



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y QUÍMICA DE
Datura lanosa A.S. BARCLAY EX BYE
(SOLANACEAE): UNA CONTRIBUCIÓN PARA LA
ELABORACIÓN DE SU MONOGRAFÍA TIPO OMS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:
BIOL. VIRIDIANA MORALES SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

	Páginas
I RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
2 ANTECEDENTES	5
2.1 Género <i>Datura</i> . Descripción y distribución	5
2.2 Generalidades de los alcaloides tropánicos del género <i>Datura</i>	6
2.3 <i>Datura</i> en México	9
2.4 <i>Datura lanosa</i>	12
3 OBJETIVOS	14
• Objetivo General	14
• Objetivos particulares	15
4 HIPÓTESIS	15
5 PARTE EXPERIMENTAL	15
5.1 Recolección del material vegetal	15
5.2 Revisión de información Etnobotánica	17
5.2.1 Fuentes bibliográficas y comunicaciones personales	17
5.2.2 Revisión de ejemplares de herbario	17
5.3 Caracterización anatómica y estructural de <i>Datura lanosa</i>	17
5.3.1 Deshidratación del material vegetal	17
5.3.2 Análisis microscópico	17
5.3.3 Inclusión del material vegetal	18
5.3.4 Obtención de cortes anatómicos	18
5.3.5 Técnicas de tinción	18
5.4 Estudio Fitoquímico de <i>Datura lanosa</i>	19
5.4.1 Obtención de los extractos totales a partir de Las diferentes partes vegetales de <i>Datura lanosa</i>	19
5.4.2 Fraccionamiento de los extractos íntegros para la obtención del crudo alcaloideo de las distintas partes vegetales	20
5.4.3 Análisis cromatográficos	21
5.4.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	21
5.4.3.2 Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas en su modalidad ionización química (CG/EM-IQ) e impacto electrónico (CG/EM-IE)	22
5.4.3.3 Análisis por Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)	23

5.5 Pruebas biológicas	24
5.5.1 Determinación del potencial antimicrobiano	24
5.5.2 Determinación del potencial antinociceptivo	24
5.5.2.1 Determinación del potencial analgésico de los extractos de hoja mediante el método de estiramiento abdominal	24
5.5.2.2 Determinación del potencial analgésico de los extractos mediante el ensayo de placa caliente en ratones.	25
5.5.3 Evaluación de Toxicidad	25
5.5.3.1 Bioensayo con <i>Artemia salina</i>	25
5.5.3.2 Determinación de la toxicidad aguda en ratones ICR por el método de Lorke (1983)	26
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
6.1 Revisión de información etnobotánica y de ejemplares de herbario	27
6.2 Caracterización anatómica y estructural de <i>Datura lanosa</i>	30
6.2.1 Descripción anatómica e histológica de las hojas de <i>Datura stramonium</i> .	31
6.2.2 Descripción anatómica e histológica de las hojas de <i>D. lanosa</i>	36
6.3 Establecimiento de perfiles cromatográficos	41
6.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)	41
6.3.2 Establecimiento de perfiles cromatográficos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas en su modalidad Impacto Electrónico (CG/EM-IE) e Ionización Química (CG/EM-IQ)	42
6.3.3 Establecimiento de perfiles cromatográficos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) del crudo alcaloideo de las cuatro partes vegetales de <i>Datura lanosa</i>	47
6.4 Pruebas biológicas	54
6.4.1 Efecto antimicrobiano	54
6.4.2 Determinación del potencial antinociceptivo	54
6.4.2.1 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos de hoja mediante el método de estiramiento abdominal.	55
6.4.2.2 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos mediante los ensayos de placa caliente en ratones	56
6.4.3 Evaluación de toxicidad	58
6.4.3.1 Bioensayo con <i>Artemia salina</i>	58
6.4.3.2 Determinación de toxicidad aguda según Lorke	58
7 CONCLUSIONES	61
8 BIBLIOGRAFIA	62
9 APENDICES	67
10 INDICE DE ABREVIATURAS	72

I RESUMEN

En el presente trabajo se describe el proyecto que se realizó como parte de los estudios encaminados a la integración de monografías tipo OMS de especies vegetales medicinales utilizadas en México. Los estudios incluyeron un análisis de la información etnobotánica; establecimiento de pruebas de identidad botánica y química; así como de las pruebas de eficacia y seguridad preliminares.

Como resultado del análisis de la información etnobotánica se integró una base de datos importante sobre el uso a través del tiempo de la especie *Datura lanosa*, que antes de 1986 era identificada como las especies *D. inoxia*, *D. meteloides*, *D. wrightii* y *D. discolor*. Los datos obtenidos en el estudio indicaron que la parte de la planta que más se utiliza son las hojas, seguido de las raíces, los tallos, las semillas y por último las flores. Los frutos como tales no se utilizan. En cuanto al modo de preparación, las hojas se emplean bajo la forma de emplasto, infusión, té, cataplasma, cigarros para fumar, asadas, molidas, maceradas y en loción. Por último, las afecciones para las cuáles se recomienda la planta son dolores reumáticos, musculares, hinchazón por golpes y desinflamatorio, asma, heridas y llagas, hemorroides, granos y afecciones de la piel, uso ritual y/o ceremonial, tos y garganta, problemas digestivos, dolor de oído, parto y quemaduras.

En lo que respecta a las pruebas de identidad botánica, se describieron por primera vez las características anatómicas e histológicas de la droga cruda. Las características más relevantes de las hojas son la gran densidad de tricomas no glandulares uniseriados pluricelulares, la presencia de tricomas glandulares, espacios intercelulares en parénquima esponjoso y la presencia de estomas mesógenos anisocíticos.

En cuanto a las pruebas de identidad química, la droga cruda (hoja) de *D. lanosa*, contiene como alcaloide tropánico mayoritario a la escopolamina y en segundo lugar la atropina. De manera general, los alcaloides identificados para *D. lanosa* son **atropina**, **escopolamina**, **apoescopolamina** y se reportan por primera vez para la especie, **noratropina** **3-tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano**, **3-(2-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano** y **cuscohigrina**. Con lo anterior se logró el establecimiento de una técnica analítica de utilidad para el futuro desarrollo y validación de un método que permita cuantificar a los componentes mayoritarios presentes en la

especie *D. lanosa*. De manera adicional se establecieron los perfiles cromatográficos mediante las técnicas de Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases.

En cuanto a las pruebas de eficacia se comprobó el efecto antinociceptivo del extracto total de la droga cruda de *D. lanosa* lo que respalda su uso médico popular para el tratamiento de dolores musculares, reumáticos y como desinflamatorio. Así mismo, la presencia en la hoja de atropina y escopolamina explica el uso de la especie para el tratamiento del asma, y trastornos digestivos.

Como pruebas de seguridad se estableció la toxicidad aguda en ratones ICR por el método de Lorke, encontrándose que el valor de la DL_{50} del extracto total de la droga cruda se ubica por arriba de 5g/kg. Por lo tanto, de acuerdo a los criterios de Lorke, las hojas de *D. lanosa* se consideran no tóxicas.

En resumen se logró el establecimiento de parámetros de identidad botánica y química, eficacia, y seguridad de la especie *D. lanosa*, los cuales servirán como base y antecedente para la elaboración de su monografía tipo OMS.

1 INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales tienen un papel clave en el mantenimiento de la salud de un gran sector de la población mundial. Se estima a nivel global se utilizan más de 10,000 especies vegetales con fines medicinales. La mayor parte de estas especies se utilizan en sistemas médicos alternativos, principalmente en los países en vías de desarrollo (Cañigüeral, 2002). Por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) continuamente ha propuesto a los gobiernos de esos países que realicen programas centrados en la identificación, preparación, cultivo y conservación de las plantas medicinales más utilizadas en sus sistemas prácticas médicas alternativas. Así, en 1978 en la declaración de Alma-Ata, esta organización recomendó que aquellos medicamentos tradicionales de mayor uso fueran incorporados en los sistemas de salud pública. Posteriormente, esa misma organización⁵⁰

elaboró un documento original con una serie de lineamientos para la determinación de la eficacia, inocuidad y control de calidad de plantas medicinales, en particular de los procedimientos apropiados para establecer la pureza, composición e identidad de las drogas vegetales (OMS, 2000)

En 1999 la OMS editó 28 monografías de plantas medicinales selectas elaboradas por un centenar de expertos procedentes de 40 países. Posteriormente, en los años 2001 y 2008 se publicaron dos volúmenes adicionales con 30 monografías, estructuradas bajo el mismo formato que las primeras 28. Estos trabajos han constituido la base para la elaboración de monografías similares y para las de tipo farmacopeico en distintos países del mundo.

Debido al amplio uso y comercialización de medicamentos herbolarios en México, en el mes de febrero de 1998, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el Reglamento de Insumos para la Salud. Dicho Reglamento considera de manera explícita en sus artículos 66-71, 88-98 y 129-130 las condiciones que para su registro, autorización y venta deben cumplir los medicamentos y remedios herbolarios.

De manera adicional, en el año 2001, la Secretaría de Salud a través de su Comisión Permanente de la Farmacopea, publicó la primera edición de la "Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos", como una respuesta ante la creciente necesidad de referentes a estos recursos y como una repercusión de la propuesta de la OMS. Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria del país, las monografías de especies autóctonas o introducidas, pero de uso médico tradicional en

nuestro país, resultaron muy limitadas en cantidad y calidad, por el simple hecho de que no se disponía de la información suficiente para integrarlas. De ahí que sea necesario investigar de manera exhaustiva e interdisciplinaria las plantas de mayor uso en nuestro país, con la finalidad de integrar en primera instancia las monografías tipo OMS, de utilidad para el sector salud, industrial y público en general. Además estas monografías pueden contribuir a normar el creciente comercio de drogas vegetales y propiciar el uso racional de las plantas de mayor uso medicinal en el mundo (Bauer 1999; Gaedcke, 2003).

Con base en estas premisas, el presente trabajo pretende generar datos sobre la información etnobotánica, algunos parámetros de calidad así como de eficacia y seguridad preclínicas de la especie *Datura lanosa* A.S. Barclay ex Bye (Solanaceae) con la meta de integrar una monografía tipo OMS, y con ello contribuir al uso medicinal racional de esta especie. Por otro lado, muchos de los datos que se generen servirán para posteriores estudios sistemáticos y taxonómicos del género *Datura*, históricamente vinculado a la cultura mexicana.

2 ANTECEDENTES

2.1 Género *Datura*. Descripción y distribución.

La familia Solanaceae cuenta con 2,900 especies distribuidas en 76 géneros (Zomlefer, 1994). Es cosmopolita y tiene una amplia distribución en todo el mundo; sin embargo, la mayoría de las especies se concentra en Centro y Sudamérica (Singh, 2004) donde muchas de ellas se utilizan con fines rituales, alimenticios y medicinales, destacando en importancia las representantes de los géneros *Datura* y *Solanum* (Roddick, 1991).

El género *Datura* consta de aproximadamente 14 especies que usualmente crecen en áreas perturbadas. Su centro de distribución y dispersión incluye a México y el sureste de Estados Unidos.

De las 14 especies de *Datura*, 11 son nativas de México (Jiao *et al.*, 2002). Se cree que *D. metel* es de origen asiático, mientras que *D. leichhardtii* tiene dos variedades, una en México y Guatemala; la otra en Australia. El resto de las especies son americanas. Su centro de distribución y dispersión incluye México y el suroeste de Estados Unidos. En Sudamérica generalmente encontramos *D. ferox*, *D. inoxia* y *D. metel* (Symon & Haegi, 1991).

Jiao y colaboradores (2002) agruparon las 11 especies mexicanas de *Datura* en cuatro secciones: *Datura*, *Dutra I*, *Dutra II* y *Ceratocaulis* (Tabla 1). Esta división se realizó con base en un análisis de la variación de alozimas en cinco poblaciones diferentes.

Tabla 1. Secciones de *Datura*.

Datura	<i>D. stramonium</i> , <i>D. quercifolia</i> y <i>D. ferox</i>
Dutra I	<i>D. metel</i> , <i>D. inoxia</i> , <i>D. wrightii</i> y <i>D. lanosa</i>
Dutra II:	<i>D. discolor</i> , <i>D. pruinosa</i> , <i>D. reburra</i> y <i>D. kymatocarpa</i>
Ceratocaulis	<i>D. ceratocaula</i>

Desde el punto de vista anatómico las hojas de *Datura* son las que han recibido una mayor atención, en particular la caracterización y descripción de sus tricomas los cuáles han sido de gran utilidad para el establecimiento de divisiones sistemáticas. *D. stramonium*, *D. tatula*, *D. inoxia*, *D. metel*, y *D. fastuosa* presentan dos tipos de

tricomas; el primer tipo es uniseriado, en forma de dedo, y pluricelular con tres a seis células; su base puede ser unicelular o pluricelular (Seithe, 1991). El segundo tipo es glandular multicelular; estos tricomas son muy cortos, normalmente con una célula formando un tallo y una cabeza pluricelular. La cabeza puede consistir de cuatro células en el mismo plano con una pequeña célula debajo de ellas (glándulas cuadradas); alternativamente puede estar compuesta de dos o tres niveles de células; cada uno con dos o más células (glándulas en pisos). Además los tricomas glandulares contienen cristales de diferentes tipos (Timmerman, 1927). Los estomas descritos para *D. arborea*, *D. inermis* y *D. stramonium* son mesogenos anisocíticos y rara vez mesoperígenos anisocíticos (Bessis & Guyot, 1991).

2.2 Generalidades de los alcaloides tropánicos del género *Datura*

En la naturaleza los alcaloides tropánicos se encuentran distribuidos en diversas familias botánicas, principalmente en las Solanáceae y Eritroxiláceae y con menor frecuencia en las Proteáceae, Euforbiáceae, Rizoforáceae, Convolvuláceae, Crucíferae y Moráceae. La presencia dispersa de estos metabolitos en diferentes grupos de plantas superiores, supone la idea de que pudieran ser un vínculo entre diferentes familias botánicas.

En la familia Solanaceae los alcaloides tropánicos son especialmente abundantes en especies de los géneros *Datura*, *Atropa*, *Scopolia*, *Mandrágora*, *Brugmansia* y *Hyoscyamus* (Griffin y Lin, 2000). En general los alcaloides se biosintetizan en las raíces y semillas de donde son translocados a prácticamente todos los órganos de la planta.

Los alcaloides tropánicos de *Datura* son ésteres de ácidos orgánicos como el trópico, mandélico, benzoico y cinámico y alcoholes como la tropina, seudotropina, escopina, y calisteginas, principalmente. Los más relevantes por sus aplicaciones terapéuticas son la escopolamina, la apoatropina, la *l*-hiosciamina y la atropina (Figura 1).

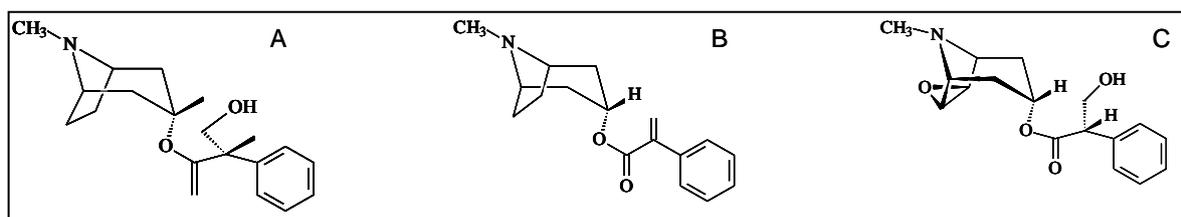


Figura 1. estructuras de los alcaloides atropina (A), apoatropina (B) y escopolamina (C).

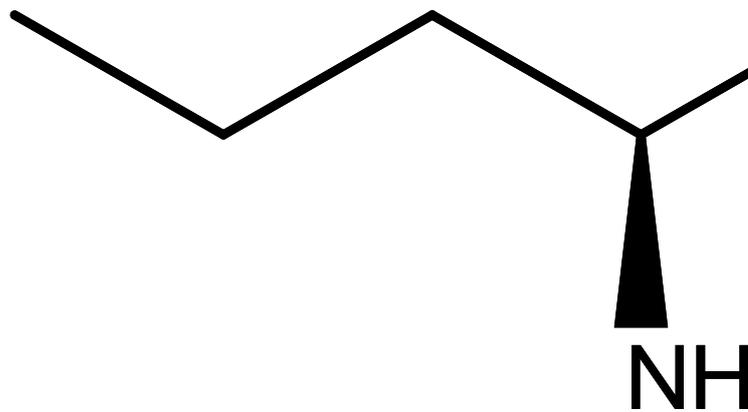
Biosintéticamente el núcleo tropano (8-azabicyclo [3.2.1] octano) se origina a partir del aminoácido *l*-ornitina y de la malonil CoA (Figura 2). Los ácidos que más comúnmente. El alcohol tropanico se generan a partir de la fenilalanina y la tirosina principalmente. A manera de ejemplo en la figura 2 se ilustra la biosíntesis de la hiosciamina (Dewick 2009).

La atropina es la mezcla racémica (*d, l*) del enantiómero (*l*)-hiosciamina el cual se encuentra de manera natural en las plantas. La atropina se forma durante el proceso de extracción por racemización de la (*l*)-hiosciamina (Dräger, 2006). La escopolamina se encontró en 1982 en *Scopolia atropoides*. Posteriormente se identificó como un compuesto idéntico a la *l*-hioscina, que fue separada de la *l*-hiosciamina en extractos de *Hyoscyamus muticus* L. La actividad biológica de los isómeros *d* es de 20 a 30 veces menor que la de los isómeros *l*. Las especies de *Datura* más utilizadas para la obtención de estos alcaloides son *D. stramonium* y *D. metel*; aunque también se obtienen de *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *H. muticus* y varias especies de *Duboisia* .

Los alcaloides tropanicos de mayor uso terapéutico son antagonistas competitivos de la acetilcolina por los receptores muscarínicos del sistema nervioso parasimpático, por lo tanto son productos anticolinérgicos. Este modo de acción es el responsable de los efectos terapéuticos útiles de los compuestos, incluyendo su actividad antiespasmódica en el tracto gastrointestinal, la regulación de secreción salival durante las intervenciones quirúrgicas y el efecto midriático a nivel ocular (De Simone, 2008).

La escopolamina tiene además un efecto depresor sobre sistema nervioso central (SNC) y por lo tanto una actividad sedante para contrarrestar los síntomas de la cinetosis o mal del viajero. De hecho, el efecto sedante provocado por el consumo de diferentes drogas crudas obtenidas a partir de especies pertenecientes a los géneros *Mandragora*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa* y *Datura* (Griffin y Lin, 2000), se relaciona directamente con el nombre de la familia (**Solanaceae**) que proviene del latín *solamen* que significa “**tranquilidad**”. La atropina y la escopolamina, así como algunos de sus derivados semisintéticos también se utilizan clínicamente para el control de algunos síntomas de la enfermedad de Parkinson, como broncodilatadores y sedantes preanestésicos (De Simone, 2008).

L-Glu



L-Orn

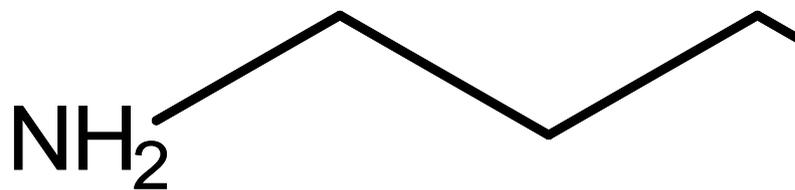


Figura 2.- Biosíntesis de alcaloides tropanicos. (Tomado y modificado de Dewick, 2009).

Las investigaciones recientes en torno a productos derivados de la escopolamina permitieron el descubrimiento de un nuevo compuesto, el tiotropiumbromido (Spiriva ® Boehringer Ingelheim). El producto es un derivado sintético que posee un tiempo de vida media muy prolongado (varios días) y está específicamente diseñado para tratar la enfermedad crónica obstructiva pulmonar.

Otro grupo de alcaloides tropánicos de reciente interés y potencial aplicación en la terapéutica son las calisteginas, que actúan como inhibidores de las α -glucosidasas y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Dewick, 2009).

2.3 *Datura* en México

En nuestro país el género *Datura* es de gran importancia por razones evolutivas, ecológicas y culturales. La importancia evolutiva radica en el hecho de que 11 de las 14 especies reconocidas a nivel mundial son nativas de México y que por lo tanto nuestro país pudiera ser el centro de origen y dispersión del género (Jiao *et al.*, 2002). Además, desde el punto de vista ecológico las especies crecen en ambientes perturbados, característica de las especies pioneras.

En lo que se refiere a la importancia cultural, las plantas pertenecientes a este género se reconocen indistintamente con el nombre de **toloache**¹ y de acuerdo a fuentes históricas de gran importancia (Figura 3) su uso medicinal y ritual se remonta a la época prehispánica. Así, en el Libro X de los vicios y virtudes, lámina 35v Capítulo Sexto, página 39 del “Códice Florentino” (1580) se menciona que el toloache era una planta de sobra conocida que se consumía como droga, a veces complementada por hongos alucinantes. Se menciona también en el libro undécimo de las yervas (*sic*) medicinales como Toloa (*fo* 143, lámina 31) con los mismos usos. En el capítulo séptimo del “Libellus Medicinalibus Indorum Herbis” o Libro de las hierbas medicinales de los indios, también llamado “Códice De la Cruz-Badiano”, se señala el uso de una *Datura* contra el dolor de costado para lo cual las hierbas *tolohuaxihuitl* (toloache) y *nexehuac* se muelen en agua y se aplican. También, en el Capítulo Segundo aparece una ilustración de una hierba conocida como *tlazolpahitli* que bien molida y mezclada con *cochizxihuitl* y hiel de golondrina, se untaba en la frente para el tratamiento de pérdida o interrupción del sueño. El tratamiento se complementaba frotando todo el cuerpo con el

¹ Según el Códice De la Cruz-Badiano, *tolohua* deriva de *tolohuaxihuitl* que significa hierba inclinada. También se relaciona con el verbo *t'olo'a* que significa bajar la cabeza. En la nomenclatura náhuatl *toloztzin* se traduce como planta venenosa.

jugo exprimido de las hojas de la hierbecita (sic) llamada *huihuitzyo cochizxihuitl*. Es posible que *Tlazolpahtli* que nace junto a los hormigueros, también sea una *Datura*.

