



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**“COMPUESTOS ESPASMOLÍTICOS de *Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray  
(ASTERACEAE). UNA CONTRIBUCIÓN PARA DETERMINAR LA IDENTIDAD,  
COMPOSICIÓN Y EFICACIA DE LA DROGA CRUDA”.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Blanca Estela Rivero Cruz



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
AÑO: 2006



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.

***JURADO ASIGNADO***

Presidente:	Dr. Leovigildo Quijano
Primer vocal:	Dr. Robert Bye Buttler
Segundo vocal:	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Tercer vocal:	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Primer suplente:	Dr. David Quintanar Guerrero
Segundo suplente:	Dr. Ramón Ángeles Anguiano

***LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:***

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a la Dra. Rachel Mata Essayag por crear y hacer realidad este proyecto de investigación. Gracias de corazón por trazar el camino y conducir mis pasos con infinito cariño y paciencia hasta la culminación de esta meta.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN 212005 Y CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) C01-018.

Al CONACyT y a la DGEP por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Dr. Carlos Cerda García Rojas, investigador del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por su loable colaboración durante el desarrollo y validación del método analítico propuesto y por todo el tiempo dedicado a las demás etapas de este proyecto.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su valiosa asesoría en la determinación del efecto de los compuestos aislados sobre la actividad de la enzima PDE dependiente de calmodulina.

Al Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico, Instituto de Biología UNAM, por la realización de los estudios microscópicos de la droga cruda.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por su constante interés y sus acertados comentarios durante el desarrollo del presente trabajo y en la revisión del manuscrito de tesis.

A las Doctoras Miriam Arriaga Alba y Alejandra Rojas Molina por la realización de las evaluaciones de inocuidad y eficacia de la especie objeto de estudio.

A la M. en C. Isabel Rivero por su valiosa ayuda en varios aspectos técnicos a lo largo del desarrollo del presente trabajo de tesis.

Al personal técnico de la USAI por el registro de los espectros de masas, IR y RMN <sup>1</sup>H.

A la Lic. Mónica Espíndola Mata por su valiosa ayuda en la corrección del estilo del manuscrito de tesis.

---

**ÍNDICE**

	<b>Página</b>
<b><i>LISTA DE CUADROS</i></b>	<b>V</b>
<b><i>LISTA DE FIGURAS</i></b>	<b>VI</b>
<b><i>LISTA DE ESPECTROS</i></b>	<b>VIII</b>
<b><i>RESUMEN</i></b>	<b>IX</b>
<b><i>ABSTRACT</i></b>	<b>XII</b>
<b><i>I. INTRODUCCIÓN</i></b>	<b>1</b>
<b><i>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</i></b>	<b>9</b>
<b><i>III. ANTECEDENTES</i></b>	<b>11</b>
3.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos.	11
3.2 Estudios químicos y farmacológicos.	11
<b><i>IV. PARTE EXPERIMENTAL</i></b>	<b>16</b>
<b>4.1 MATERIAL VEGETAL</b>	<b>16</b>
<b>4.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS</b>	<b>16</b>
4.2.1 Determinación del efecto relajante de extractos, fracciones y productos puros sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.	16
4.2.1.1 Aislamiento del íleon.	16
4.2.1.2 Sistema de registro.	17
4.2.1.3 Evaluación del efecto relajante.	17
4.2.2 Efecto de los productos naturales sobre la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de calmodulina (CaM).	18

---

	<b>Página</b>
<b>4.2.3</b> Determinación de las constantes de inhibición ( $K_i$ ) de los productos naturales.	<b>19</b>
<b>4.2.4</b> Evaluación de la toxicidad aguda.	<b>19</b>
<b>4.2.5</b> Determinación del potencial mutagénico.	<b>20</b>
<b>4.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO</b>	<b>22</b>
<b>4.3.1</b> Análisis cromatográficos.	<b>22</b>
<b>4.3.2</b> Registro de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	<b>22</b>
<b>4.3.3</b> Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto espasmolítico.	<b>23</b>
<b>4.3.4</b> Aislamiento del ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico ( <b>18</b> ), el ácido 2-metoxibenzoico ( <b>19</b> ) y el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo ( <b>22</b> ).	<b>24</b>
<b>4.3.5</b> Separación de los compuestos activos presentes en las fracciones F <sub>II</sub> -5-III y F <sub>II</sub> -5-VI mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).	<b>25</b>
<b>4.3.5.1</b> Aislamiento del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis- <i>O</i> -(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> ).	<b>25</b>
<b>4.3.5.2</b> Aislamiento del $\beta$ -D-glucopiranosido del 4-alil-2-metoxifenilo ( <b>20</b> ) y del 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>23</b> ).	<b>26</b>
<b>4.3.6</b> Fraccionamiento secundario de la fracción activa F <sub>I</sub> .	<b>27</b>
<b>4.3.6.1</b> Separación mediante CLAE de los compuestos presentes en las fracciones secundarias F <sub>I</sub> -1, F <sub>I</sub> -12 y F <sub>I</sub> -15.	<b>28</b>
<b>4.3.6.2</b> Aislamiento del acetato de taraxasterilo ( <b>31</b> ) y del 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo ( <b>30</b> ).	<b>30</b>

