Plant Materials*. WHO publications, Geneva, p. 117.
- Williamson, E.M., Okpako, D.T., Evans, F.J., 1996. *Pharmacological Methods in Phytotherapy Research*, Vol. 1. John Wiley and Sons, New York, p. 228.
- Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.