En “Dendrología Natural y Botanelogía Americana o Tratado de los Árboles y Hierbas de la América” (1785) escrito por Fray Juan Caballero; en la ilustración 2B se hace referencia al Toloache y es identificada como la especie *D. stramonium*. En los “Anales de Historia Natural” (1799-1804) Número 15; Tomo quinto, Don Joseph Mariano Mociño da un discurso sobre los recursos que se utilizan en la Nueva España para curar diversas afecciones. Se menciona entre los narcóticos al Toloache (*Datura stramonium*). En este discurso se enfatiza la importancia de contar con los recursos vegetales medicinales en el territorio mexicano sin la necesidad de esperar que sean abastecidos desde España. El Herbario Histórico de Sessé y Mociño contiene ejemplares recolectados por los botánicos Martín de Sessé, José Mariano Mociño, Juan Castillo y Jaime Senseve durante la Real Expedición Botánica a Nueva España llevada a cabo entre 1787 y 1803. Esta expedición fue creada por la corona española para inventariar los recursos naturales de la Nueva España. Esta colección pertenece al herbario del Real Jardín Botánico y forma parte del Patrimonio Histórico Español. La base de datos cuenta con 14515 registros correspondientes a 1879 géneros y 7635 especies pertenecientes a México, Cuba, Perú y Estados Unidos.



Figura 3. Códice De la Cruz-Badiano.

En la época actual las diferentes especies de *Datura* continúan siendo objeto de estudios antropológicos y etnobotánicos. De tal forma que autores como Helen O’Gorman (1962) en su libro “Plantas y Flores de México”, página 54, menciona varias especies de *Datura* para las que reconoce los nombres comunes de floripondio, floripundio, campanilla blanca, trompeta, trómbita, y trompeta de ángel. Sobre el uso medicinal menciona que “las hojas cocinadas se aplican en cataplasma sobre las llagas para calmar el dolor y acelerar la supuración; en tiempos remotos se aplicó alrededor de los huesos rotos.

Maximino Martínez (1989) en su obra “Las plantas medicinales de México” señala que *D. stramonium* sirve para atenuar los sufrimientos del parto, con fines religiosos, contra el asma, y para atenuar dolores reumáticos.

Schultes y Hofmann (1982) en “Plantas de los Dioses” y Bye *et al.* (1976) señalan que *D. inoxia tikuwari* es quizá la especie más importante y de mayor uso en México y sudoeste de Norteamérica. Y que los tarahumara adicionan las raíces, semillas y hojas de esta planta al tesgüino, bebida fermentada preparada a base de maíz, utilizado con fines ceremoniales para promover o provocar visiones. La bebida la consumen también los hombres médicos tarahumaras para ayudar a diagnosticar las enfermedades.

Por su parte Aguilar y colaboradores (1998) en el “Herbario de Plantas Medicinales del IMSS”² citan varias especies del género *Datura*, entre ellas *D. inoxia* Mill. (*D. meteloides*), *D. metel* y *D. stramonium*.

Actualmente en varios estados del país, las especies de *Datura* se conocen con diversos nombres como tapate, nacazul, tlapa, hierba hedionda, chamico, hierba del diablo (Martínez 1959) florifundio, kieri (Argueta *et al.*, 1994), estramonio, higuera del infierno, toloache, trompetilla, toloa, toloatzin (Linares *et al.*, 1988) y algunos de estos nombres se basan en los efectos que tienen sobre sistema nervioso central.

Cabe resaltar que la especie de más amplia distribución y mayor uso en México, es *Datura stramonium*, la cual se expende en mercados como el de Sonora en el distrito Federal. Por tal motivo los ensayos biológicos, así como la identidad química y botánica

² Páginas 192, 193. Se reporta su utilización contra fiebre, paludismo, abscesos, tumores, verrugas, calentura, empacho, hinchazón por golpe, dolor reumático, males fríos, hemorroides, asma, dolor de muelas, desinflamatorio y alucinógeno.

de la especie *D. lanosa* se compararon con los resultados obtenidos para la especie *D. stramonium*.

Datura lanosa

La especie *Datura lanosa* A.S Barclay ex Bay es hermafrodita, perene, crece como una hierba. El **tallo** mide 1.5m o más de altura; es caulescente, con ramificación dicotómica; ampliamente propagada, con las ramas jóvenes pubescentes. Toda la planta luce pardo grisácea. Sus **hojas** son deciduas, simples, con disposición alterna, forma ovada, tienen margen entero o irregularmente sinuado-dentado. Miden 21.5cm de largo y 18cm de ancho. De la mitad a dos terceras partes es tan larga como ancha. El ápice es caulinar con la base igual o subigual; el peciolo mide aproximadamente 10cm de longitud. Tanto en el haz como en el envés presenta numerosos tricomas uniseriados no glandulares que dan una apariencia pardo grisácea a toda la lámina foliar, así como tricomas glandulares (en menor cantidad que los primeros). Las **flores** son perfectas, pentámeras, con cáliz persistente, circumsesil por encima de la base, formando una estructura en forma de copa. Los sépalos forman una estructura tubular cilíndrica, de 8-15cm de largo, ápice pentadentado, con el exterior lanuloso y el interior glabro; dentado acuminado, de 1.5-3.0cm de largo, 0.7-1.2cm de ancho en la base. Corola blanca, en forma de embudo, plegada, dientes de la corola acuminados, 0.6-2.0cm de largo y 0.3-0.5cm de ancho en la base, cada uno con tres nervios proximales conspicuos, margen de la corola entre los dientes redondeados o con lóbulos interacuminados dan a la corola la apariencia de tener diez ángulos; el exterior de la corola es glabro a ligeramente puberulento a lo largo de las venas, interior glabro bajo el punto de agnación estaminal, llegando a ser poco pubescente por debajo. Tiene 5 estambres libres, epipétalos, extendidos de 12-17cm desde la base de la corola y adnados al tubo a la mitad de su longitud. Las anteras miden de 1.2-1.6cm de largo con tricomas filamentosos a lo largo de las líneas de dehiscencia. Estigma bilobulado. Estilo de 11.7-17.7cm de largo. Ovario súpero. El pedúnculo es lanado, erecto durante la antesis, más tarde se vuelve algo elongado y curvo. Nace en la axila de las ramas. Su **fruto** es una cápsula subglobosa de 4-6 cm de largo con dehiscencia irregular. El pericarpo está cubierto con espinas afiladas de 5mm de long aprox. La superficie tanto del fruto como de las espinas es de vellosa a lanada. Pedicelo de 2.0-3.5cm de longitud, curvo. Las **semillas** son reniformes, carunculadas, miden aproximadamente 4.0-5.2mm de largo y 3-4mm de

ancho con tres crestas las cuáles forman un tipo de cuerda en la terminación convexa de la semilla, con las caras laterales lisas.

Crece en diferentes hábitats, en campos abiertos y perturbados como malezas; en campos cultivados, a las orillas de las carreteras, en pilas de grava y basureros. En condiciones naturales prefiere los cauces de grava de los ríos y arroyos. Nativa del occidente de la Sierra Madre occidental y de la planicie costera contigua en el noroeste de México (Figura 4).

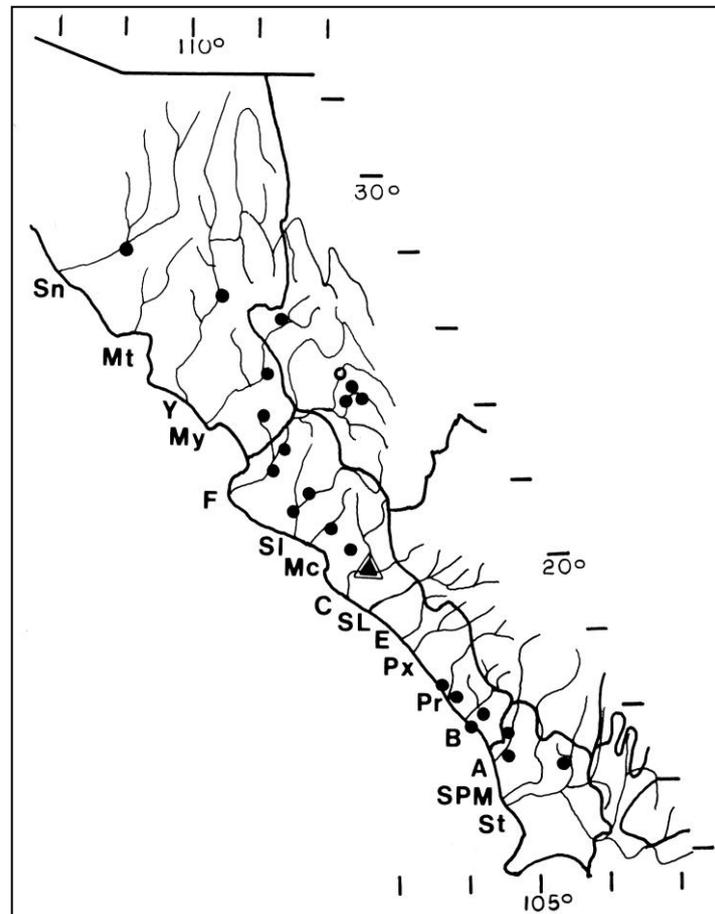


Figura 4. Mapa de distribución de *D. lanosa* al norte de México (Bye, *et al.*, 1991).

Se distingue de sus especies parientes *D. inoxia* y *D. wrightii* por su pubescencia lanosa. La especie *D. lanosa* fue descrita por vez primera por Bye en 1986. Es una hierba perenne que crece en hábitats perturbados (Figura 5).



Figura 5. *Datura lanosa* (Bye, 2008).

La información etnobotánica (Bye *et al.*, 1991) reciente menciona que las preparaciones a base de las raíces, hojas y semillas se aplican localmente para curar afecciones de la piel como granos y úlceras. También, se utiliza para aliviar dolor en el cuerpo y el asma.

Desde el punto de vista químico, los mismos autores aislaron y caracterizaron los alcaloides tropánicos atropina, apoatropina (Figura 2), escopolamina, meteloidina, apoescopolamina, y tropina. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios conducentes a establecer la eficacia preclínica, las pruebas de calidad de la droga cruda y mucho menos pruebas toxicológicas sencillas de la droga cruda de esta especie.

3 OBJETIVOS

A pesar de la amplia distribución del género *Datura* en nuestro país, no existe un documento farmacopeico oficial que contribuya a su uso racional. La especie de estudio en el presente proyecto es *D. lanosa*, la cual se distribuye en el norte del país y se utiliza para aliviar diversas afecciones, además de la importancia ritual que se le atribuye entre los habitantes de las localidades donde crece, sin embargo tampoco se cuenta con la información científica necesaria para generar su monografía tipo OMS. Por lo tanto, los objetivos del proyecto son los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Generar la información científica necesaria para la elaboración de una monografía tipo OMS de *Datura lanosa* A.S. Barclay ex Bye, (Solanaceae) utilizada en la medicina tradicional mexicana por sus supuestas propiedades antisépticas y analgésicas. El estudio de *D. lanosa* desde una perspectiva multidisciplinaria permitirá el desarrollo de sus parámetros de calidad, eficacia y seguridad que contenidos en una monografía de tipo OMS garantizan el uso racional de la droga cruda.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Analizar la información etnobotánica de la especie *D. lanosa* y especies relacionadas con las que comparte área de distribución al norte del país mediante la consulta de fuentes de información primaria y secundaria.

-Evaluar las actividades farmacológicas (antibacteriana y analgésica) relacionadas con los principales usos tradicionales de la droga seleccionada.

-Establecer los parámetros de identidad químicos y anatómicos de utilidad para el control de calidad de la droga cruda de *D. lanosa* y compararlos con los obtenidos para *D. stramonium*.

-Determinar de manera preliminar la toxicidad aguda de la droga cruda de *D. lanosa* y compararla con la de *D. stramonium*.

4 HIPÓTESIS

El uso médico popular de las hojas de *D. lanosa* para contrarrestar afecciones de la piel y dolores musculares; sugiere que la especie posee propiedades antisépticas y

analgésicas. Por lo tanto es muy probable que los preparados medicinales a base de la planta contengan principios activos que le confieran dichas propiedades curativas.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Recolección del material vegetal

Para el estudio fitoquímico y las pruebas biológicas de toxicidad, efecto analgésico y actividad antimicrobiana se utilizó el material vegetal proporcionado por el Dr. Robert Arthur Bye Boettler, investigador del Instituto de Biología. El material fue recolectado en el estado de Chihuahua en Mayo de 2007 y una muestra de referencia se depositó en el herbario MEXU con el número de registro Bye 35029. Este material fue identificado y determinado como *D. lanosa* por el mismo investigador.

Para la caracterización anatómica y estructural de la especie, se realizó una salida de campo al estado de Chihuahua durante los días 15 al 22 de octubre de 2008. Los municipios donde se recolectó el material fueron Urique y Batopilas (Figura 6).

Se recolectaron muestras de material fresco. Se realizaron cortes de raíz, meristemo del tallo, tallo, hoja, peciolo y fruto. Una parte de este material se fijó en aldehído glutárico y la otra en una solución FAA (formol, ácido acético y alcohol etílico). En estos mismos fijadores se colocaron muestras completas del material. Posteriormente todo el material fijado se procesaría posteriormente en el Laboratorio de Anatomía y Fisiología de Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM.

El material vegetal de *Datura stramonium* se adquirió en el Mercado de la Bola, en el D.F. en el puesto de Don Antonio en febrero de 2009. Una muestra de este material fue identificado por la pasante de Biología Carolina Fuentes Peryañez en el herbario FEUM de la Facultad de Ciencias UNAM.

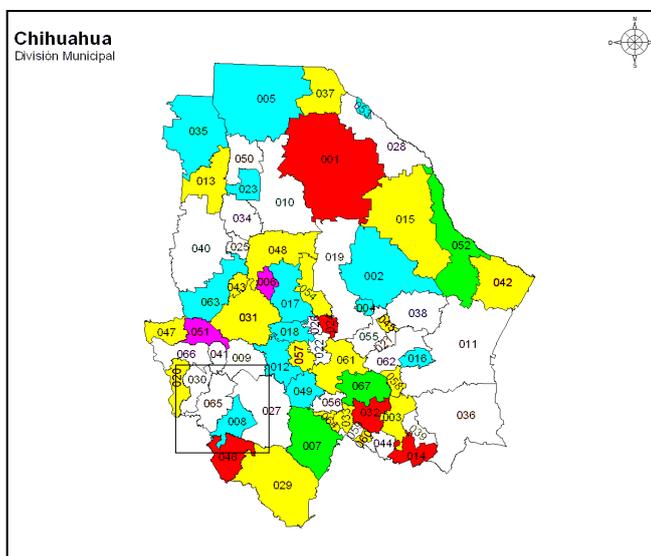


Figura 6. Mapa del estado de Chihuahua. En el recuadro aparecen los municipios de Batopilas (008) y Urique (065) donde se recolectaron las muestras de *D. lanosa* utilizadas en la descripción anatómica e histológica.

5.2 Revisión de información Etnobotánica

5.2.1 Fuentes bibliográficas y comunicaciones personales

Se realizó un estudio retrospectivo y una revisión exhaustiva de la información bibliográfica etnobotánica de las cuatro especies del género *Datura* que comparten área de distribución al norte de México (*D. inoxia*, *D. wrightii*, *D. discolor* y *D. lanosa*) así como de *D. stramonium*. Se consultaron fuentes de información primarias y fuentes de información secundarias.

5.2.2 Revisión de ejemplares de herbario

Se realizó también un ejercicio de revisión de ejemplares de Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología de la UNAM.

5.3 Caracterización anatómica y estructural de *Datura lanosa*

La metodología empleada para la establecer la identidad y anatómica de la especie *D. lanosa* fue la misma que se aplicó para las muestras de la especie *D. stramonium*, adquirida en el mercado de La Bola en el Distrito Federal.

5.3.1 Deshidratación del material vegetal

Las muestras fijadas en FAA se enjuagaron tres veces con agua corriente (30 minutos cada enjuague). Posteriormente se deshidrataron mediante una serie de cambios de alcohol etílico durante dos horas para cada una de las diferentes concentraciones utilizadas (30, 50, 70, 85, 96 y 100%). Posteriormente el material se incluyó en una

mezcla de alcohol absoluto-xilol (1:1) por espacio de 30 minutos. Finalmente se mantuvo en xilol absoluto por 20 minutos (López Curto *et al.*, 2005).

5.3.2 Análisis microscópico

Las imágenes microscópicas se obtuvieron en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias UNAM utilizando un microscopio confocal Olympus Provis. También se tomaron fotografías con un microscopio estereoscópico Carl Zeiss.

Por otro lado se prepararon muestras de hojas previamente deshidratadas y se realizaron cortes de 1 cm aproximadamente. Las muestras así preparadas se expusieron a un baño de oro y se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5310LV) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias.

5.3.3 Inclusión del material vegetal

Para realizar los cortes histológicos, el material vegetal previamente deshidratado se sometió a un proceso de inclusión; que consistió en colocar las hojas en una mezcla de xilol-parafina (Paraplast®) en diferentes proporciones (2:1, 1:1 y 1:2) por espacio de 30 minutos en cada caso. Por último el material se incluyó en parafina pura por 24 horas y se mantuvo en una estufa a 65°C para permitir que la parafina penetrara lo mejor posible el tejido vegetal.

5.3.4 Obtención de cortes anatómicos

El material vegetal ya incluido con parafina absoluta se montó en bloques de 1cm x 1cm aproximadamente, sobre madera. A partir de dichos bloques se formó una pirámide alrededor de la muestra. Para proceder a realizar los cortes, los bloques se colocaron en refrigeración durante 10 minutos, antes de cortar. Para el corte se utilizó un microtomo de rotación *American Optical* modelo 820 con el cual se estableció el grosor del corte en 8 µm de espesor. Se utilizó un baño de flotación con agua a 40°C con gelatina bovina que sirvió como adhesivo para los cortes. Estos se extendieron en la superficie del agua y se colocaron sobre un portaobjetos (López Curto *et al.*, 2005).

5.3.5 Técnicas de tinción

Las técnicas de tinción utilizadas fueron las siguientes:

- ∅ Cuádruple de Johansen

- ∅ Schiff
- ∅ Azul negro de naftol-APS
- ∅ Doble
- ∅ Lugol (identificación de almidón)

Las preparaciones obtenidas se analizaron mediante las técnicas de microscopía de campo claro con la finalidad de identificar y describir los caracteres anatómicos y estructurales tanto de *D. lanosa* como de *D. stramonium*. Después de 24 horas de tratamiento con safranina, la muestra se lava con agua corriente y se maneja por un periodo de 10-15 minutos con una solución acuosa de metilvioleta al 1% y se lava nuevamente con agua corriente. Posteriormente se aplica por goteo una mezcla de partes iguales de alcohol al 96%/metilcelosolve/alcohol terbutílico. Enseguida se aplica *Fast green* por cinco minutos y se enjuaga por goteo con una mezcla de partes iguales de alcohol al 96%/alcohol terbutílico/0.5% de ácido acético glacial. A continuación se aplica Orange G por espacio de tres minutos y se enjuaga por goteo con una mezcla de partes iguales de aceite de clavo/metilcelosolve/alcohol al 96%. Finalmente se enjuaga por goteo mezcla partes iguales de aceite de clavo/alcohol absoluto/xilol y se montan las laminillas con resina sintética o bálsamo de Canadá.

5.4 Estudio Fitoquímico de *Datura lanosa*

5.4.1 Obtención de los extractos totales a partir de las diferentes partes vegetales de *D. lanosa*

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, evitando su exposición a la luz solar. Se manejaron las partes vegetales por separado (raíces, tallos, hojas y frutos sin semilla). El proceso de fragmentación se realizó en un molino de cuchillas tipo Wiley, usando una rejilla de 2 mm.

Para la obtención de los extractos íntegros, se ensayaron dos mezclas diferentes de disolventes [CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (15:5:1)] utilizando un proceso de maceración (Figura 7). Los extractos orgánicos resultantes se filtraron y concentraron a presión reducida.