---

	<b>Página</b>
<b>4.4 PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. veronicaefolia</i>.</b>	<b>31</b>
<b>4.4.1</b> Aislamiento del camazuleno ( <b>32</b> ) y del germacrano D ( <b>33</b> ), a partir de la esencia.	<b>31</b>
<b>4.4.2</b> Cuantificación de los componentes presentes en la esencia.	<b>31</b>
<b>4.4.3</b> Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.	<b>32</b>
<b>4.4.3.1</b> Linealidad.	<b>32</b>
<b>4.4.3.2</b> Exactitud.	<b>33</b>
<b>4.4.3.3</b> Precisión.	<b>33</b>
<b>4.5</b> Hidrólisis básica del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-O-(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> ).	<b>33</b>
<b>4.6</b> Obtención del derivado metilado del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo ( <b>22</b> ).	<b>34</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b> Pruebas de eficacia e inocuidad de preparados de <i>B. veronicaefolia</i> .	<b>35</b>
<b>5.2</b> Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el extracto y aceite esencial.	<b>38</b>
<b>5.2.1</b> Caracterización estructural de los productos naturales novedosos.	<b>40</b>
<b>5.2.2</b> Composición química de la esencia de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>52</b>
<b>5.3</b> Evaluación del potencial espasmolítico de los metabolitos secundarios.	<b>54</b>
<b>5.4</b> Establecimiento de las pruebas de control de calidad de la droga cruda.	<b>61</b>

---

	<b>Página</b>
<b>5.4.1</b> Pruebas de Identidad.	<b>62</b>
<b>5.4.1.1</b> Características microscópicas de la droga cruda.	<b>63</b>
<b>5.5</b> Establecimiento de los compuestos marcadores y perfiles cromatográficos y espectroscópicos del aceite esencial.	<b>69</b>
<b>5.5.1</b> Linealidad del método.	<b>76</b>
<b>5.5.2</b> Exactitud del método.	<b>79</b>
 <b>VI. CONCLUSIONES</b>	 <b>81</b>
 <b>VII. PERSPECTIVAS</b>	 <b>85</b>
 <b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>86</b>
 <b>IX. APÉNDICE I</b> Monografía tipo OMS de <i>Angelica sinensis</i> (Apiaceae).	 <b>92</b>
 <b>X. APÉNDICE II</b> Monografía tipo OMS de plantas medicinales de México I. <i>Brickellia veronicaefolia</i> (Kunth) Gray Asteraceae. Eficacia, seguridad y métodos de control de calidad.	 <b>102</b>
 Smooth muscle relaxant action of benzyl benzoates and salicylic acid derivatives from <i>Brickellia veronicaefolia</i> on isolated guinea-pig ileum.	 <b>122</b>

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Características de las cepas de referencia utilizadas para los diferentes ensayos.	<b>21</b>
<b>Cuadro 2.</b> Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción espasmolítica F <sub>II</sub> .	<b>24</b>
<b>Cuadro 3.</b> Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F <sub>I</sub> .	<b>27</b>
<b>Cuadro 4.</b> Toxicidad aguda del extracto de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>36</b>
<b>Cuadro 5.</b> Desplazamientos químicos obtenidos en los espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del β-D-glucopiranosido del 1,2 bis-O-(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> ).	<b>46</b>
<b>Cuadro 6.</b> Desplazamientos químicos obtenidos en los espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del: 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo ( <b>22</b> ), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo ( <b>29</b> ) y 3'-β-D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>23</b> ).	<b>48</b>
<b>Cuadro 7.</b> Principales componentes presentes en la esencia de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>53</b>
<b>Cuadro 8.</b> Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo mostrada por los compuestos aislados a partir de la especie <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>55</b>
<b>Cuadro 9.</b> Inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina mostrada por los compuestos aislados.	<b>59</b>
<b>Cuadro 10.</b> Componentes presentes en las diferentes esencias de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>72</b>
<b>Cuadro 11.</b> Composición de los aceites esenciales de <i>B. veronicaefolia</i> .	<b>75</b>
<b>Cuadro 12.</b> Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.	<b>77</b>
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de variancia para la regresión lineal simple (datos para <b>24</b> ).	<b>78</b>
<b>Cuadro 14.</b> Análisis de variancia para la regresión lineal simple (datos para <b>36</b> ).	<b>78</b>
<b>Cuadro 15.</b> Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método (datos para <b>24</b> ).	<b>79</b>
<b>Cuadro 16.</b> Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método (datos para <b>36</b> ).	<b>80</b>