Material vegetal (1g) Raíz, Tallo, Hoja, Fruto

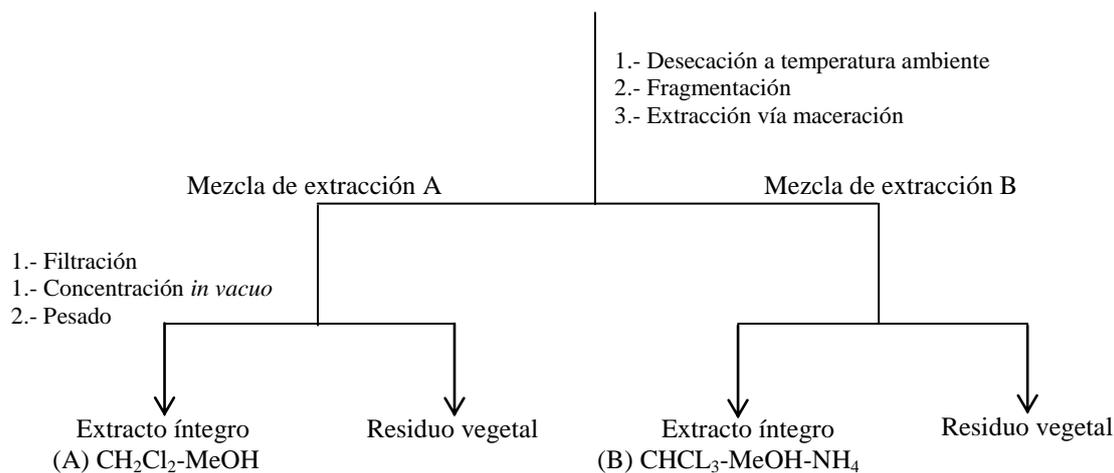


Figura 7. Diagrama de obtención de extractos totales con dos mezclas de extracción vía maceración.

Con base en los rendimientos totales de los extractos (Tabla 2) y en los resultados observados en las placas cromatográficas, se decidió trabajar con la mezcla (B) $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (15:5:1).

Tabla 2. Rendimiento de extractos totales de cada parte vegetal obtenidos mediante dos mezclas de extracción.

Mezclas de extracción	Parte vegetal	Peso (g) Extracto total	Rendimiento (%)
(A) $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (1:1)	Hoja	0.14	14
	Fruto	0.14	14
	Tallo	0.06	6
	Raíz	0.13	13
(B) $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (15:5:1)	Hoja	2.29	22.9
	Fruto	0.1	10
	Tallo	0.135	13.5
	Raíz	0.06	6

5.4.2 Fraccionamiento de los extractos íntegros para la obtención del crudo alcaloideo de las distintas partes vegetales.

Con la finalidad de obtener el crudo alcaloideo de cada parte vegetal, cada uno de los cuatro extractos totales obtenidos con la B fueron extraídos exhaustivamente mediante sucesivas particiones ácido-base. Este proceso condujo a la obtención de los crudos alcaloideos de cada muestra. En la figura 8 se resume de forma general, el proceso de obtención de cada crudo alcaloideo.

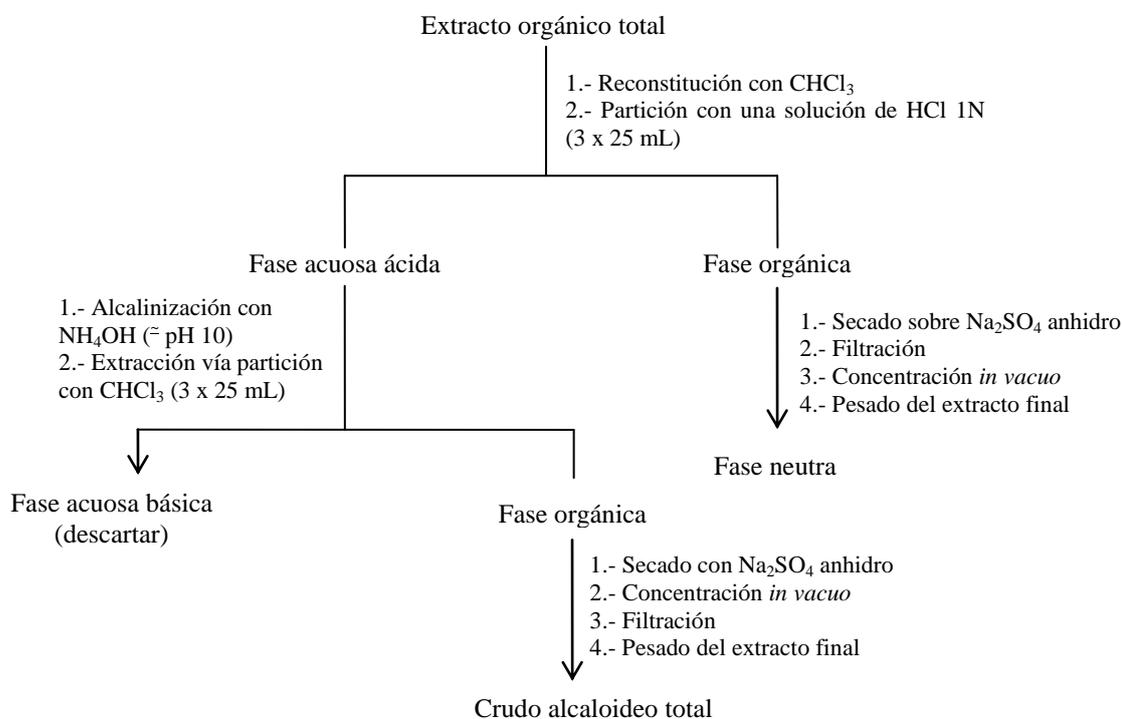


Figura 8. Diagrama de extracción selectiva para la obtención de crudos alcaloideos de las distintas partes vegetales analizadas.

5.4.3 Análisis cromatográficos

5.4.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los análisis por cromatografía en capa fina para se realizaron en placas de aluminio de distintas dimensiones recubiertas con gel de sílice de 0.25 mm de espesor (60 G₂₅₄ Merck), ensayando diferentes sistemas de elución (Tabla 3). Como agentes cromógenos se emplearon el reactivo de Dragendorff (Iodo bismutato de potasio) o sulfato cérico amoniacal. De los diferentes sistemas de elución ensayados se eligió la

mezcla ternaria de CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (9:1:1) según los resultados observados al revelar las placas.

Tabla 3. Mezclas de elución utilizadas para los análisis por CCF para el crudo alcaloideo de cada parte vegetal.

Mezclas de elución
CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (9:1:1)
MeOH- NH_4 (98:2)
CHCl_3 -MeOH (8:10)
CH_2Cl_2 -MeOH (6:4) (9:1) (8:2)
CHCl_3 -Acetona-MeOH- NH_4OH (73:10:15:2)

5.4.3.2 Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas en su modalidad ionización química (CG/EM-IQ) e impacto electrónico (CG/EM-IE)

El análisis por **CG/EM-IE** del crudo alcaloideo de las cuatro partes vegetales (raíz, tallo, hoja y fruto) se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas, un inyector split (1/200) y una columna capilar de sílice fundida DB5 (5% difenil 95 % dimetilpolixiloxano) de 15 m de longitud x 0.32 μm de diámetro interno x 0.1 μm de grosor de película (SUPELCO). Todas las muestras se inyectaron solubilizadas en MeOH Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 270 °C. El programa de temperatura utilizado se resume en la tabla 4.

Tabla 4. Programa de temperatura utilizado para el análisis por **CG/EM-IE**

Temperatura inicial (°C)	100
Tiempo inicial (min)	4
Velocidad de calentamiento	10°C/min hasta 300°C manteniendo esta temperatura durante 5 min.
Volumen de inyección	1 μl

El análisis por **CG/EM-IQ** del crudo alcaloideo obtenido de las hojas y los frutos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas, un inyector splits/splittles y una columna capilar de sílice fundida DB5 (5% difenil 95 % dimetilpolixiloxano) de 25 m de longitud x 0.20 μm de diámetro

interno x 0.33 μm de grosor de película (SUPELCO). Todas las muestras se inyectaron solubilizadas en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min y Metano (CH_4) como gas de ionización. El programa de temperatura se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de temperatura utilizado para el análisis por CG/EM-IQ

Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)	40
Tiempo inicial (min)	1
Velocidad de calentamiento	10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 310 $^{\circ}\text{C}$ manteniendo esta temperatura durante 5 min.
Volumen de inyección	1 μl

5.4.3.3 Análisis por Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

El método analítico seleccionado fue aquel con el que se logró una óptima separación de los compuestos mayoritarios. Para la obtención de los perfiles cromatográficos por CLAE se utilizó un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con una bomba modelo 600 E y un detector de UV/visible (modelo 2487-Dual-Waters). Se utilizó una columna fase reversa Purospher® STAR RP-18 *endcapped* de 250 mm de longitud x 4.6 mm de diametro interno x 5 μm de grosor de película (Merck®). Todas las muestras fueron enriquecidas con los estándares de los compuestos mayoritarios sulfato de atropina (1) e hidrobromuro de escopolamina trihidratada (2) adquiridos por Sigma-Aldrich®.

Para confirmar la identidad de los picos mayoritarios, se inyectó un blanco que consistió en mezcla de dilución (MeOH/ACN/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$) (2.5:1:0.5:2) tanto para los estándares como para los crudos alcaloides.

Para determinar la fase móvil apropiada para el análisis cromatográfico, se ensayaron diferentes mezclas de elusión, incluyendo una solución amortiguadora de fosfatos, una de carbonatos y una de trietilamina/ácido ortofosfórico. Finalmente se decidió trabajar como fase móvil la mezcla ternaria MeOH/ACN/ solución amortiguadora de ácido ortofosfórico (pH 6.5) en proporción 10/10/80.

La longitud de onda (λ) utilizada para la detección de los alcaloides tropánicos fue de 210 nm. El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y

manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Empower versión 2.0 (Waters). Las condiciones de trabajo se describen en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de trabajo por CLAE.

Eluyente	MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5)
Flujo	0.6 ml/min
Volúmen de inyección	0.20µL
Detección	UV 210 nm
Temperatura	Ambiente

5.5 Pruebas biológicas

5.5.1 Determinación del potencial antimicrobiano

En este ensayo se utilizaron las clásicas pruebas de dilución y difusión en agar empleando una batería apropiada de microorganismos, tanto Gram positivos como negativos (Rojas *et al.*, 1992). Se preparó medio de cultivo Müeler Hinton para incubar a los microorganismos. Se utilizaron 500 µl de inóculo por cada 100 ml de medio. A cada caja se adicionaron de 10 a 15 ml de este medio. Las cepas utilizadas fueron: *S. aureus*, *S. typhi*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, y *E. coli*. Se utilizaron discos de papel filtro impregnados con el extracto de prueba o con las sustancias controles. Como controles positivos se utilizaron los antibióticos ampicilina y ciprofloxacina. Como control negativo DMS0. Se evaluó el extracto total de la planta completa excepto semillas. Las dosis de extracto evaluadas fueron: 100µg/µl, 250 µg/µl, 500 µg/µl, 750 µg/µl y 1000 µg/µl.

5.5.2 Determinación del potencial antinociceptivo

5.5.2.1 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos de hoja mediante el método de estiramiento abdominal

Para la prueba de estiramiento abdominal se utilizaron ratones ICR macho de 20-25 g. Los tratamientos se administraron vía oral (p.o). Una vez cumplido el tiempo

de absorción, se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal (i.p) una solución de ácido acético al 0.6 %. Inmediatamente después, los animales se colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron las contracciones acumuladas en un lapso de 5 min durante 30 min. En este caso, la nocicepción se manifestó por estiramientos abdominales (en algunas ocasiones se pueden observar contracciones); por lo tanto, se registró 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 con relación al control (tween al 2% en solución salina vía p.o.). Se utilizó dipirona como control positivo a la dosis de 100 mg/kg.

5.5.2.2 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos mediante el ensayo de placa caliente en ratones

Se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso entre 25 y 30 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de bioterio. Antes de los ensayos, los animales se dividieron en grupos de ocho y se mantuvieron en ayuno por 24 horas con libre acceso al agua (*ad libitum*).

Se evaluó el efecto del extracto total de la hoja así como la fase neutra y crudo alcaloideo. Las dosis ensayadas fueron las siguientes: 31.6 mg/kg, 100 mg/kg y 316 mg/kg. La administración de los extractos y control negativo se realizó por vía oral 30 minutos antes de colocarlos sobre la placa. Como control negativo se empleó una solución salina isotónica (SSI) (p.o.) y como control positivo morfina a la dosis de 1.5 mg/Kg administrada por vía intraperitoneal (i.p.).

Debido a la naturaleza del experimento fue necesario someter a los ratones a proceso de adaptación previo al 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 ratones se introdujeron en un cilindro de plástico transparente colocado sobre una placa caliente a la temperatura de 55.5 ± 0.2 °C. Inmediatamente se determinó el período de latencia al estímulo nociceptivo (en segundos), es decir, el tiempo

transcurrido entre la aplicación del estímulo y la primera respuesta de los animales (lamida, levantamiento de las patas traseras o salto fuera del cilindro). Esta respuesta se midió durante 30 minutos 5 veces.

5.5.3 Evaluación de Toxicidad

5.5.3.1 Bioensayo con *Artemia salina*

Se evaluó la toxicidad del extracto total de la planta completa así como del extracto total de la hoja, fase neutra y crudo alcaloideo por el método de Wah (1993) utilizando al crustáceo *Artemia salina*.

Las concentraciones evaluadas tanto para la planta completa como para los diferentes extractos de las hojas (extracto total, fase neutra y crudo alcaloideo) fueron 10 µg/mL, 100 µg/mL y 1000 µg/mL. Se calculó la CL₅₀ para cada extracto.

5.5.3.2 Determinación de la toxicidad aguda en ratones ICR por el método de Lorke (1983)

La toxicidad de un extracto íntegro de *D. lanosa* administrado por vía oral (p.o) se determinó de acuerdo al método descrito por Lorke (1983). Se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso de 25-30 g. Se utilizó el extracto total de la hoja y en una primera etapa se evaluaron las dosis 10 mg/kg, 100 mg/kg, y 1000 mg/kg; en una segunda etapa se evaluaron las dosis 1600 mg/kg, 2900 mg/kg, 5000 mg/kg. La administración fue oral y los ratones fueron monitoreados durante 15 días, después fueron sacrificados.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Revisión de la información etnobotánica y de ejemplares de herbario

Un aspecto de gran importancia para los estudios referentes a plantas medicinales es la revisión exhaustiva de fuentes de información etnobotánica. En este trabajo se realizó un estudio retrospectivo tomando en cuenta que la especie *D. lanosa* fue descrita por Bye en 1986. Con el objetivo de ubicarla en tiempo y espacio se tomaron en cuenta las publicaciones respaldadas con ejemplar de herbario y se realizó un estudio y un rastreo retrospectivo, para recopilar la información sobre la historia de uso de la especie. Hasta antes de esta fecha, de acuerdo a ejemplares de herbario, la especie se reconocía bajo los nombres de *D. inoxia*, *D. wrightii*, *D. meteloides* y/o *D. discolor*.

La revisión se llevó a cabo consultando fuentes de información primarias y secundarias. Las fuentes primarias son aquellas que cuentan con ejemplar de herbario; por lo tanto, presentan datos referentes al nombre científico, nombre común, zona de colecta y usos reportados para la especie. Las fuentes secundarias no son menos importantes, ya que nos brindan datos sobre qué y cuánto conoce la población acerca de las plantas, como las nombran, que características reconocen en ellas, cómo y para qué las utilizan, el modo de preparación, la dosis y vía de administración etc; es decir, todo el conocimiento empírico acerca de las plantas de mayor uso.

En cuanto a la revisión de los ejemplares de herbario, ésta se llevó a cabo con la finalidad de identificar con precisión los correspondientes a la especie *D. lanosa* y así diferenciarlos claramente de aquellos pertenecientes a las especies *D. inoxia*, *D. ceratocaula*, *D. metel*.

Con estos datos y fuentes históricas de gran importancia se realizó una línea del tiempo que se ilustra en la figura 8. Esta permite sustentar la importancia, uso histórico y la distribución espacial y temporal en nuestro país de la especie. Así mismo se puede corroborar que la planta se utiliza de modo similar a las cuatro especies del género con las que comparte área de distribución en el norte del país (Figura 9). Por lo tanto resulta lógico que sean nombradas comúnmente y utilizadas para los mismos fines.

Con base en la información recopilada se hizo un análisis sobre:

- ∅ las partes de la planta que más se utilizan
- ∅ el modo de uso y/o preparación
- ∅ enfermedad o afección para la cual se utilizan

Los resultados obtenidos de este estudio fueron los siguientes: La parte de la planta que más se utiliza son las hojas (48%), seguido de las raíces (26%), tallos y semillas (10% cada uno) y por último las flores (6%). Los frutos como tales no se utilizan.

En cuanto al modo de preparación, las hojas se emplean bajo la forma de emplasto (25%), infusión (21%), té (13%), cataplasma (13%), cigarrillos para fumar (8%), asadas (8%), molidas, maceradas (4%) y en loción (4%).

Las afecciones para las cuáles se recomienda la planta son: dolores reumáticos, musculares, hinchazón por golpes y desinflamatorio (26%), asma (13%), heridas y llagas (11%), hemorroides (11%), granos y afecciones de la piel (10%) uso ritual y/o ceremonial (10%) tos y garganta (8%), problemas digestivos (3%), dolor de oído (3%), parto (3%) y quemaduras (2%). En la figura 10 se ilustra gráficamente la información recién descrita.

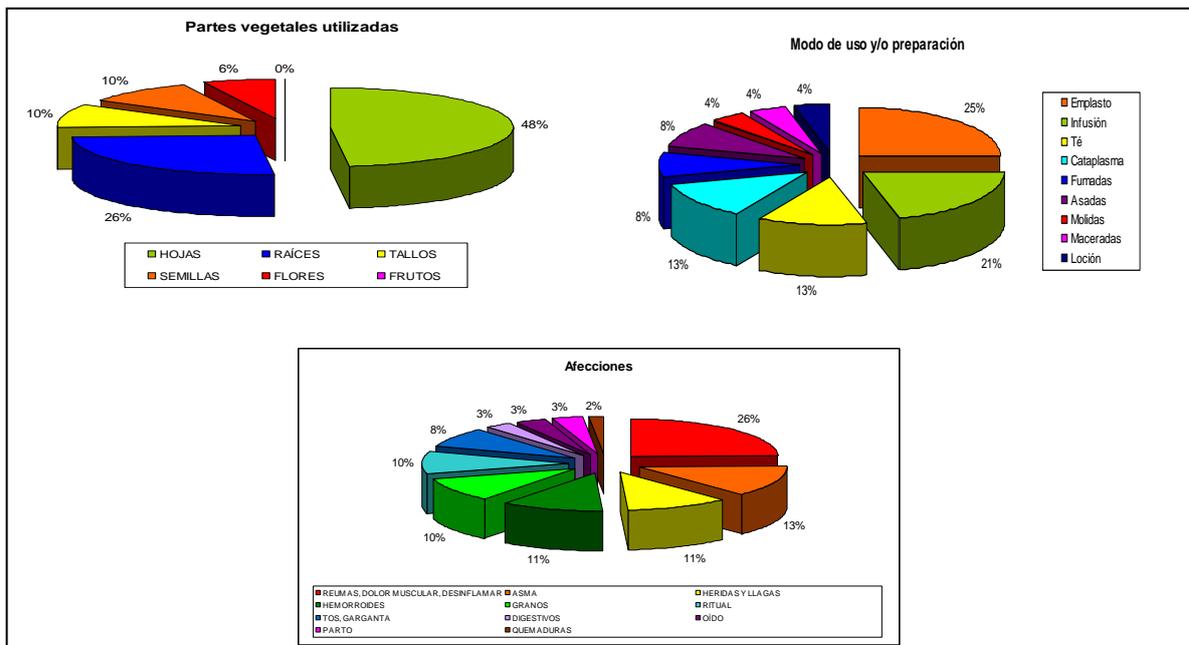


Figura 10. Partes vegetales más utilizadas con fines medicinales. Modo de preparación y afecciones para las que más se emplea el toloache.

Las diferentes especies de *Datura* distribuidas en nuestro país, han sido utilizadas de manera similar. En este sentido la parte vegetal más utilizada suele ser la hoja, bajo la forma de emplasto para uso tópico y así aliviar o contrarrestar dolores reumáticos, dolores musculares y como desinflamatorio. Estos resultados se utilizaron para determinar las actividades fisiológicas a evaluar en el laboratorio y con base en ello decidir que ensayos biológicos serían de utilidad para dichas evaluaciones.

6.2 Caracterización anatómica y estructural de *Datura lanosa*

Debido a la naturaleza diversa de las drogas vegetales, en fresco y en seco, enteras o en polvo y su composición química tan compleja; surge la necesidad de recurrir a diversos métodos y técnicas que permitan el reconocimiento, la valoración y la comprobación de productos originales, adulterados y/o falsificados con la finalidad de llevar a cabo un estricto control de calidad de los productos vegetales medicinales. Es en este sentido que los ensayos morfológicos, histológicos, micrográficos e histoquímicos entre otros, nos permiten caracterizar biológica y botánicamente, las drogas crudas objeto de estudio (San Martín, 1977).

El análisis de las drogas crudas en polvo es más que obligatorio cuando se pretende integrar una monografía tipo OMS, ya que es en esta forma (polvo) en la que se presentan más frecuentemente las falsificaciones y adulteraciones.

En cuanto a estudios histológicos se refiere, Timmerman en 1927 realizó la descripción de las especies *D. stramonium*, *D. innoxia*, *D. tatula*, *D. metel*, y *D. fastuosa* con la tecnología existente hasta ese momento. En el presente estudio mediante técnicas histoquímicas y de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) contemporáneas se describen las principales características de *D. lanosa* y *D. stramonium* con el objetivo de integrar la información necesaria para el control de calidad de la droga cruda de ambas especies y su posterior inclusión en una monografía tipo OMS.

Con esta finalidad, se realizó el análisis y la comparación de *D. lanosa* contra muestras de mercado pertenecientes a *D. stramonium*; por ser ésta última la de más amplia distribución en México y la que se expende en mercados del Distrito Federal. Para la caracterización anatómica y estructural se emplearon las hojas, debido a que es la parte más utilizada en la medicina tradicional y que por lo tanto representa la droga cruda.

6.2.1 Descripción anatómica e histológica de las hojas *Datura stramonium*

La hoja de *D. stramonium* tiene forma ovada, es peciolada y desigual en la base. El margen es dentado con cuatro o cinco largos dientes agudos con bordes sinuosos a cada lado de la lámina. Los bordes a veces se subdividen en otros en dientes más pequeños. El ápice es acuminado. El haz es verde oscuro y el envés es verde más claro. La nervadura principal es más prominente en el envés. Las siete u ocho venas principales se ramifican en un ángulo de 30° a partir de la vena central y se dirigen hacia los dientes del margen. La superficie del haz parece muy suave a simple vista, pero la superficie del envés, especialmente a lo largo de las venas, es ligeramente pubescente. Los pecíolos y tallos son suaves pero pueden presentar uno o más surcos longitudinales muy profundos. Varían en color de verde claro a verde oscuro con un tono morado (Figura 11).



Figura 11. Ilustración de *D. stramonium*

HOJA

Haz; epidermis superior: Desde una vista **superficial** la epidermis superior está compuesta de células que van de 40µm-70µm de longitud y 20µm-40µm de ancho. Tienen paredes ligeramente onduladas. La superficie es suave excepto las células que cubren las venas. Estas células son además muy alargadas (Figura 12).

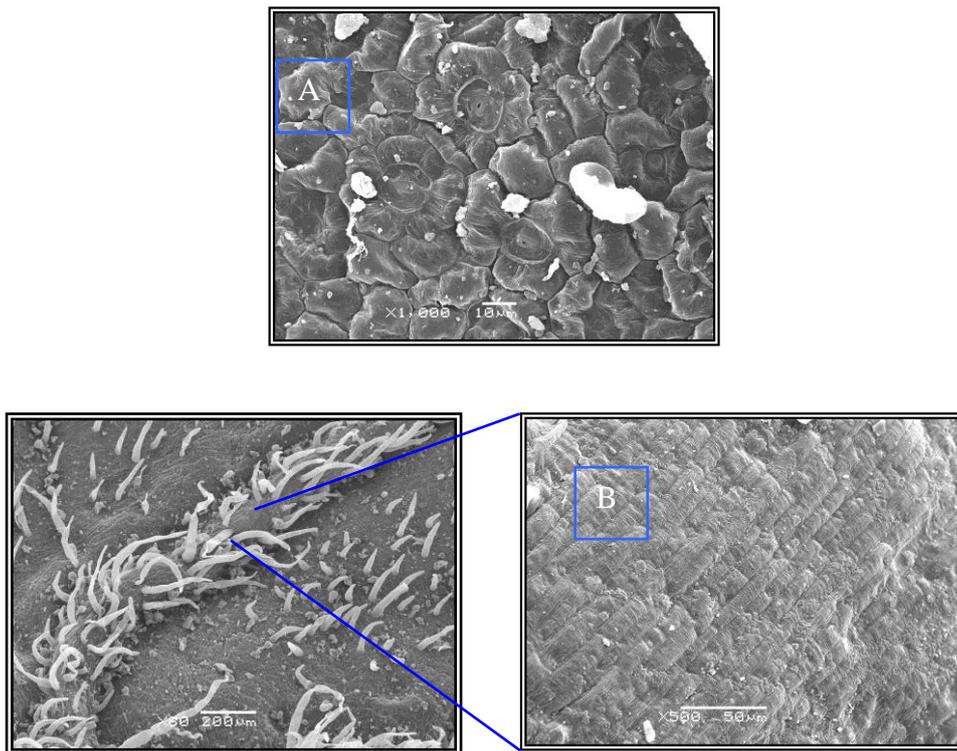


Figura 12. Microfotografías de MEB. A Forma irregular de las células epidérmicas (1000 X). B Detalle de las células de una vena (500 X).

Una sección transversal de la lámina mide aproximadamente 180 μ m-230 μ m de ancho. En este tipo de corte se observa que la **epidermis** superior es uniestratificada. Las células del haz son más grandes que las del envés, varían de 15 μ m-70 μ m de longitud y miden 20 μ m de ancho y son isodiamétricas. La organización de los tejidos es dorsiventral, anfiestomática. Hay una cutícula de 2 μ m de grosor en la pared externa y sus paredes son delgadas.

Mesófilo: Vistas desde la superficie las células en empalizada son circulares en el margen. Miden de 10-30 μ m de diámetro. El **parénquima en empalizada** es compacto y uniestratificado con grandes células (70 μ m de longitud y casi 15 μ m de ancho) y de pared recta. Aquellas que se ubican inmediatamente debajo de un estoma, a veces son más cortas debido a la presencia de espacios intercelulares (cámaras subestomáticas) entre el estoma y el resto de las células. El número de dichos espacios es menor en comparación con *D. lanosa* (Figura 13).

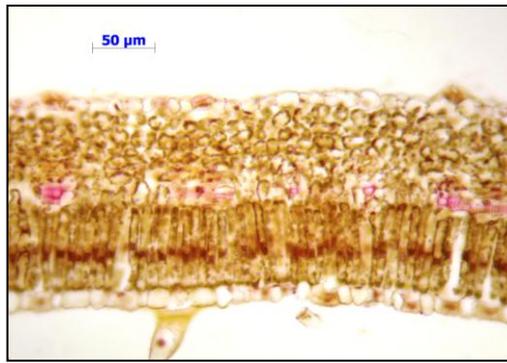


Figura 13. Corte histológico de hoja de *D. stramonium*. Tinción cuádruple (CJ).

El resto del mesófilo (**parénquima esponjoso**) está formado por alrededor de cuatro filas de células elípticas o circulares ramificadas, empaquetadas y con algunos espacios aéreos. En cuanto al sistema vascular se observan vasos con ornamentación helicoidal. Rodeando a estos vasos individuales o en conjunto de dos o tres se observan células grandes que forman una especie de corona. Muchas de estas células contienen drusas de 15μm -20μm de diámetro que se pueden ubicar dentro o abarcando completamente el espacio celular. También se pueden encontrar cristales arenosos prismáticos de 15μm-20μm o grupos de microcristales identificados solo por polarización (Figura 14).

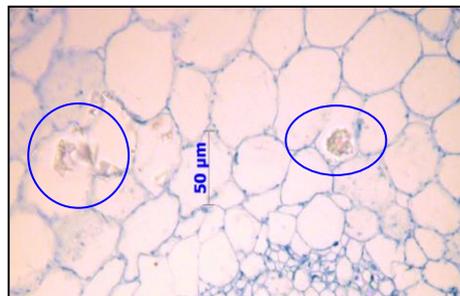


Figura 14. Detalle de los cristales en hoja de *D. stramonium*. Tinción cuádruple (CJ).

La lámina superior del mesófilo esponjoso consiste en células más o menos rectangulares que regularmente miden 35μm. Las células de la epidermis inferior son del mismo tamaño que las de la superficie superior pero las paredes son más sinuosas. En vista superficial las células de la **epidermis inferior** son similares en cuanto a forma a las de la epidermis superior, pero las paredes son más sinuosas y los estomas son más numerosos.

Estomas: Los estomas son elípticos. Cada célula guarda o célula oclusiva mide aproximadamente $8\mu\text{m}$ en su parte más ancha y $30\mu\text{m}$ de longitud. Cuando las células guarda del estoma se cortan transversalmente se observa un margen circular de $8\mu\text{m}$ de diámetro con un pico distintivo que resulta de la fuerte proyección de la cutícula sobre el poro.

Los estomas están rodeados por tres células epidérmicas subsidiarias, una de las cuales es más pequeña que las otras. Este tipo de estomas se conoce como mesógenos anisocíticos y son característicos en la familia Solanaceae (Bessis & Guyot, 1991). Además son muy similares a los de *D. metel* con una o ambas células guarda parcial o completamente colapsadas pero, aún con un poro distintivo. La cantidad varía de 60 a 140 por mm^2 en el haz y de 140-250 por mm^2 (de 2 a 3 veces más) en el envés (Figura 15).

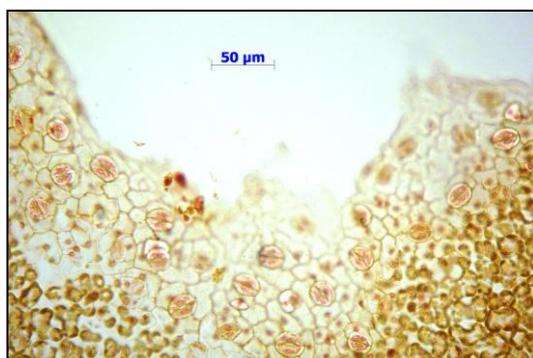


Figura 15. Estomas en hoja de *D. stramonium*. Tinción cuádruple (CJ).

Tricomas. En ambas superficies epidérmicas (haz y envés) se encuentran tricomas glandulares típicos y no glandulares pluricelulares uniseriados (o protectores) que parten de una o más células epidérmicas. Estos tricomas se encuentran en ambos lados pero no son muy numerosos.

En lo que respecta a los **tricomas glandulares** la mayoría se encuentra a lo largo de la vena media. Están formados por siete células (tres en tallo, tres o cuatro en la base y cuatro en la cabeza). El tallo mide aproximadamente $14\mu\text{m}$ de longitud por $12\mu\text{m}$ de ancho. La cabeza glandular vista desde arriba tiene una apariencia circular de $40\mu\text{m}$ diámetro por $45\mu\text{m}$ de alto y $40\mu\text{m}$ de ancho. La cabeza contiene una sustancia amarillenta de naturaleza granular. En la base de esta cabeza hay células poliédricas también con un contenido amarillento. Con la tinción cuádruple (CJ) se tiñe rojo

brillante, y de negro con el azul negro de naftol indicando su naturaleza proteica (Figura 16).

Los **tricomas no glandulares**, uniseriados o protectores son los más numerosos y se originan de una célula epidérmica. Cabe mencionar que Timmerman (1927) en su trabajo sobre las especies *D. stramonium*, *D. innoxia*, *D. tatula*, *D. metel*, y *D. fastuosa* no destaca esta característica. Estos tricomas no glandulares son cónicos, uniseriados y no ramificados y consisten de una a cuatro células, casi siempre tres. Su cutícula está cubierta por numerosas proyecciones granulares desiguales las cuáles llegan a ser más pequeñas y menos numerosas a lo largo del apéndice del tricoma. Se pueden encontrar pequeños cristales en algunas células (Figura 16).

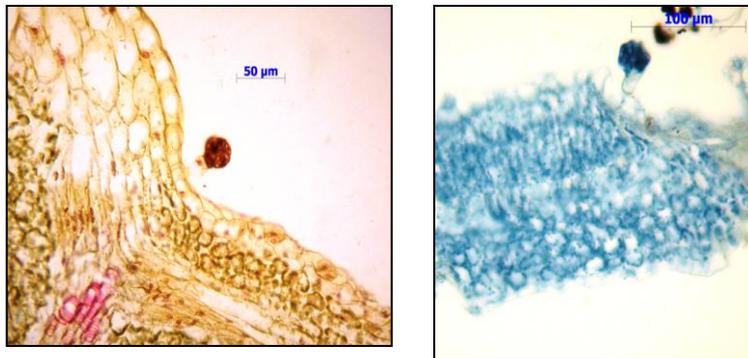


Figura 16. Microfotografía de tricomas glandulares en hoja de *D. stramonium*. Tinción cuádruple (CJ) y azul negro de naftol.

Haz vascular Sección transversal de la lámina media: En cuanto a la venación, tanto primaria como secundaria, se observan vasos con ornamentación helicoidal y estos siempre aparecen rodeados por una envoltura de células desprovistas de cristales. Los haces vasculares tienen una organización colateral, los miembros del xilema presentan ornamentación anular. En la vena media observamos una cresta longitudinal por encima de la lámina media en la epidermis superior de la hoja. La lámina media se proyecta fuertemente en la superficie inferior de la hoja. Estas características llegan a ser evidentes en la sección transversal como una prominencia triangular con un ápice redondeado por encima de la vena media cuyo grosor es similar al del final de la lámina. En la superficie inferior se observa una proyección redonda cuyo límite describe un arco extendido sobre las tres cuartas partes de un círculo con un diámetro de alrededor de cinco veces más grande que el grosor de la lámina (Figura 17).

La epidermis de ambas superficies consiste en una sola capa de células casi rectangulares con paredes laterales ligeramente más gruesas y cutícula externa. Tanto en haz como en envés se aprecian numerosas bases de tricomas creciendo de las células epidérmicas.

Inmediatamente debajo de la epidermis del envés hay dos o tres filas de colénquima y en el límite con los idioblastos (con cristales en su interior) se observan otras tres filas de colénquima. Los espacios intercelulares en esta zona son muy pequeños. Por debajo de la epidermis del haz el parénquima sin color de la vena media consiste de seis a ocho filas de células isodiamétricas con pared delgada. Algunas de estas células están llenas con cristales arenosos de oxalato de calcio otros contienen uno o más cristales prismáticos.

Las bandas de xilema están organizadas en un arco y opuestas a cada una de ellas en el lado inferior hay una banda de floema. Por encima del arco de xilema hay una cantidad de parénquima en el cual está embebido un número de pequeñas islas de floema formando un arco paralelo con el xilema.

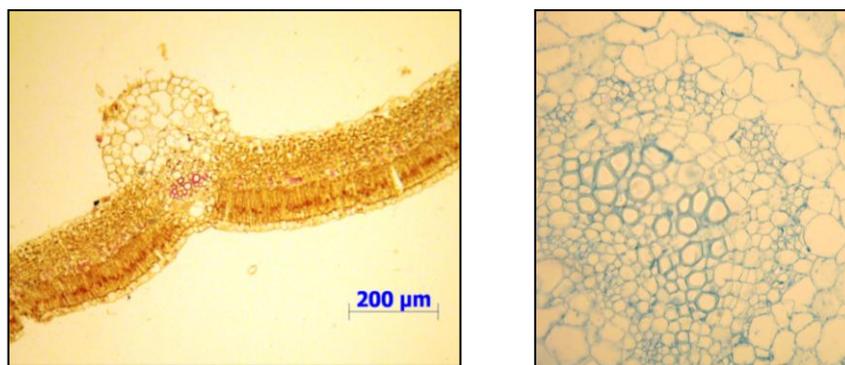


Figura 17. Microfotografía de la vena media en hoja de *D. stramonium*. Tinción cuádruple (CJ) y azul negro de naftol.

6.2.2 Caracterización anatómica y estructural de *Datura lanosa*

En el presente trabajo se describe por vez primera la anatomía e histología de la hoja de *D. lanosa*, lo cuál resulta de gran importancia para establecer los parámetros de identidad botánica de la especie.

HOJA

Las hojas de *D. lanosa* son simples, con forma ovada, tienen margen entero o irregularmente sinuado-dentado (Figura 18) miden 21.5cm de largo y 18cm de ancho.

Haz; epidermis superior: Las células epidérmicas del haz oscilan entre 30 y 36 μm de longitud y entre 20 y 22 μm de altura. Son circulares al corte, isodiamétricas o irregulares en vista superficial. Las células epidérmicas del **envés** son alargadas (casi rectangulares) y miden 18 μm de largo por 15 μm de ancho con borde irregular, más pequeñas que las del haz.



Figura 18. Hojas en fresco de *D. lanosa* (Morales, 2008).

Mesófilo. Debajo de la epidermis del haz se encuentra una hilera de células cilíndricas en empalizada de pared gruesa que miden aproximadamente 120 μm de longitud y 14 μm de ancho aproximadamente. En los sitios que corresponden a los estomas se encuentra una pequeña cámara subepidérmica que separa a las células del parénquima en empalizada (Figura 19).

Las células de la lámina superior del parénquima esponjoso son células esféricas o irregulares de 22 μm de ancho. Algunas células vecinas al haz vascular son de mayor tamaño, miden 25 μm de diámetro y pueden acompañar a uno o dos vasos, formando una estructura similar a una vaina. Las venas se observan en intervalos en corte transversal. En corte paradormal, en algunas células que acompañan a las venas, se observan agregados cristalinos de oxalato de calcio refringentes en contraste de fases. El mesófilo restante se compone de alrededor de cuatro hileras de células circulares o irregulares, frecuentemente con espacios intercelulares que corresponden a las cámaras subestomáticas. Cabe destacar que la cantidad de estas cámaras es sensiblemente mayor que en *D. stramonium*

Estomas. Los estomas se ubican a nivel de las células epidérmicas en ambas caras, adaxial y abaxial (Figura 19). Al igual que en *D. stramonium* son mesógenos

anisocíticos. Miden $20\mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente y son más numerosos que en *D. stramonium*.

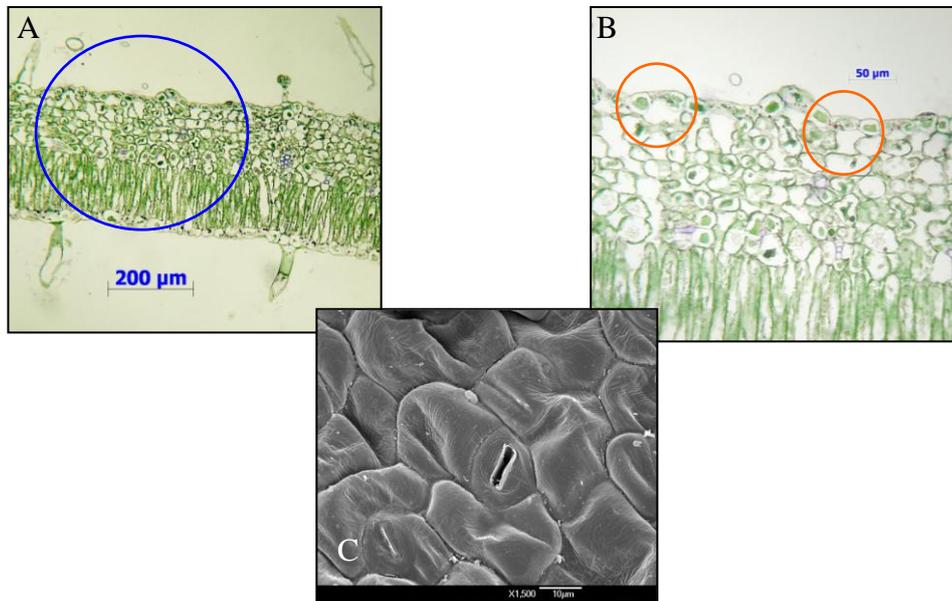


Figura 19. Microfotografías de lámina foliar de *D. lanosa*. A y B detalle de los espacios intercelulares en parénquima esponjoso y su estoma correspondiente. C) Imagen de MEB (X 1500). Detalle de un estoma anomocítico mesógeno.

Tricomas. Al igual que en *D. stramonium* los tricomas se localizan en ambas caras y son de dos tipos: glandulares y no glandulares pluricelulares uniseriados (o protectores). En los tricomas glandulares la cabeza esta formada por cuatro células en el mismo nivel; miden $33\mu\text{m}$ de ancho por $31\mu\text{m}$ de alto aproximadamente. La base de la cabeza glandular consiste en dos células en el mismo plano, localizadas sobre un tallo uniseriado que mide $15\mu\text{m}$ X $12\mu\text{m}$ formado por dos células que surge de una célula epidérmica. Estos tricomas glandulares presentan un contenido que se tiñe de verde con la tinción cuádruple (CJ) y que por lo tanto pudiera ser de naturaleza polisacárida (Figura 20).

Los tricomas uniseriados pluricelulares (o protectores) son los más abundantes y provienen de una célula epidérmica. Son cónicos y están formados de tres a cuatro células, casi siempre tres. Regularmente miden $275\mu\text{m}$ de largo pero pueden llegar a medir $550\mu\text{m}$. El diámetro de la base es de $35\text{-}60\text{-}90\mu\text{m}$. Tienen paredes delgadas, aunque las basales usualmente muestran paredes más gruesas que las células terminales. Su cutícula presenta una ornamentación vesicular. Aparentemente no presentan

contenido citoplásmico. Los tricomas son más numerosos en el envés que en el haz. Es esta abundancia la que da la apariencia lanosa a las partes aéreas de la planta a nivel macroscópico. De ahí el nombre de la planta (Figura 20).

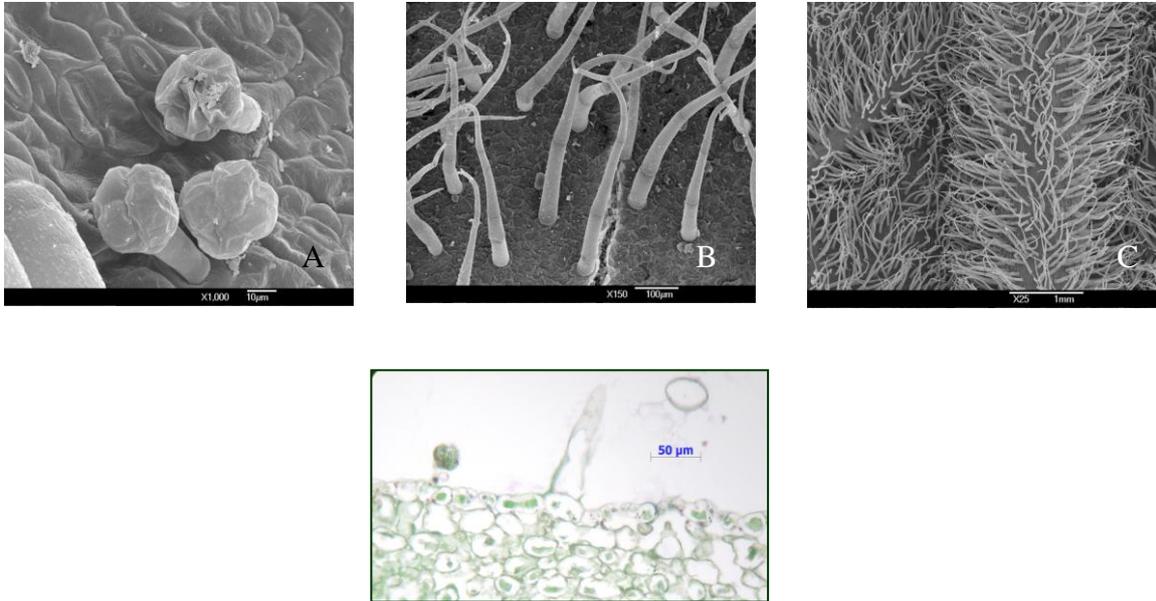


Figura 20. Imágenes de MEB. A Tricomas glandulares (1000 X). B (150 X) y C Tricomas no glandulares uniseriados pluricelulares (25 X). D Microfotografía con tricoma glandular y tricoma no glandular uniseriado.