## LISTA DE ESPECTROS

		Página
<b>Espectro 1.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis- <i>O</i> -(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> , en $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	43
<b>Espectro 2.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis- <i>O</i> -(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> , en $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	44
<b>Espectro 3.</b>	Vista parcial del espectro HMBC del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis- <i>O</i> -(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> ).	44
<b>Espectro 4.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ NOESY del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis- <i>O</i> -(2-metoxibenzoilo) ( <b>21</b> ).	45
<b>Espectro 5.</b>	Vista parcial del espectro de RMN $^1\text{H}$ del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo ( <b>22</b> , en $\text{CDCl}_3$ ).	49
<b>Espectro 6.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>23</b> , en $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	49
<b>Espectro 7.</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo ( <b>29</b> , en $\text{CDCl}_3$ ).	50
<b>Espectro 8.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo ( <b>22</b> , en $\text{CDCl}_3$ ).	50
<b>Espectro 9.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>23</b> , en $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	51
<b>Espectro 10.</b>	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo ( <b>29</b> , en $\text{CDCl}_3$ ).	51

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	12
<b>Figura 2.</b> Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto espasmolítico de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	23
<b>Figura 3.</b> Cromatograma de la fracción espasmolítica F <sub>II</sub> -5-VI.	26
<b>Figura 4.</b> Cromatograma obtenido de la fracción F <sub>I</sub> -15.	30
<b>Figura 5.</b> Cromatograma obtenido de la esencia de <i>B. veronicaefolia</i> .	32
<b>Figuras 6.</b> Efecto del extracto orgánico de <i>B. veronicaefolia</i> contra las cepas modificadas de <i>Salmonella typhimurium</i> ( <b>A</b> : cepa TA98; <b>B</b> : cepa TA100 y <b>C</b> : cepa TA102).	37
<b>Figura 7.</b> Curvas concentración respuesta del ( <b>A</b> ) extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH (1:1) y ( <b>B</b> ) la esencia de <i>B. veronicaefolia</i> .	39
<b>Figura 8.</b> Compuestos aislados de <i>B. veronicaefolia</i> .	41
<b>Figura 9.</b> Correlaciones más importantes observadas en el espectro bidimensional de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C-HMBC del compuesto <b>21</b> .	43
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i> .	52
<b>Figura 11.</b> Curvas concentración-respuesta de los productos ensayados sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.	54
<b>Figura 12.</b> Mecanismos que controlan la contracción y relajación del músculo liso intestinal.	57
<b>Figura 13.</b> Efecto de diferentes concentraciones del compuesto <b>30</b> y de la clorpromazina sobre la actividad del complejo Ca <sup>2+</sup> -CaM-PDE1.	59
<b>Figura 14.</b> Efecto de diferentes concentraciones del compuesto <b>30</b> sobre la actividad del complejo Ca <sup>2+</sup> -CaM-PDE1 en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina.	60
<b>Figura 15.</b> Vista superficial de la hoja donde se observa un acercamiento del margen y el patrón de venación.	64
<b>Figura 16.</b> ( <b>A</b> ) Tricomas glandulares uniseriados con contenidos celulares similares a lípidos. ( <b>B</b> ) Tricoma glandular globoso.	64
<b>Figura 17.</b> ( <b>A</b> ) Sección transversal del mesófilo. ( <b>B</b> ) Estomas anomocíticos con células epidérmicas adyacentes estriadas.	65
<b>Figura 18.</b> ( <b>A</b> ) Sección transversal de la vena media. ( <b>B</b> ) Haz vascular de la vena media, el xilema se observa en el extremo superior y el floema en el extremo inferior.	66