La descripción del haz vascular se ajusta a la descripción de *D. stramonium* (Timmerman, 1927). Los vasos de las venas primarias y secundarias presentan ornamentación helicoidal.

Tabla 7. Caracteres anatómicos e histológicos de la especie *D. lanosa* en comparación con *D. stramonium*.

Característica	anatómico y/o	<i>D. stramonium</i>	<i>D. lanosa</i>
histológico			
Forma de la hoja		Ovada con base redondeada	Ovada con base redondeada
Margen de la hoja		Dentado con bordes sinuosos. Cada borde a su vez se subdivide en dientes más pequeños	Entero o irregularmente sinuado-dentado
Tricomas no glandulares uniseriados pluricelulares (MEB)		Poca densidad. Mayor cantidad en vena primaria y venación secundaria	Gran densidad en toda la lámina. Más evidentes sobre vena primaria y venación secundaria
Tricomas glandulares		Típicos de solanáceas	Típicos de solanáceas
Células de haz		Pequeñas, de forma isodiamétrica	34µm X 22µm. Circulares al corte e isodiamétricas en vista superficial
Células del envés		Más pequeñas que las del haz de forma irregular	Alargadas (casi rectangulares) 18µm X 15µm. Borde irregular, más pequeñas que las del haz.
Parénquima esponjoso		Pocos espacios intercelulares. Menos que en <i>D. lanosa</i> . Algunas contienen drusas ¹ de oxalato de calcio	Espacios intercelulares con cámaras subestomáticas en mayor número que en <i>D. stramonium</i> . Algunas contienen drusas de composición desconocida pero muy probablemente corresponde a oxalato de calcio
Células adyacentes al haz vascular		De mayor tamaño. Algunas con drusas en su interior	De mayor tamaño, casi 25µm de diámetro, sin contenido aparente. Similares a una vaina ²

Estos resultados nos permiten caracterizar botánicamente a la especie y reforzar su identidad como integrante del género *Datura*. Al tener bien definidas dichas características es posible diferenciarla claramente a nivel anatómico e histológico, de las especies *D. innoxia*, *D. wrightii* y *D. discolor*, con las que comparte área de distribución en el norte del país.

También es posible reconocerla y diferenciarla de *D. stramonium* (Tabla 7) la cual se encuentra más ampliamente distribuída y es la que más se expende en los mercados del D.F. con fines medicinales (Figuras 21 y 22).

¹ Agregados cristalinos en forma de estrella. A esta formación se le conoce como drusa. Su presencia es común en hojas de plantas del género *Datura*.

² La presencia de estas células de mayor tamaño alrededor del haz vascular, pudiera sugerir la ocurrencia de fotosíntesis de tipo C₃. Este dato no se comprobó, sin embargo el presente estudio puede servir como antecedente para profundizar en el aspecto fisiológico vegetal de la especie, en estudios posteriores.

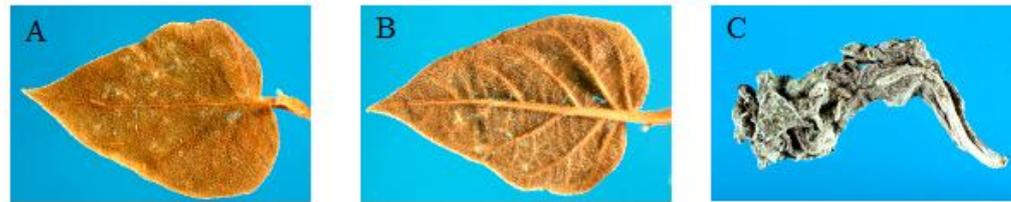


Figura 21. Detalle de la hoja de *D. lanosa*. A) Haz, en fresco. B) Envés, en fresco. C) Droga cruda.

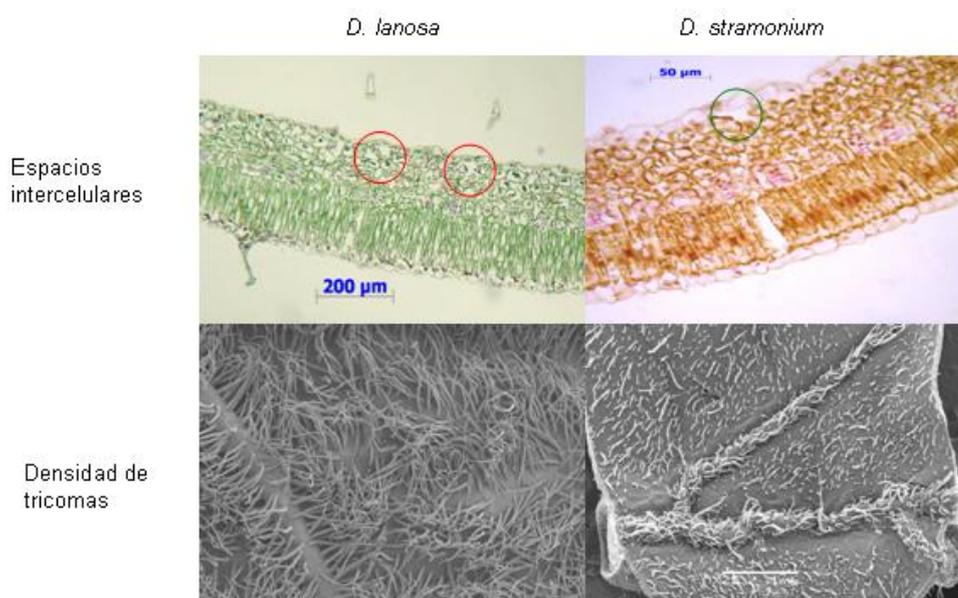


Figura 22. Comparación entre *D. lanosa* y *D. stramonium*. Detalle de espacios intercelulares y número de tricomas en el haz.

6.3 Establecimiento de perfiles cromatográficos

Con la finalidad de establecer las pruebas de identidad química, se establecieron los perfiles cromatográficos del crudo alcaloideo obtenido a partir de cada una de las cuatro partes vegetales de *D. lanosa* analizadas (raíz, tallo, hoja y fruto), para ello se utilizaron las técnicas cromatográficas CCF, CG (EM-IE, EM-IQ) y CLAE.

6.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

A pesar de los avances tecnológicos de hoy en día, la CCF continúa siendo una manera eficiente y común para establecer perfiles cromatográficos de numerosos

productos obtenidos de diversas fuentes, en este caso de drogas crudas. De tal modo, que en muchas farmacopeas oficiales y textos no oficiales se presentan los cromatogramas logrados por medio de esta técnica, que entre otras ventajas, es de bajo costo, de fácil aplicación y ofrece resultados en muy corto tiempo. Además, es una herramienta con la que se obtienen datos preliminares en cuanto a la composición de los extractos analizados y en base a estos resulta más fácil establecer las condiciones para trabajar con técnicas cromatográficas más sofisticadas y de mayor costo.

En nuestro estudio, mediante un análisis por CCF y el uso de estándares adquiridos comercialmente se corroboró la presencia de los alcaloides tropánicos atropina y escopolamina, como los componentes mayoritarios de los cuatro crudos alcaloideos analizados, al revelar la placa con reactivo de Dragendorff. A manera de ejemplo en la figura 23 se ilustran los cromatogramas del crudo alcaloideo correspondiente a la droga cruda (hoja) de *D. lanosa*.

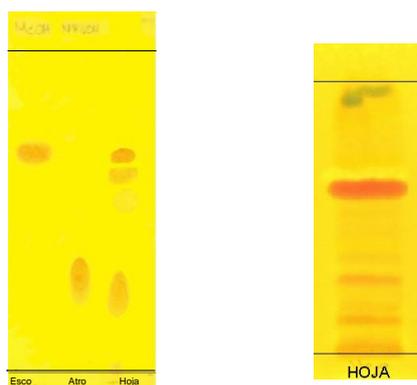


Figura 23. Cromatograma en Capa Fina del crudo alcaloideo de hoja de *D. lanosa*, (Gel de Sílice; $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (9:1:1); Agente revelador: Dragendorff)

6.3.2 Establecimiento de perfiles cromatográficos por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas en su modalidad Impacto Electrónico (CG/EM-IE) e Ionización Química (CG/EM-IQ)

La cromatografía de gases es una técnica que permite la separación de compuestos térmicamente estables y volátiles. Para el caso de los alcaloides tropánicos, ésta técnica ha sido ampliamente utilizada según. De hecho la atropina, fue el primer alcaloide identificado con esta técnica (Dragër, 2002).

En nuestro estudio se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, permitiendo la separación y caracterización de los alcaloides

presentes en los crudos alcaloideos. Los espectros de masas de los alcaloides se obtuvieron en las modalidades de impacto electrónico e ionización química. Esta última se utilizó en cuando no fue posible identificar los iones moleculares por la por la técnica de impacto electrónico.

Los espectros de masas obtenidos por la técnica de impacto electrónico se compararon con distintas bases de datos así como con la información descrita en la literatura (Blossey *et al.*, 1963; Paphassarang, *et al.*, 1985; Plank & Wagner, 1985; Friedman & Levin, 1989; Fliniaux *et al.*, 1991; Mandal *et al.*, 1991; Ionkova *et al.*, 1994; Berkov, 2003; Berkov & Sayed, 2003; Kursinski *et al.*, 2005; Doncheva *et al.*, 2006; Mroczek *et al.*, 2006). Con estas herramientas se identificaron los fragmentos característicos de los alcaloides tropánicos.

Los perfiles cromatográficos obtenidos por CG/EM para cada parte vegetal se presentan a continuación. El análisis de cada uno de estos cromatogramas se resume en las tablas 8-11. Los cromatogramas correspondientes se ilustran en las figuras 24-29.

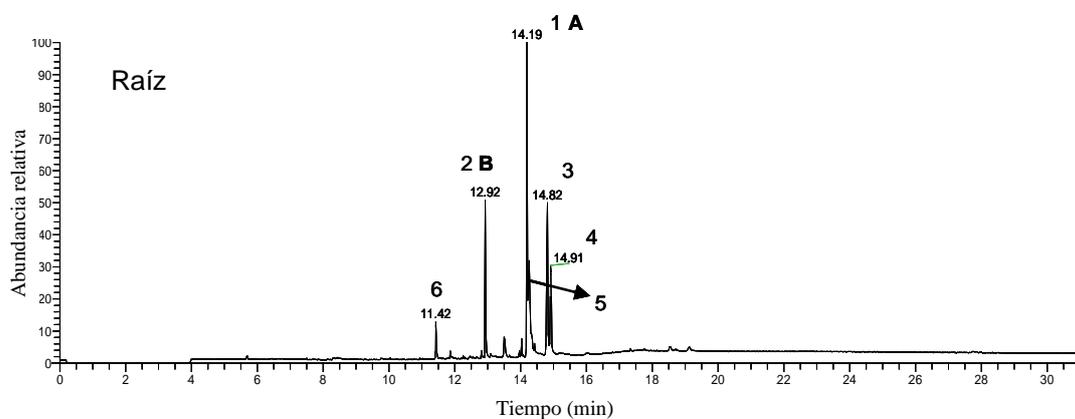


Figura 24. Cromatograma (CG/EM-IE) del crudo alcaloideo de raíz de *D. lanosa* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

Tabla 8. Alcaloides mayoritarios del crudo alcaloide de la raíz de *D. lanosa* de acuerdo al análisis por CG/EM.

Compuesto	% (TIC)	M+ (%)	Tiempo de retención	Fragmentos de masas (<i>m/z</i>)					
1) A.- Hiosciamina (Atropina)	97.3	289	14.19	124 (100)	271 (0.5)	140 (8)	124 (100)	94 (18)	82 (20)
2) 3-Tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano (Berkov, 2002)	75.7	311, 312	12.92	94 (100)	296 (3)	212(18)	129 (7)	94 (100)	83 (15)
3) B.- Escopolamina	75.6	303, 304	14.82	94 (100)	285 (2)	154 (37)	138 (87)	94 (100)	81 (20)
4) 3-(2-Hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano	24.3	319	14.91	94	254 (1)	238 (2)	138 (57)	94 (100)	83(40)
5) Norhiosciamina	24.3	275	14.26	110 (100)	148 (1)	124 (3)	110 (100)	103 (8)	80 (20)
6) Cuscohigrina (JOC 67, 6456) (JAFC 45,3114)	8.2	209	11.42	84	140	124	110	99, 98, 97	84

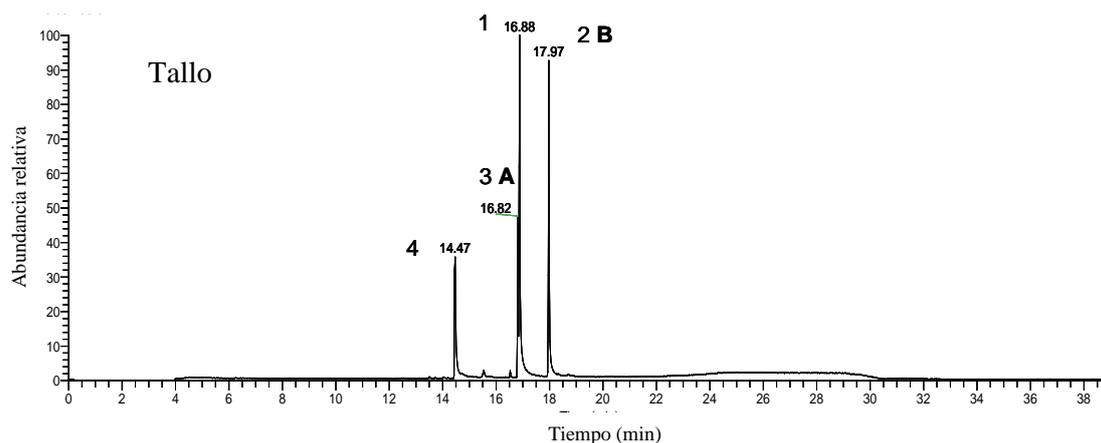


Figura 25. Cromatograma (CG/EM-IE) del crudo alcaloide de tallo de *D. lanosa* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

Tabla 9. Alcaloides mayoritarios del crudo alcaloideo del tallo de *D. lanosa* de acuerdo al análisis por CG/EM.

Compuesto	% (TIC)	M+ (%)	Tiempo de retención	Fragmentos de masas (m/z)					
1) Norhiosciamina	97.5	275, 257	16.88	110 (100)	148 (1)	118 (5)	110 (100)	103 (7)	80 (22)
2) B.- Escopolamina	90	303	17.97	94 (100)	285 (3)	154 (37)	138 (90)	108 (65)	154 (37)
3) A.- Hiosciamina (Atropina)	45	289	16.82	124 (100)	123 (4)	103 (6)	94 (23)	82 (28)	67 (12)
4) 3-Tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano (Berkov, 2002)	35.1	311	14.47	94 (100)	271 (2)	140(6)	129 (8)	95(60)	82 (25)

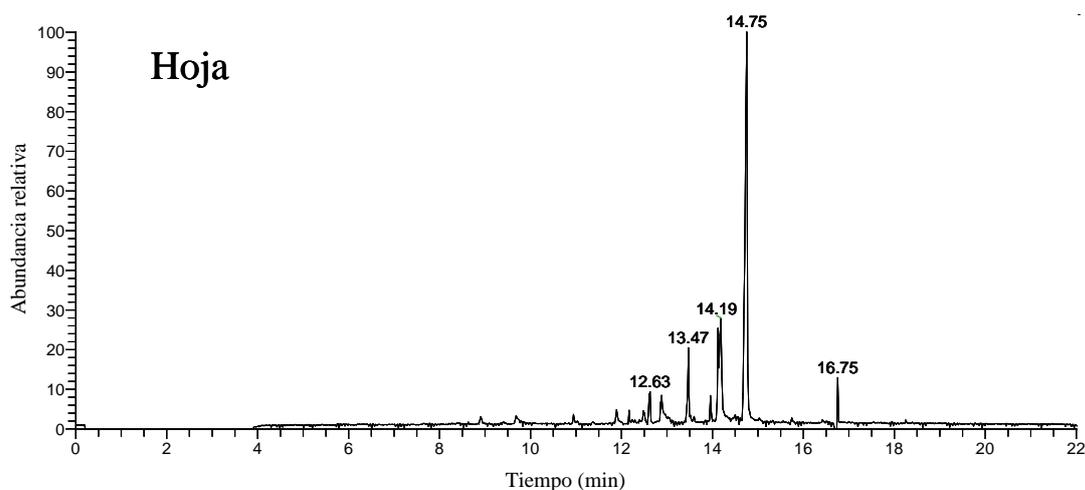


Figura 26. Cromatograma (CG/EM-IQ) del crudo alcaloideo de hoja de *D. stramonium* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

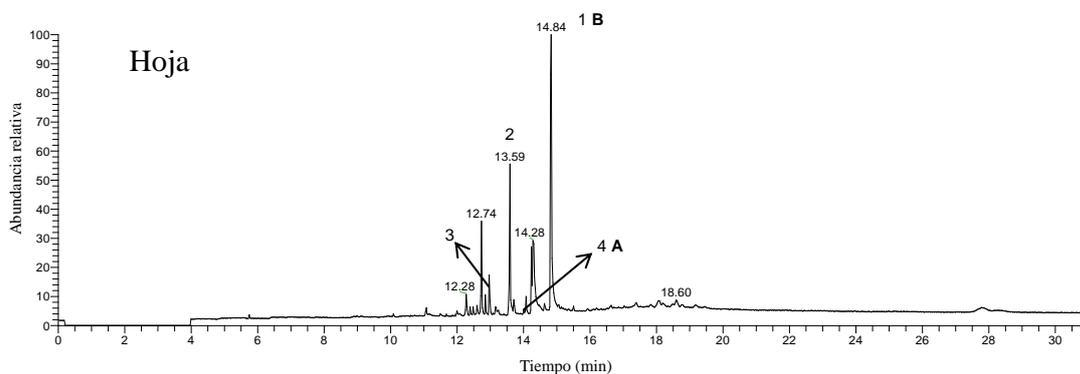


Figura 27. Cromatograma (CG/EM-IE) del crudo alcaloideo de hoja de *D. stramonium* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

Tabla 10. Alcaloides mayoritarios del crudo alcaloideo de la hoja de *D. lanosa* de acuerdo al análisis por CG/EM.

Compuesto	% (TIC)	M+ (%)	Tiempo de retención	Fragmentos de masas (m/z)					
				94(100)	154 (32)	138 (69)	108 (55)	94(100)	90, 80, 42
1) B.- Escopolamina	100	303	14.84	94(100)	154 (32)	138 (69)	108 (55)	94(100)	90, 80, 42
2) Norhiosciamina	100	275	14.28	110 (100)	124 (5)	94 (3)	80 (23)	68 (18)	41
3) 3-Tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano (Berkov, 2002)	16	311	12.97	94(100)	212 (28)	194 (8)	129 (10)	94 (100)	96
4) A.- Hiosciamina (Atropina)	10	289	14.24	124(100)	94 (28)	83 (25)	82 (40)	67	42

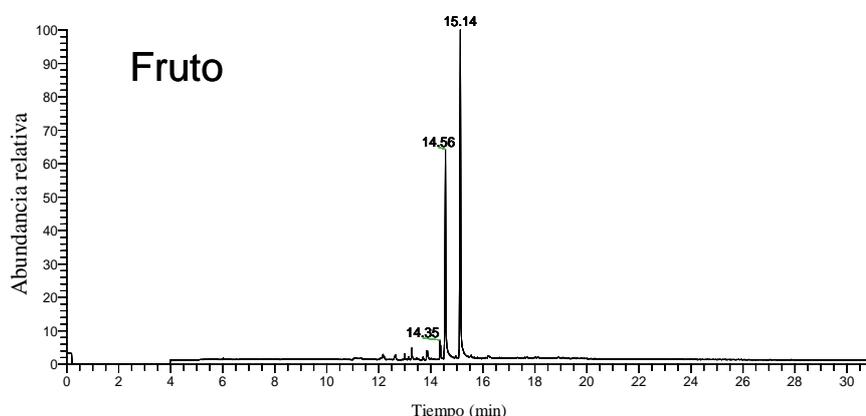


Figura 28. Cromatograma (CG/EM-IE) del crudo alcaloideo de fruto de *D. stramonium* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

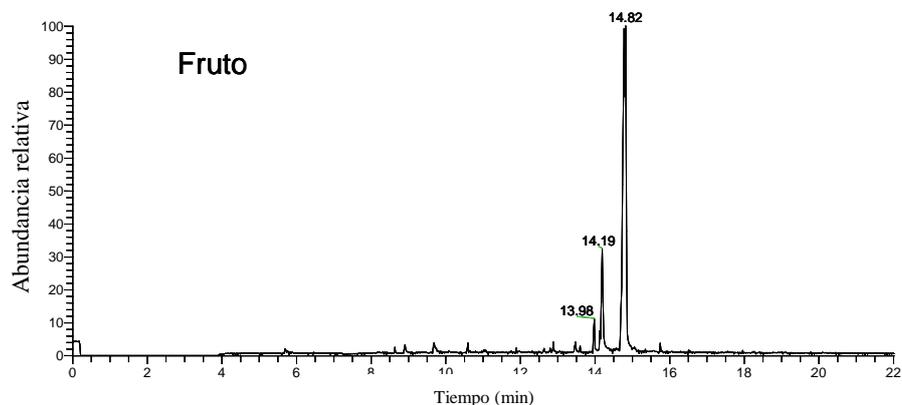


Figura 29. Cromatograma (CG/EM-IQ) del crudo alcaloideo del fruto de *D. lanosa* analizado con una columna DB5. La muestra se solubilizó en MeOH. Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 20 mL/min.

Tabla 11. Alcaloides mayoritarios del crudo alcaloideo del fruto de *D. lanosa* de acuerdo al análisis por CG/EM.

Compuesto	% (TIC)	M+ (%)	Tiempo de retención	Fragmentos de masas (<i>m/z</i>)		
1) B.- Escopolamina	85	303	14.82	138 (100)	154 (40)	94
2) A.- Hiosciamina (Atropina)	85	289	14.19	124 (100)	142	121
3) Norhiosciamina	30	275	14.78	110 (100)	148	
4) Apoesopolamina	10	285	13.98	138 (100)	124	94

A manera de ejemplo en la figura 30 se indica el patrón de fragmentación del alcaloide atropina. En este diagrama se aprecian los fragmentos en una *m/z* de 94 y 124, que son diagnósticos para los alcaloides derivados de la tropina.

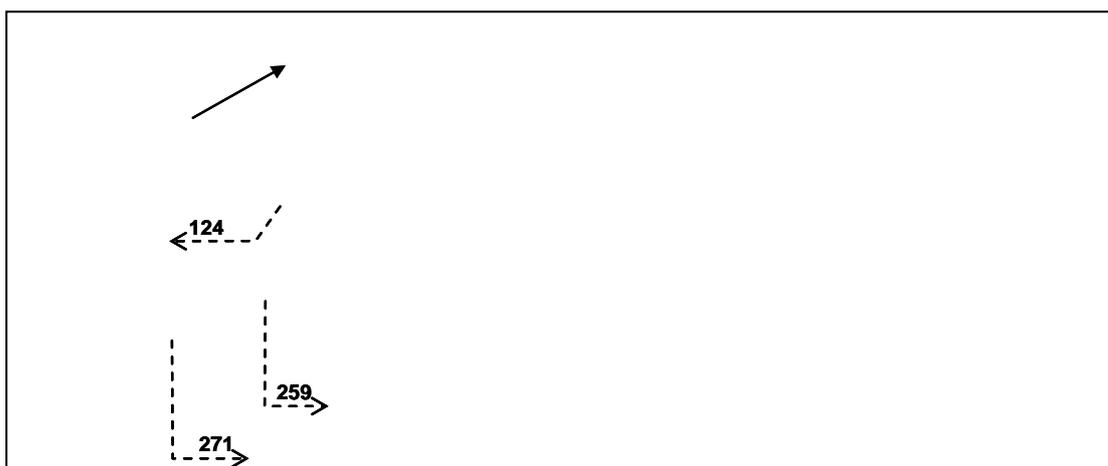


Figura 30. Patrón de fragmentación de la atropina (Chen *et al.*, 2006, Blossey, 1970).

6.3.3 Establecimiento de perfiles cromatográficos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) del crudo alcaloideo de las cuatro partes vegetales de *Datura lanosa*

En la actualidad se ha intensificado la utilización de CLAE debido a su alta sensibilidad, reproducibilidad además de que ofrece la opción de utilizar una amplia gama fases de fases estacionarias y móviles. Esta técnica permite la resolución de mezclas complejas para lograr la identificación, cuantificación y aislamiento de una gran cantidad de compuestos (Wagner, 1985).

Debido a las características básicas de los alcaloides tropánicos, fue necesario establecer una mezcla de elución óptima para generar los de perfiles cromatográficos que nos permitieran identificar a los compuestos mayoritarios presentes en *D. lanosa*. En la literatura especializada (Wagner, 1985; Mendel & Levin, 1989; Shimomura, 1990; Fliniaux *et al.*, 1993; Philipov, 2002; Kursinski, 2005; Mroczek *et al.*, 2006) se han descrito diferentes fases móviles para la separación de alcaloides, la mayoría de las cuáles incluyen soluciones amortiguadoras compuestas por $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, y trietilamina/ácido ortofosfórico. En nuestro estudio se eligió una solución amortiguadora compuesta por trietilamina y ácido ortofosfórico a pH 6.5. Las condiciones bajo las que se inyectaron las muestras, se presentan en la Tabla 6 de la parte experimental.

Los estándares utilizados fueron sulfato de atropina e hidrobromuro de escopolamina trihidratada adquiridos por Sigma–Aldrich® y se disolvieron en una mezcla de MeOH/ACN/H₂O/NH₄OH (2.5:1:0.5:2.0). Los crudos alcaloideos se disolvieron en la misma mezcla. La fase estacionaria utilizada consistió en una fase reversa Purospher Star RP18 con la cual se trabajó a lo largo de todo el análisis.

Los perfiles cromatográficos obtenidos para cada una de las muestras y el resumen de los alcaloides mayoritarios identificados, se presentan a continuación. Para la especie *D. lanosa* se analizaron muestras de crudo alcaloideo de raíz, tallo, hoja y fruto. En el caso de *D. stramonium* solo se estudiaron muestras de crudo alcaloideo de hoja. Cabe destacar que el crudo alcaloideo de las hojas de *D. stramonium* se analizó con fines comparativos.

Los cromatogramas desarrollados por CLAE se ilustran en la figuras 32-36 y los rendimientos y composición (%) de los alcaloides mayoritarios presentes en cada parte vegetal se indican en las tablas 11-15.

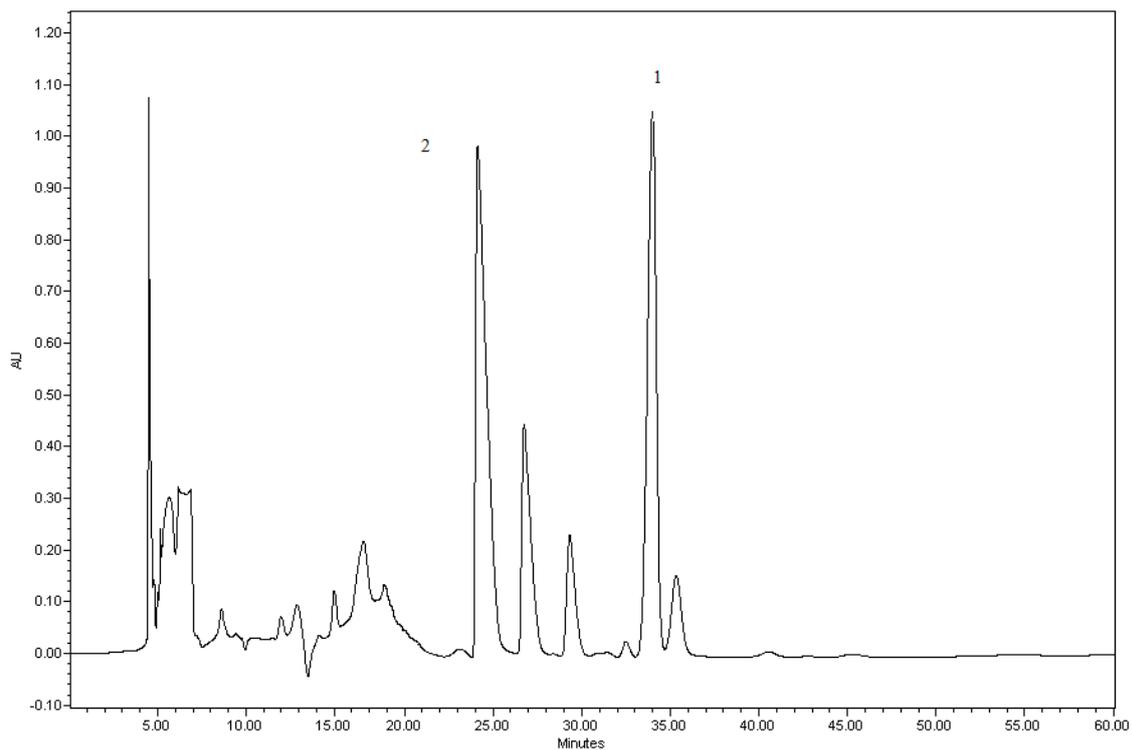


Figura 32. Perfil cromatográfico del crudo alcaloide de raíz de *D. lanosa* obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

Tabla 11. Principales alcaloides identificados por CLAE en el crudo alcaloide de raíz de *D. lanosa*.

Alcaloides identificados	%	Tiempo de retención (min)
Escopolamina	21.11	34
Atropina	20.24	24

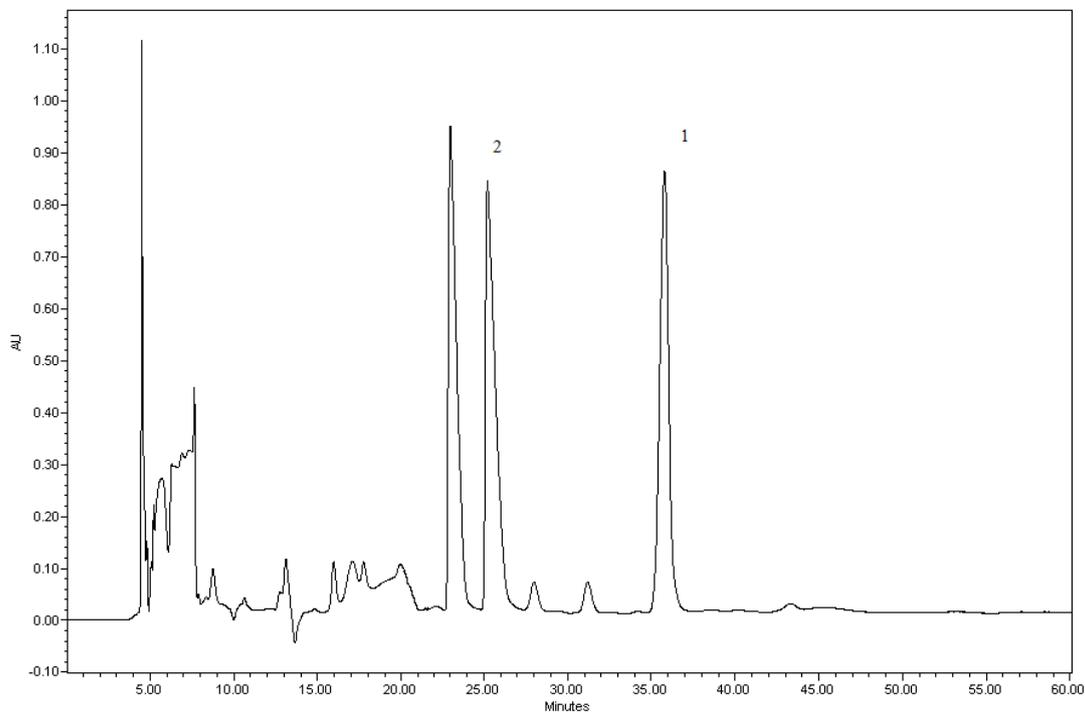


Figura 33. Perfil cromatográfico del crudo alcaloide de tallo de *D. lanosa* obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20µL. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

Tabla 12. Principales alcaloides identificados por CLAE en el crudo alcaloide de tallo de *D. lanosa*.

Alcaloides identificados	%	Tiempo de retención (min)
Escopolamina	34.39	35
Atropina	30.21	25
Norhioscina	35.15	23

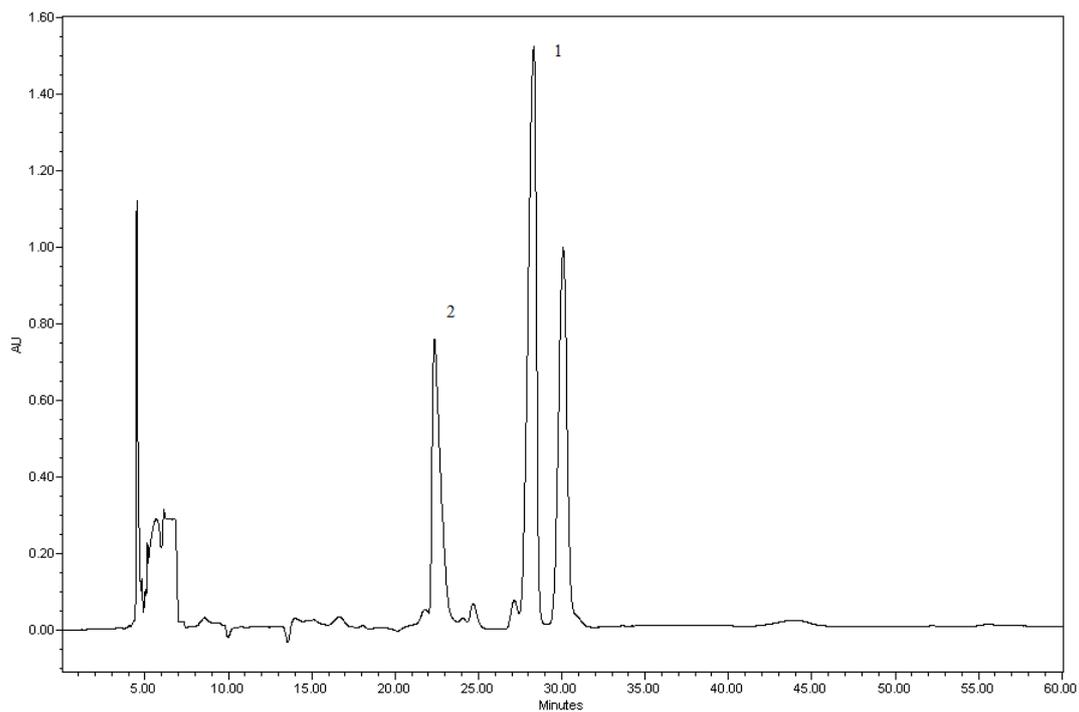


Figura 34. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo de fruto de *D. lanosa* obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20µL. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

Tabla 13. Principales alcaloides identificados por CLAE en el crudo alcaloideo de fruto de *D. lanosa*.

Alcaloides identificados	%	Tiempo de retención (min)
Escopolamina	43.29	28
Apoescopolamina	30.7	29
Atropina	23.27	22

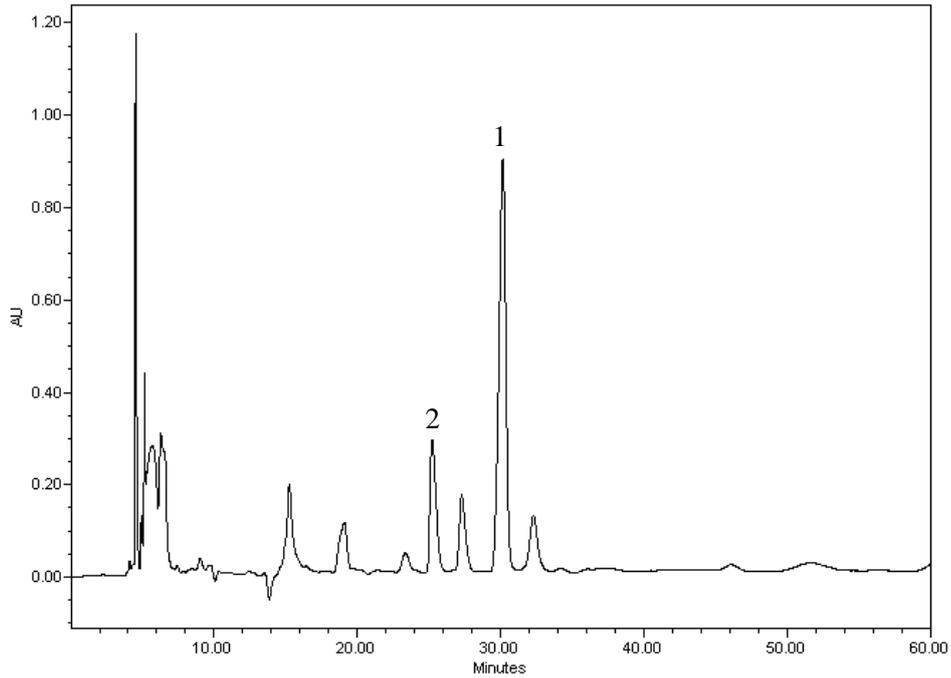


Figura 35. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo de hoja de *D. lanosa* obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20µL. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

Tabla 14. Principales alcaloides identificados por CLAE en el crudo alcaloideo de hoja de *D. lanosa*.

Alcaloides identificados	%	Tiempo de retención (min)
Escopolamina	51.88	30
Atropina	14.86	24
Apoescopolamina	8.07	32

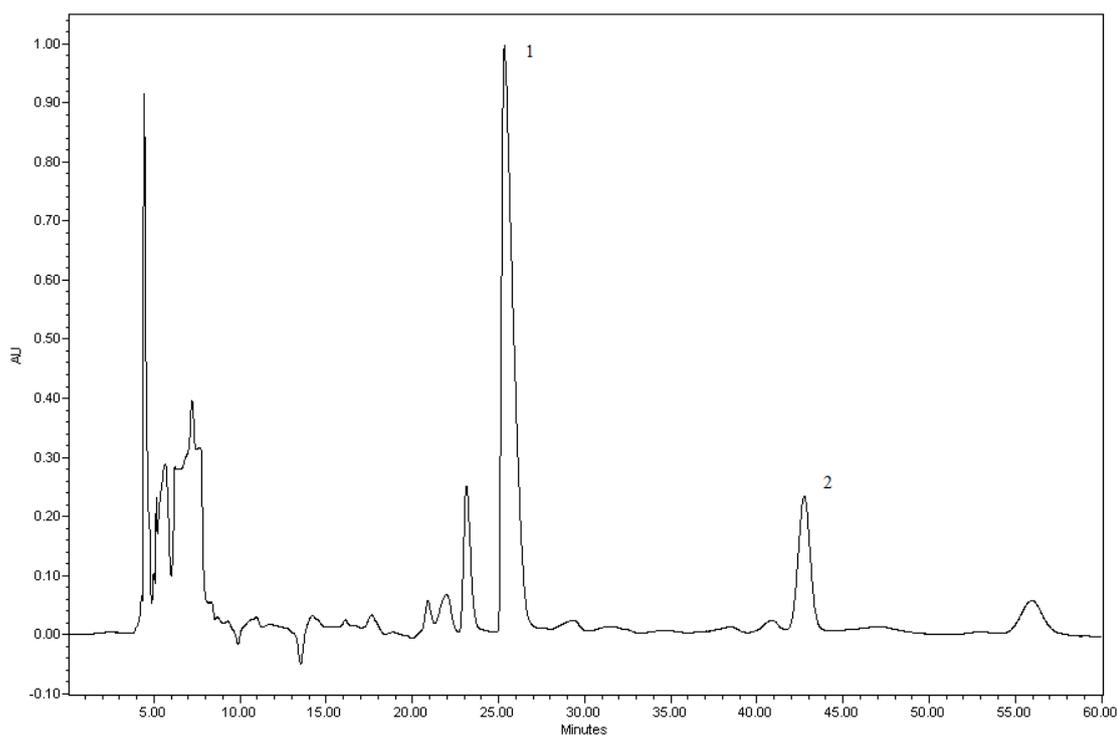


Figura 36. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo de hoja de *D. stramonium* obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20µL. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

Tabla 15. Principales alcaloides identificados por CLAE en el crudo alcaloideo de hoja de *D. stramonium*.

Alcaloides identificados	%	Tiempo de retención (min)
Atropina	63.31	25
Escopolamina	13.77	42

Con los resultados obtenidos del análisis cromatográfico mediante las técnicas anteriormente descritas, se logró la caracterización de los compuestos mayoritarios para la especie *D. lanosa*. De manera general, las cuatro partes vegetales; raíz, tallo, hoja y fruto (sin semillas), contienen como compuestos mayoritarios a la atropina y escopolamina, cuya suma representa más del 50% del crudo alcaloideo.

Para la droga cruda (hoja) de *D. lanosa*, el alcaloide mayoritario fue la escopolamina y en segundo lugar la atropina. Estos resultados contrastan con los observados en la droga cruda de *D. stramonium*, donde el alcaloide mayoritario es la atropina y en segundo lugar la escopolamina.

En resumen, los alcaloides tropánicos identificados para *D. lanosa* son **atropina, escopolamina, apoescopolamina, noratropina 3-tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano, 3-(2-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano y cuscohigrina**. Cabe destacar que los cuatro últimos alcaloides se reportan por vez primera en la especie.

6.4 Pruebas biológicas

Con base en los resultados obtenidos mediante el análisis de fuentes de información primarias y secundarias se concluyó que la parte más utilizada del toloache es la hoja, aplicado como emplasto (uso tópico) y para aliviar dolores reumáticos, musculares, aplicado sobre heridas y como desinflamatorio. A partir de estos resultados se decidió evaluar el efecto antinociceptivo del extracto íntegro, la fase neutra y el crudo alcaloideo de hojas de *D. lanosa*. Para tal efecto, se realizaron los ensayos de estiramiento abdominal y placa caliente descritos en la literatura (Palacios Espinosa *et al*; 2008). También se evaluó el efecto antimicrobiano mediante el ensayo de placa en agar con una batería de microorganismos representativos Gram positivos y Gram negativos.