		<b>Página</b>
<b>Figura 19.</b>	(A) Tricomas glandulares de dos tipos y células epidérmicas de diferentes formas. (B) Tricoma glandular con contenidos celulares similares a cristales.	<b>67</b>
<b>Figura 20.</b>	(A) Elemento de vaso con engrosamientos helicoidales. (B) Elemento de vaso con punteaduras bordeadas alternas. (C) Fibra libriforme septada. (D) Fibras cortas y angostas sin septos.	<b>68</b>
<b>Figura 21.</b>	Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i> (Lotes II y III).	<b>70</b>
<b>Figura 22.</b>	Cromatograma de gases del aceite esencial de <i>B. veronicaefolia</i> (Lotes IV y V).	<b>71</b>
<b>Figura 23.</b>	Vista parcial del espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz en CDCl <sub>3</sub> ) del aceite esencial de tres diferentes lotes de <i>Brickellia veronicaefolia</i> .	<b>74</b>
<b>Figura 24.</b>	Gráficas de linealidad. <b>A.</b> Gráfica experimental para el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>24</b> ). <b>B.</b> Gráfica experimental para el β-cariofileno ( <b>36</b> ).	<b>76</b>

---

**RESUMEN**

La presente disertación describe parte de la investigación científica realizada para la elaboración de la monografía de la especie medicinal *Brickellia veronicaefolia* de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. El estudio abarcó el establecimiento de los parámetros de inocuidad, eficacia y calidad de la droga cruda derivada de *B. veronicaefolia*, una de las cien plantas más comercializadas en México. En primer lugar se determinaron los parámetros preliminares de inocuidad mediante las pruebas de genotoxicidad de Ames y toxicidad aguda de Lorke, encontrándose que el extracto íntegro de la planta no es mutagénico y su toxicidad aguda es poca de acuerdo con el criterio de Lorke.

Posteriormente, se comprobó mediante la experimentación farmacológica apropiada que el extracto íntegro y el aceite esencial de *B. veronicaefolia* poseen propiedades espasmolíticas ya que inducen la relajación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de manera dependiente de la concentración.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto espasmolítico condujo al aislamiento y la purificación de 16 metabolitos secundarios, tres de los cuales se describen por vez primera y doce son novedosos en la especie. Los compuestos aislados se caracterizaron como: ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**18**), ácido 2-metoxibenzoico (**19**),  $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**),  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-O-(2-metoxibenzoilo) (**21**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**), 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**), 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**25**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**26**), 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**27**), 2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo (**28**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), acetato de taraxasterilo (**31**), camazuleno (**32**) y germacrano D (**33**). La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

El análisis por CG-EM del aceite esencial con propiedades espasmolíticas de diferentes lotes de *B. veronicaefolia* permitió corroborar que los constituyentes mayoritarios de la esencia preparada por hidrodestilación son el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), el 2-hidroxi benzoato de 2'-metoxi bencilo (**30**), así como, los sesquiterpenoides camazuleno (**32**), germacrano D (**33**), biciclogermacrano (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**). En todos los casos el  $\beta$ -cariofileno, el germacrano D y el biciclogermacrano son los constituyentes predominantes en las esencias.

Los benzoatos de bencilo caracterizados en el presente trabajo constituyen los principios espasmolíticos más potentes de la planta. El rango de las concentraciones efectivas medias ( $CI_{50}$ ) determinadas para estos compuestos osciló entre 1.49-4.96  $\mu$ M. Su efecto es comparable al de la papaverina ( $CI_{50} = 4.23 \pm 0.68$ ), agente espasmolítico inespecífico utilizado como control positivo.

Con la finalidad de iniciar los estudios del modo de acción a nivel molecular de los principios espasmolíticos de *B. veronicaefolia* se decidió explorar su efecto sobre el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM. Los resultados generados de este estudio indicaron claramente que los compuestos **24**, **25** y **30** actúan como antagonistas competitivos de la CaM.

En relación a los parámetros de calidad, se estableció un método analítico conducente a cuantificar los principios activos presentes en la esencia utilizando la RMN  $^1H$  como técnica analítica. El método analítico propuesto para cuantificar 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), camazuleno (**32**), germacrano D (**33**), biciclogermacrano (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**) es: lineal, específico y exacto. De manera adicional, dada la reproducibilidad del método desarrollado, los espectros de RMN  $^1H$  generados durante el desarrollo del método analítico constituyen perfiles espectroscópicos de utilidad para la identificación de la especie.

Los resultados del análisis químico global permiten proponer a los compuestos 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**) como marcadores de la especie. Los análisis cromatográficos y por RMN  $^1H$  de uno de

los preparados herbolarios más comercializados de la especie indicaron que el producto, contrario a lo señalado en el marbete, no contiene *B. veronicaefolia*.

---

**ABSTRACT**

This work describes part of the research conducted to generate a scientific monograph of *Brickellia veronicaefolia* following the World Health Organization (WHO) criteria. The main goal was to establish toxicity, efficacy and quality control parameters for better assessment of the crude drug of *B. veronicaefolia*, one of the most commercialized medicinal plants in Mexico.