6.4.1 Efecto antimicrobiano

Los resultados de la evaluación del potencial antimicrobiano de *D. lanosa* contra una batería de microorganismos demostraron que el extracto de *D. lanosa* inhibe el crecimiento de las cepas Gram positivas. En el caso de *S. aureus* el efecto se registró a partir de la concentración de 250 µg/µl. Para *B. subtilis* a partir de 500µg/µl.

6.4.2 Determinación del potencial antinociceptivo

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 de los compuestos para contrarrestar la irritación

que causa la administración de una solución diluida de ácido acético (0.6 % v/v) en ratones. La administración intraperitoneal (i.p.) 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 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).

Para complementar la evaluación del potencial antinociceptivo el extracto total, crudo alcaloideo y fase neutra, se evaluaron con el ensayo de placa caliente. Este modelo se seleccionó para investigar la actividad antinociceptiva potencial a nivel central de los diferentes tratamientos.

El ensayo de placa caliente es altamente sensible a analgésicos fuertes y su implementación ocasiona poco daño a los animales de experimentación. La aplicación de un estímulo térmico a los 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).

6.4.2.1 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos de hoja mediante el método de estiramiento abdominal

Los resultados demuestran que el extracto total presenta un comportamiento dosis dependiente y el mejor efecto antinociceptivo en el modelo de estiramiento abdominal se obtuvo con la dosis de 316 mg/kg. En cuanto a la fase neutra y crudo alcaloideo, no se observó una disminución significativa del número de estiramientos bajo el efecto de ninguna de las tres dosis evaluadas (Figura 37).

De acuerdo a los resultados, es altamente probable que el mejor efecto del extracto íntegro se deba a un efecto sinérgico antinociceptivo de los componentes de la

fase neutra y del crudo alcaloideo. Otra posibilidad es que los componentes de las distintas fases favorezcan la absorción o la biodisponibilidad de los ingredientes activos presentes en el extracto íntegro (Blumenthal, 2003). En cualquier caso, es indudable que el extracto presenta un efecto de aliviar el dolor por inflamación; congruente con el uso popular de la especie para el tratamiento de dolores musculares y reumáticos.

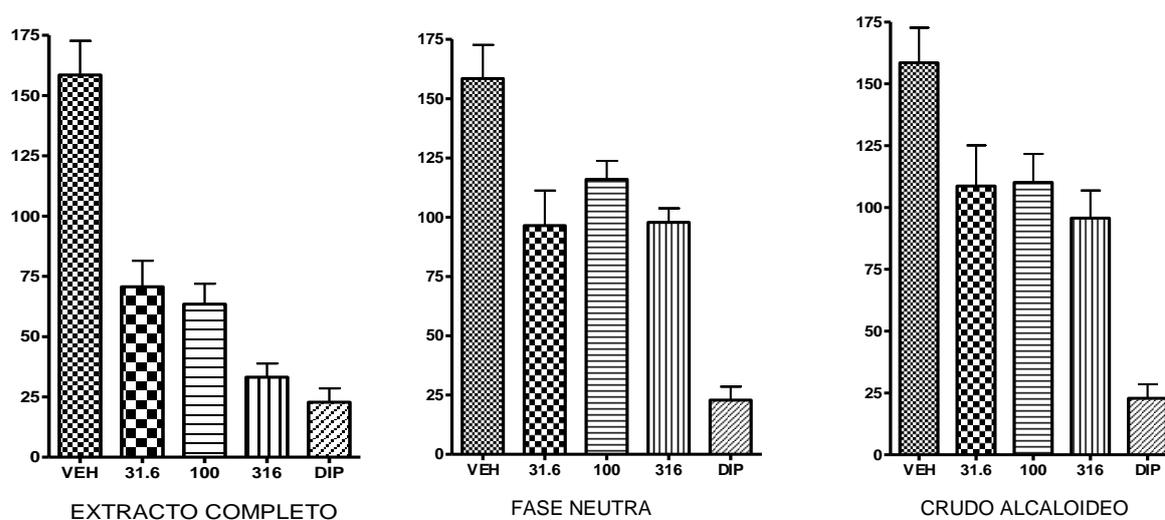


Figura 37. Efecto antinociceptivo de extracto total, fase neutra y crudo alcaloideo de hoja de *D. lanosa* en el modelo de estiramiento abdominal. Cada barra es la media \pm E. E. de 8 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina (VEH) y Dipirona (DIP) fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet * $P < 0.5$.

6.4.2.2 Determinación del potencial antinociceptivo de los extractos mediante el ensayo de placa caliente en ratones

Los resultados del ensayo en placa caliente demuestran que para el extracto total, hay un efecto antinociceptivo a partir de la dosis de 31.6mg/kg y la mejor respuesta se obtiene a partir de la dosis de 100mg/kg. En el caso de la fase neutra no observamos un efecto antinociceptivo, ya que no hay diferencia significativa de ninguna de las tres dosis evaluadas con respecto a la solución salina (VEH). Con el crudo alcaloideo observamos que con la dosis más baja de 31.6 mg/kg se incrementa la latencia de respuesta al estímulo de calor, con respecto a la solución salina; sin embargo con las dosis de 100mg/kg y 316mg/kg no hay un incremento significativo en la latencia de respuesta, con respecto a la solución salina (Figura 38).

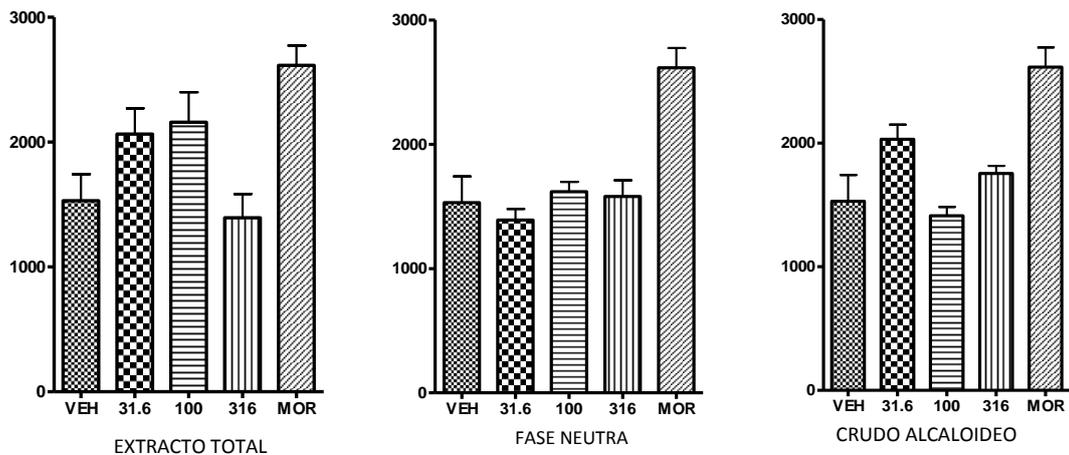


Figura 38. Efecto antinociceptivo del extracto total, fase neutra y crudo alcaloideo de hoja de *D. lanosa* en el modelo de placa caliente. Cada barra es la media \pm E. E. de 8 animales. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control de solución salina (VEH) y morfina (MOR) fueron determinadas por un análisis ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet * $P < 0.5$.

Cabe mencionar que en la literatura, se reporta un efecto analgésico de la atropina con dosis de 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administrada vía intraperitoneal (i.p) y subcutánea (s.c) en los modelos de placa caliente, estiramiento abdominal y tail flick. Mientras que a la dosis de 5mg/kg administrada por las mismas vías se observó un efecto de hiperalgesia (Gheraldini *et al*; 1990).

Pinardi y colaboradores reportan que la administración de sulfato de atropina a dosis de 1mg/kg vía intraperitoneal (i.p), revierte el efecto analgésico de diferentes drogas antiinflamatorias no esteroideas en el modelo de placa caliente, para el cual consideran dos variables de respuesta. La primera de ellas considera como respuesta el hecho de que los ratones solo laman sus patas traseras al estímulo de calor, y la segunda es que laman sus patas traseras y que den un salto.

De nueva cuenta el mejor efecto antinociceptivo se obtuvo con el extracto total en dosis de 31.6mg/kg y 100mg/kg. Este resultado puede deberse a las mismas causas indicadas en el modelo de estiramiento abdominal. El hecho de que el efecto no sea dosis dependiente, puede deberse a un fenómeno de hormesis (Palacios-Espinosa, 2009).

6.4.3 Evaluación de Toxicidad

6.4.3.1 Determinación de la toxicidad aguda según Lorke

Para determinar la DL_{50} se realizó la evaluación en ratones ICR según el método de Lorke (1983). Este es un método nos permite identificar compuestos tóxicos al administrarlos bajo un tratamiento agudo (una sola administración).

La DL_{50} calculada por este método se encuentra por arriba de 5000mg/kg. Sin embargo a las 24 horas de la administración de los extractos, los ratones presentaron trastornos de comportamiento. Esta alteración, desapareció 48 horas después de la administración de los extractos. De igual manera, bajo una inspección ocular superficial de los órganos internos, al cabo del experimento, se observó que el hígado, los pulmones y los riñones presentaban una tonalidad más oscura que en los órganos de los ratones control. A pesar de que la planta se considera no tóxica de acuerdo a los criterios de Lorke, el daño macroscópico observado en los órganos, indica que el consumo por vía oral de la planta, debe considerarse con suma precaución. Cabe resaltar que esto aplica solo para el extracto total de hoja que es la parte más utilizada en la medicina tradicional y nos indica que su uso tópico no representa un peligro potencial de muerte por de toxicidad.

Sin embargo, en nuestro estudio no se analizaron las semillas, que son la parte que contiene la mayor cantidad de alcaloides tropánicos, de modo que se cumplió con el establecimiento de los parámetros de seguridad, únicamente para hojas y bajo los criterios de Lorke lo cual no quiere decir que no exista un efecto tóxico sobre el organismo.

6.4.3.2 Bioensayo con *Artemia salina*

Con la finalidad de establecer un parámetro adicional de toxicidad se llevó a cabo el ensayo de toxicidad para el crustáceo *Artemia salina*. El estudio de los compuestos activos obtenidos a base de plantas y diversos extractos, se ve retrasado en muchos casos por la falta de pruebas ensayos adecuados, rápidos y simples. Existen algunos ensayos, los cuales implican la utilización de animales de laboratorio o el aislamiento de sus tejidos; sin embargo, pueden no ser los adecuados o ser muy costosos. Una de las respuestas biológicas básicas a monitorear es la letalidad y el criterio es simple; el tratamiento produce muerte o no, que es una respuesta cuantil. La

evaluación de la toxicidad aguda en el modelo de *A. salina* es sencilla, no requiere gran especialización para llevarla a cabo y es un criterio básico en el estudio de compuestos activos (Wah, 1993).

Las concentraciones de los diferentes extractos de las hojas (extracto total, fase neutra y crudo alcaloideo) y planta completa que se ensayaron en la prueba de *A. salina* fueron 10µg/mL, 100µg/mL y 1000µg/mL. Se calculó la CL₅₀ para cada extracto y los resultados se muestran en la tabla 16. De los mismos se desprende que todos los extractos son tóxicos ya que las concentraciones letales medias son menores a 100µg/ml.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Lagarto y colaboradores (2001), quienes encontraron una excelente correlación entre la prueba de *A. salina in vitro* y los resultados de estudios de toxicidad aguda *in vivo* en ratones. Los autores encontraron que el extracto íntegro de la especie relacionada *D. stramonium* presentaba una concentración letal media de 12.86µg/mL para el crustáceo *A. salina* y una DL₅₀ de 0.821g/kg, determinada en ratones.

Cabe mencionar que Lagarto *et al.* (2001) propusieron que el ensayo de *A. salina* era una herramienta adecuada para predecir la toxicidad aguda en extractos de plantas. Sin embargo las diferencias de concentraciones letales medias para el crustáceo *A. salina* de los extractos de las especies analizadas, es muy pequeña y las diferencias entre las dosis letales medias (ensayos *in vivo*) es mayor. Por otra parte el coeficiente de correlación, determinado por la prueba de Spearman, entre ambos parámetros es bajo (r= 0.85).

Tabla 16. CL₅₀ para las diferentes partes vegetales evaluadas.

<i>Parte vegetal</i>	<i>Extractos evaluados</i>	CL ₅₀
Planta completa	Extracto total	0.39ppm
	Extracto total	0.44ppm
Hoja	Fase Neutra	0.34ppm
	Crudo Alcaloideo	0.39ppm

Lagarto Parra y colaboradores (1995) evaluaron la toxicidad de varias especies vegetales medicinales, entre ellas *D. stramonium*. Estos autores reportan una CL₅₀ de 12.86 ppm para el extracto de las hojas.

7 Conclusiones

-Se logró la complementación de una importante base de datos sobre el uso e identificación de la especie *D. lanosa*, distribuída al norte de México.

-En lo que respecta a las pruebas de identidad botánica de la especie *D. lanosa*, se describen por primera vez las características anatómicas e histológicas de la hoja. Se observó una gran densidad de tricomas no glandulares uniseriados pluricelulares, la presencia de tricomas glandulares, espacios intercelulares en parénquima esponjoso y la presencia de estomas mesógenos anisocíticos.

-En cuanto a las pruebas de identidad química, se logró la caracterización de los compuestos mayoritarios del crudo alcaloideo de las distintas partes vegetales. Para la droga cruda (hoja) de *D. lanosa*, el alcaloide tropánico mayoritario fue la escopolamina y en segundo lugar la atropina. De manera general, las cuatro partes vegetales; raíz, tallo, hoja y fruto (sin semillas), contienen como compuestos mayoritarios a la atropina y escopolamina, que en suma representan más del 50% del crudo alcaloideo.

-Los alcaloides tropánicos identificados para *D. lanosa* son **atropina, escopolamina, apoescopolamina y noratropina 3-tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano, 3-(2-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano y cuscohigrina**. Los cuatro últimos se reportan por primera vez para la especie.

-Se comprobó el efecto antinociceptivo del extracto total de la droga cruda de *D. lanosa* lo que respalda su uso médico popular para el tratamiento de dolores musculares, reumáticos y como desinflamatorio.

-Se establecieron algunos parámetros de seguridad para lo cual se reporta la DL_{50} del extracto total de la droga cruda se encuentra por arriba de 5g/kg.

-Finalmente se logró el establecimiento de algunos parámetros de eficacia, seguridad, identidad botánica y química de la especie *D. lanosa*, que sirvan como base y antecedente para la elaboración de su monografía tipo OMS.

-Se logró el establecimiento de un método analítico por CLAE de utilidad para el futuro desarrollo y validación de un procedimiento que permita la cuantificación a los componentes mayoritarios presentes en la especie *D. lanosa*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argueta, A.V., Cano, L. M., y Rodarte, M. E. Editores (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Bauer, R. (1999). Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drugs standard be achieved? *Drug Information Journal*. **32**, 101-110.
- Berkov, S. (2003) Comparison of tropane alkaloid spectra Between *Datura innoxia* grown in Egypt and Bulgaria. *Z. Naturforsch.* **59c**, 184-186.
- Bessis, J. & Guyot, M. (1991). An attempt to use stomatal characters in systematic and phylogenetic studies of the Solanaceae.
- Blossey, E. Budzikiewicz, H., Ohashi, M, Fodor, G. and Djerassi, C. (1964). *Tetrahedron*. **20**, 585-595.
- Blumenthal, L. (editor) (2003). The ABC clinical guide to herbs. Austin: American Botanical Council.
- Bye, R. 1986. *Datura lanosa*, a new species of *Datura* from México. *Phytologia*. **61** 204-206.
- Bye, R., Mata, R., Pimentel, J. (1991). Botany, ethnobotany and chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in México. Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. **61**, 21-42.
- Caballero, J. (1998). Dendrología y Botanología Americana o Tractado de los árboles y hiebas de la América. Biblioteca Francisco de Burgoa, Amigos de Oaxaca, Banamex.
- Cannell, R. J. P. (1998). *Natural Products Isolation*. Human Press, Nueva York, 473p.
- Cañigüeral, F. S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*. Cataluña. España. **2** (2), 101-121.
- 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.
- 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.
- Dewick, P.M. (2009). Third Edition. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Wiley, United Kingdom.
- Doncheva, T., Berkov, S. and Philipov, S. (2006). *Biochemical Systematics and Ecology*. **34**, 478-488.

- Dragër, B. (2002). Review. A nalysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography. A.* 978, 1–35.
- Dragër, B. (2006). Review. Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry.* **67**, 327–337.
- Fliniaux, M., Manceau, F., Dubreuil, A. (2003). Simultaneous análisis of *l*.scopolamine and *dl*-tropic acid in plant material by reversed.phase high-performance liquid chromatography. Short communication. *Journal of Chromatography.* **644**, 193-197.
- Friedman, M. y Levin, E. C. (1989). Composition of Jimson Weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **37**, 998-1005.
- Gaedcke, F., B. Steinhoff, and H. Blasius. (2003). Herbal Medicinal Products: scientific and regulatory basis for development, quality assurance and marketing authorization. Boca Raton, FL: CRC Press. 177 p.
- Gontier, E., Fliniaux, M. A., Barbotin, J. N. y Sangwan-Norreel, B. S. (1993). Tropane alkaloid levels in the leaves of micropropagated *Datura innoxia* plants. *Planta Medica.* **59**, 432-435.
- Griffin, J. W. y Lin, D. G. (2000). Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry.* **53**, 623-637.
- Guerrero-Analco, J.A., Hersch-Martinez, 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.
- Ionkova, I., Witte, L., y Alfermann, W. (1994). Spectrum of tropane alkaloids in transformed roots of *Datura innoxia* and *Hyoscyamus xgyörffy* cultivated *in vitro*. *Planta Medica.* **60**, 382-383.
- Jiao, M., Luna-Cavazos, M., Bye, R. (2002). Allozyme variation in Mexican species and clasification of *Datura* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution.* **232**, 155-166.
- Kursinszki, L., Hank, H., László, E., Szoke, E. (2005). Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and atropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A.* 1091 32-39.
- Le Bars, D., Gozariu, M., y Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews.* **53**, 597–652.

- Linares, E., R. Bye (1987) A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. **19**, 153-183.
- Lopez, C., Marquez, J., Murguía, G. (2005). *Técnicas para el estudio en angiospermas: libro de laboratorio*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 178pp.
- Lorke, D. (1983). A new approach to partial acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*. **54**, 275-287.
- Mandal, A., Navqvi, A. and Thakur, R. (1991). Simultaneous determination of atropine and scopolamine in plants by mixed-column High Performance Liquid Chromatography.
- Martínez. Plantas Medicinales.
- Mociño, J.M. (1802). Extracto del discurso que dixo D. Joseph Mariano Mociño en la apertura de las lecciones de botánica en México. *Anales de Historia Natural 1799-1804:Tomo III, Número 15*. Comisión Interministerial de ciencia y Tecnología. 288-296.
- Mata R., Camacho, M. R., Cervera, E., Bye, R., Linares, E. (1990). Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry*. **29**, 2037-2040 y referencias allí citadas.
- Mata, R., Rivero-Cruz, J.F., Chavez, D. (2001). Bioactive Secondary Metabolites From Selected Mexican Medicinal Plants: *Recent Progress*. In *Bioactive Compounds From Natural Sources*. (C. Tringalli, Ed.), Taylor & Francis, Londres 129-158.
- Metcalf, C. R., Chalk, L. (1988-1989). *Anatomy of dicotyledons: Leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon.
- Mroczek, T., Glowniak, K., Kowalska, J. (2006). Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. *Journal of Chromatography*. **A**, 1107, 9-18.
- 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.
- O'Gorman H. (1963). *Plantas y flores de México*. UNAM. Dirección general de publicaciones, México. Primera edición en español.
- Plank, K. and Wagner G. (1986). Determination of hyoscyamine and scopolamine in *Datura innoxia* plants by High Performance Liquid Chromatography. *Z. Naturforsch.* **41c**, 391-395.
- Palacios, F. (2008). Antinociceptive, hypoglycemic and spasmodic effects of *Brickellia veronicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. **118** (3) 448-454.

- Palacios, F. (2009). Pruebas selectas de identidad, eficacia y composición de *Brickellia cavanillesii* (Cass) A. Gray y *B. Veronicifolia* (kunth) A. Gray (Asteraceae). Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
- Roddick, J. (1991). 2 *The importance of the Solanaceae in Medicine and drug therapy*. The biology and taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, C. and Lester, N. Editors. Publishment for the Linnean Society of London by Academic Press. 1979. New York.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R, Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **31**, 838-389.
- Sahagún, B. (1540-1585) 1998. *Historia general de las cosas de la nueva España: primera versión íntegra del texto castellano del manuscrito conocido como Códice Florentino*. Introducción, glosario y notas de Alfredo López Austin y Josefina García Quintana. Alianza Editorial España.
- San Martín R. (1977). Tratado de Farmacognosia. Ed. Científico Médica. 58-80.
- Schultes R., Hofmann, A. (1982). Plantas de los dioses. Las fuerzas mágicas de las plantas alucinógenas. Fondo de cultura Económica. México. 1982.
- Seithe, A. (1979). *Hair types as taxonomic characters in Solanum*. En: The biology and taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, C. and Lester, N. Editors. Publishment for the Linnean Society of London by Academic Press. 1979. New York.
- Shimomura, K., Sauerwein, M. e Ishimaru, K. (1991). Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of Solanaceous plants. *Phytochemistry*. **30**, 2275-2278.
- Singh, G. (2004). Plant Systematics. An integrated Approach. Science Publishers, Inc. 475.
- Symon & Haegi. (1991). 12. *Datura*. (*Solanaceae*) is a New World Genus. The biology and taxonomy of the Solanaceae. Hawkes, C. and Lester, N. Editors. Publishment for the Linnean Society of London by Academic Press. 1979. New York.
- Timmerman, H. (1927). *Pharmaceutical Journal and Pharmacist*. 118 (4th. Series, Vol. 64) 735-748.
- Wah, T. (1993). Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. *Bioactive Natural Products*. 441-457.

-World Health Organization (1993). WHO *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*. Regional Office for the Western Pacific, Manila.

-World Health Organization (1998). WHO *Quality control methods for medicinal plant materials*. WHO, Geneva.

-World Health Organization (1999). WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 1. WHO, Geneva.

-World Health Organization (2002a). WHO *Monographs on selected medicinal plants*. Volume 2. WHO, Geneva.

-World Health Organization (2002b). WHO *Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. WHO, Geneva.

APENDICE A

Escopolamina

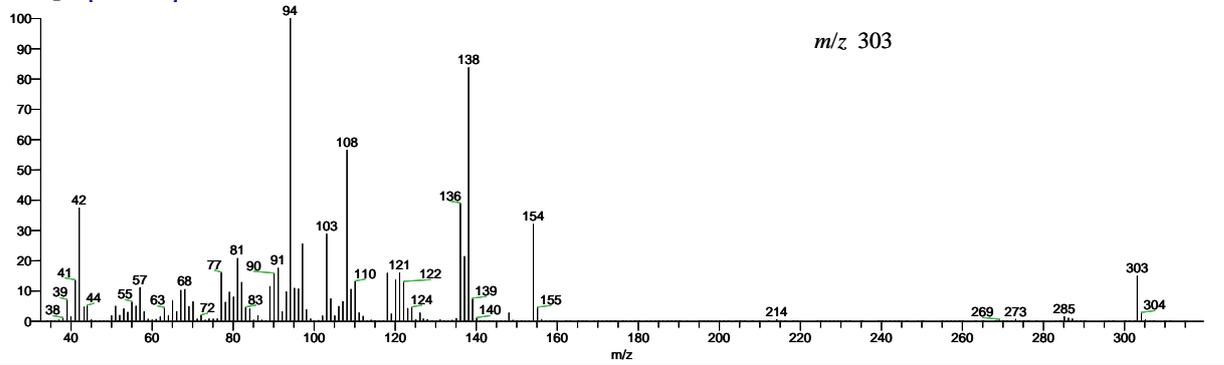


Figura 1. Cromatograma de CG/EM-IE. Fragmentos característicos para la escopolamina.

3-tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano

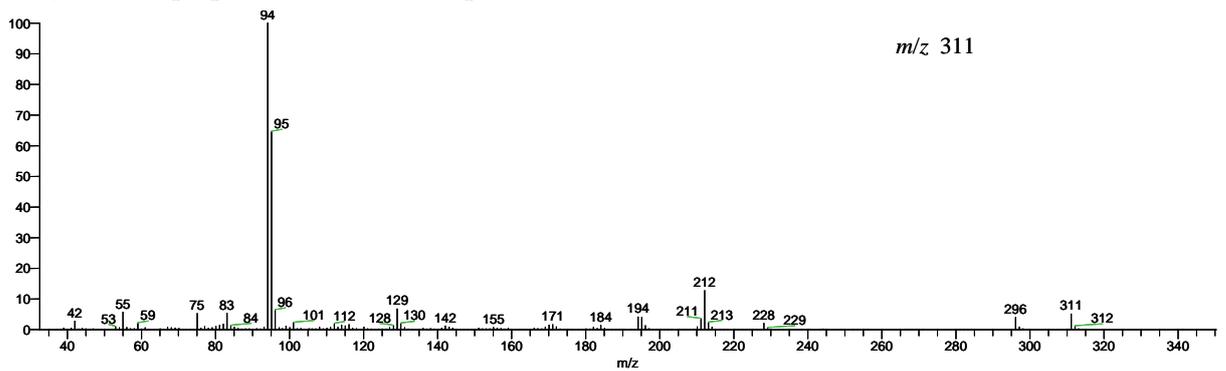


Figura 2. Cromatograma de CG/EM-IE. Fragmentos característicos para el 3-tigloiloxi-6-propioniloxi-7-hidroxitropano.

3-(2-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano

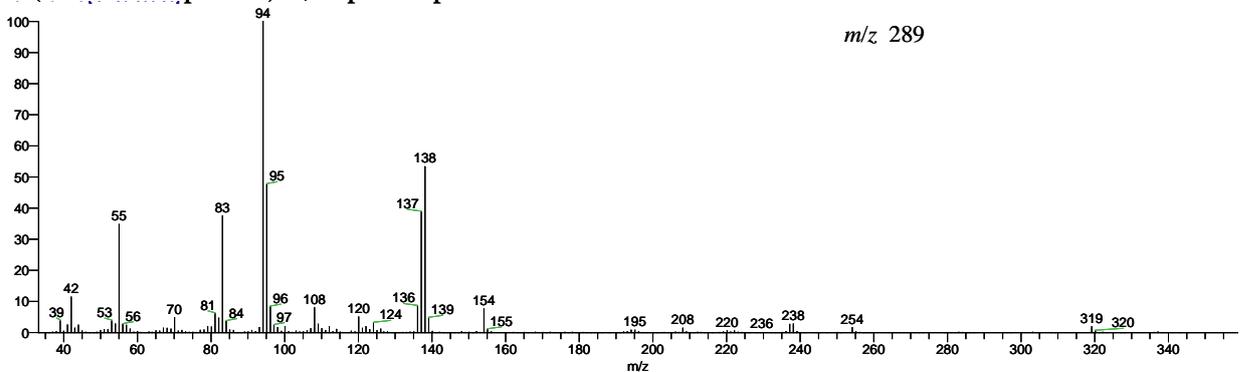


Figura 3. Cromatograma de CG/EM-IE. Fragmentos característicos para el 3-(2-hidroxitropoiloxi)-6,7-epoxitropano.

Norhiosciamina

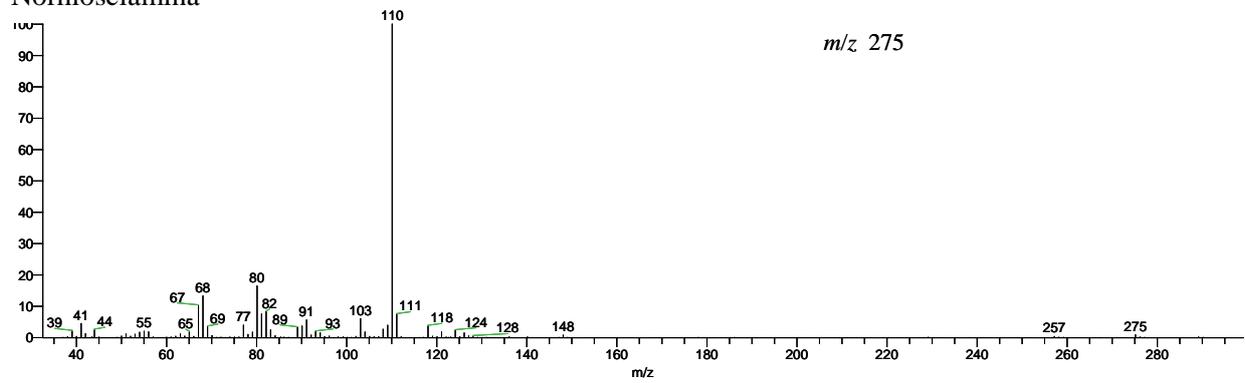


Figura 4. Cromatograma de CG/EM-IE. Fragmentos característicos para la norhiosciamina.

Cuscohigrina

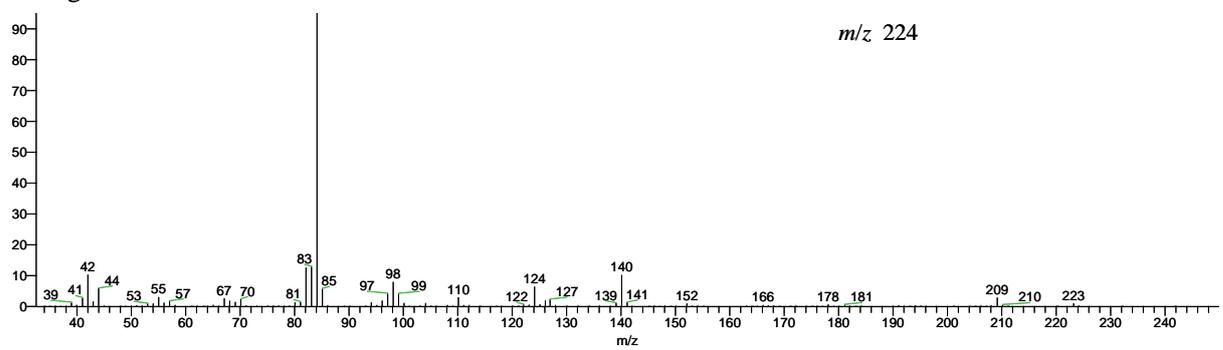


Figura 5. Cromatograma de CG/EM-IE. Fragmentos característicos para la cuscohigrina.

APENDICE B

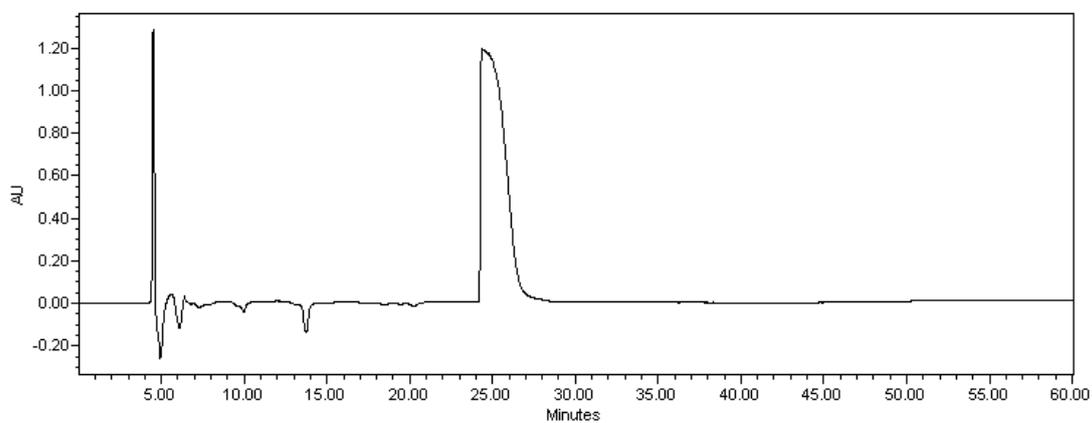


Figura 6. Perfil cromatográfico del estándar de atropina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

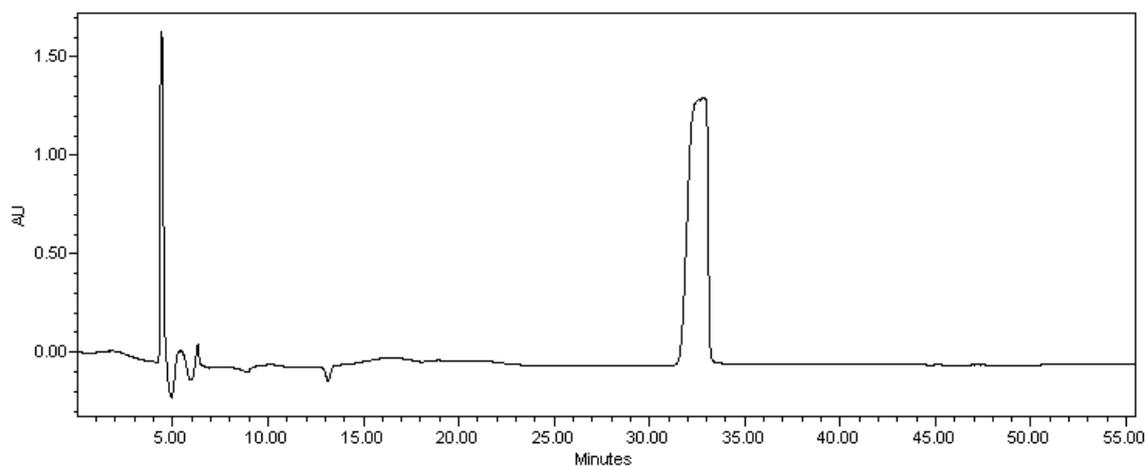


Figura 7. Perfil cromatográfico del estándar de escopolamina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

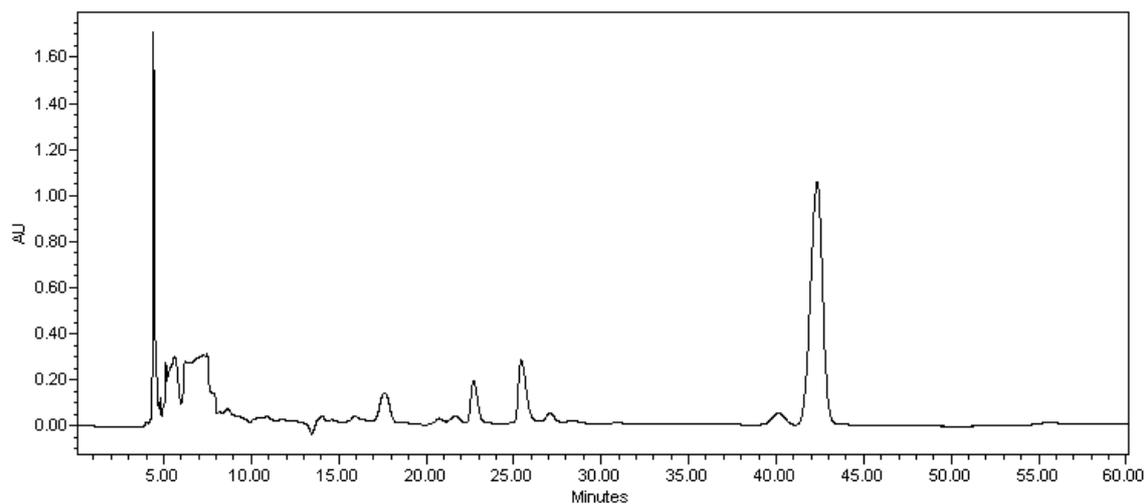


Figura 7. Perfil cromatográfico del Crudo alcaloide de hoja de *D. lanosa* enriquecido con el estándar escopolamina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

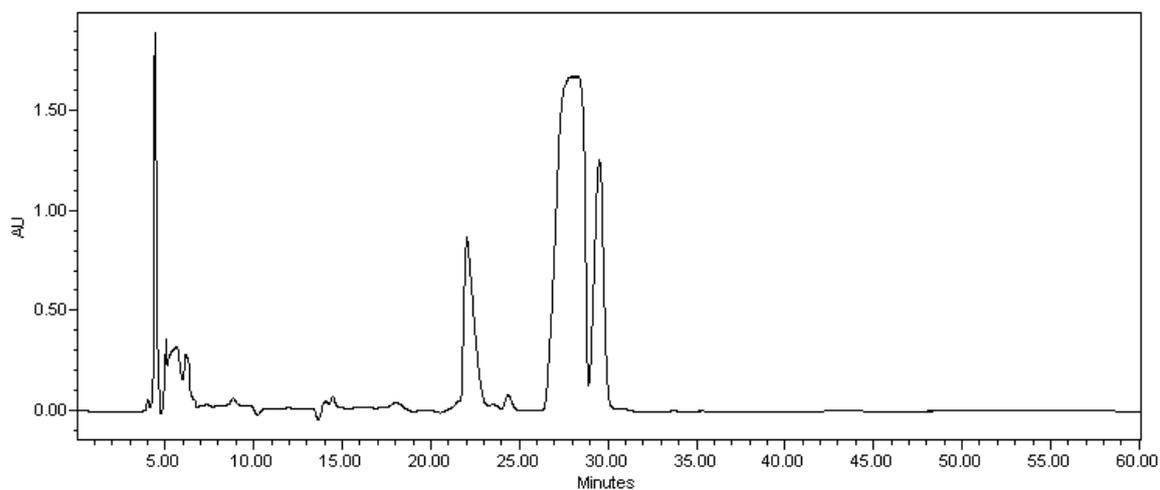


Figura 7. Perfil cromatográfico del Crudo alcaloide de fruto de *D. lanosa* enriquecido con el estándar escopolamina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

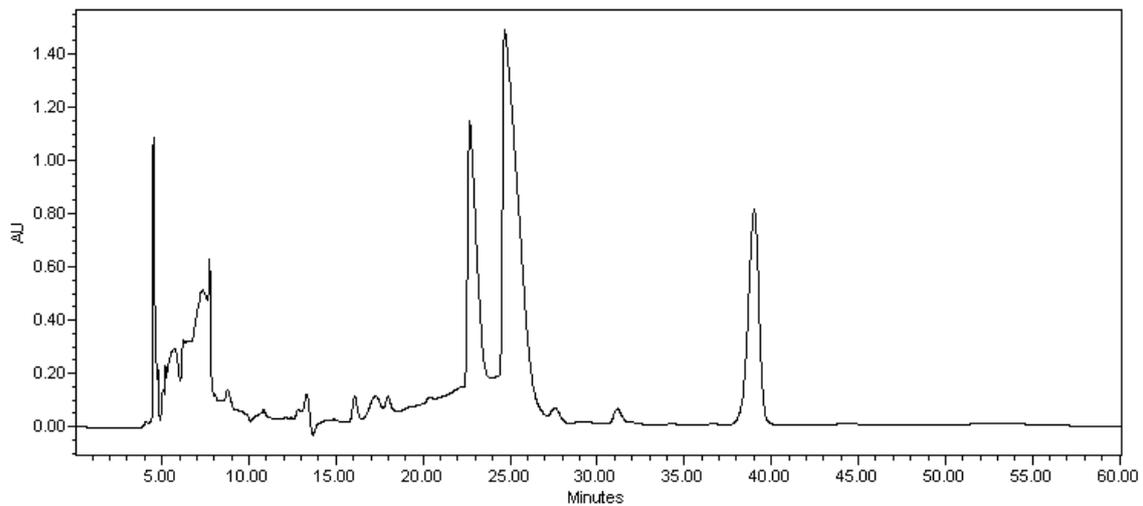


Figura 7. Perfil cromatográfico del Crudo alcaloideo de raíz de *D. lanosa* enriquecido con el estándar atropina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

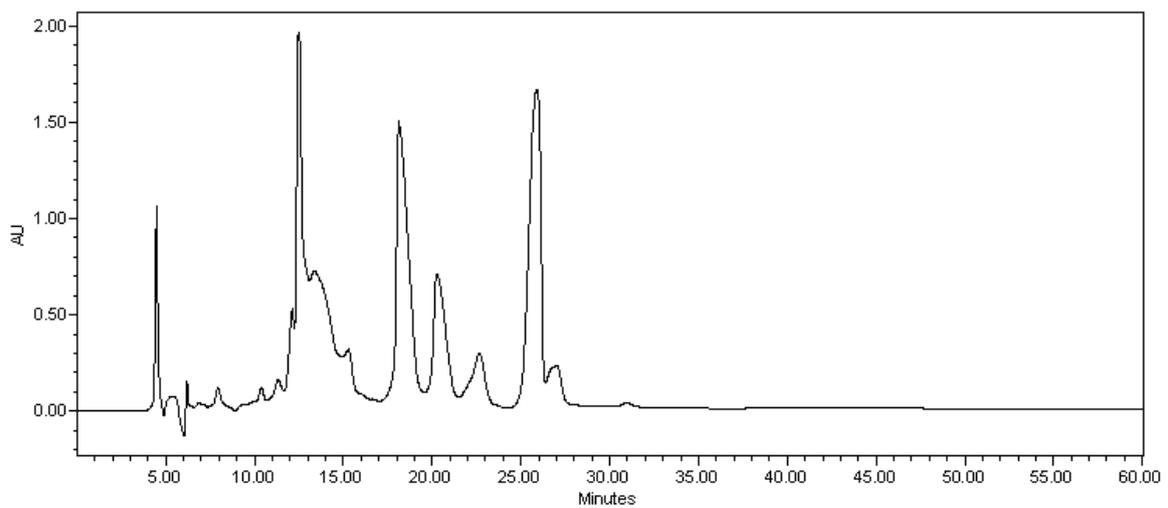


Figura 7. Perfil cromatográfico del crudo alcaloideo de tallo de *D. lanosa* enriquecido con el estándar atropina, obtenido por CLAE analizado en una columna de fase reversa C18. Fase móvil MeOH /Acetonitrilo /Buffer (pH 6.5). Flujo 0.6ml/min. Volumen de inyección de 0.20 μ L. Detección UV a 210 nm y temperatura ambiente.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANADEVA	Análisis de varianza
CG	Cromatografía de gases
CJ	Cuádruple de Johansen
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CL ₅₀	Concentración letal 50
CoA	Coenzima A
DL ₅₀	Dosis letal 50
DIP	Dipirona
EM	Espectrometría de masas
FAA	Formol-ácido acético-alcohol metílico
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
IE	Impacto electrónico
INI	Instituto Nacional Indigenista
i.p	Intraperitoneal
IQ	Ionización Química
kg	kilogramo
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Nanómetros
MOR	Morfina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
s.c	Subcutánea
SSI	Solución salina isotónica
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultra violeta
VIH	Virus inmunodeficiencia humana