The Ames test showed no evidence of a mutagenic potential of a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract prepared from the aerial parts of the plant, therefore the extract showed not genotoxic effect. On the other hand, according to the Lorke method the crude extract can be regarded as poorly toxic to mice. The acute toxicity (DT<sub>50</sub>) calculated was 2852 mg/Kg.

According to a series of pharmacological experiments *in vitro*, the crude extract and the essential oil showed spasmolytic action since they inhibited the spontaneous contractions (IC<sub>50</sub> = 39.22 y 0.27 µg/mL, respectively) of the guinea-pig ileum in a concentration- dependent manner. Bioassay-guided fractionation of the active extract led to the isolation of three novel benzoic acid derivatives namely, 1,2-bis-*O*-(2-methoxybenzoyl)-β-D-glucopyranoside (**21**), 3'-hydroxybenzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**22**) and 3'-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**23**). In addition, the known compounds 2-hydroxy-6-methoxybenzoic acid (**18**), 2-methoxybenzoic acid (**19**), 4-allyl-2-methoxyphenyl-β-D-glucopyranoside (**20**), benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**24**), 3'-methoxybenzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (**25**), benzyl 2-hydroxy-6-methoxybenzoate (**26**), benzyl 2-hydroxy 5,6-dimethoxybenzoate (**27**), benzyl 2,3,6-trimethoxybenzoate (**28**), 3'-methoxybenzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**29**), 2'-hydroxybenzyl 2-methoxybenzoate (**30**), taraxasteryl acetate (**31**), chamazulene (**32**) and germacrene D (**33**) were obtained. The isolates were characterized by spectral means.

The composition of the spasmolytic essential oil of the medicinal species *B. veronicaefolia* was established by GC-MS analysis. Seven major

compounds, representing 86% of the oil, were identified; two were benzyl benzoates, namely, benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**24**) and 2'-hydroxybenzyl 2-methoxybenzoate (**30**). The remaining five were identified as the terpenoids chamazulene (**32**), germacrene D (**33**), bicyclogermacrene (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) and  $\beta$ -caryophyllene (**36**).

Benzyl benzoates were the most active constituents provoking a significant smooth muscle relaxation of the spontaneous contractions of the guinea-pig ileum with an efficacy higher than papaverine, a well known spasmolytic agent of therapeutic use. During the course of the investigation of the spasmolytic mode of action of the benzyl benzoates, it was found that they might exert their relaxatory effect by inhibiting CaM mediated processes. It was also demonstrated that compounds **24**, **25** y **30** were calmodulin antagonists.

A sensitive and accurate analysis using  $^1\text{H}$  NMR has been developed for the quantification of the major compounds in the essential oil of *B. veronicaefolia*. The method was validated using benzyl 2,6-dimethoxybenzoate (**24**) and  $\beta$ -caryophyllene (**36**), two of the active principles in the oil and successfully applied to the determination of these pharmacologically active compounds in three different batches of the oil.

NMR and TLC analyses of the essential oil prepared from this herbal mixture did not contain the compounds identified and/or quantified in the crude drug of *B. veronicaefolia*. The results of such analysis are very important because the lack of appropriate regulations have provoked that in Mexico many commercialized phytomedicines commonly consumed by people are misidentified or contain adulterants or less effective substitutes. Beyond any doubt the development of suitable methods, as the one describe in this work, will promote the rational use of Mexican traditional medicine through the development of technical guidelines and international standards in the field of herbal medicine.

## ***I. INTRODUCCIÓN***

Las plantas medicinales, que han constituido la base para procurar la salud en todo el mundo desde tiempos inmemoriales, siguen utilizándose ampliamente y tienen una importancia considerable en el mundo actual.

Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en algunas regiones del globo, en los países en vías de desarrollo, grandes sectores de la población dependen de los conocimientos de los curanderos sobre las plantas medicinales, los medicamentos herbolarios y otros recursos tradicionales para el alivio de sus enfermedades. De tal forma que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 1,500 millones de seres humanos recurren a medicinas y terapias tradicionales para la atención primaria de la salud. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público por las terapias vegetales tradicionales ha aumentado enormemente en los países industrializados, por lo tanto el uso de plantas medicinales y medicamentos herbolarios se encuentra en plena expansión, reconociéndose así el valor clínico de las plantas utilizadas en las prácticas médicas alternativas (De Smet, 1997; Hersch, 1996; Lozoya, 1993).

De acuerdo a la OMS, el auge en el consumo de productos herbolarios se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos y a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades crónicas, a menudo letales, como el cáncer o el SIDA, o de aquellas provocadas por microorganismos que han desarrollado resistencia a las terapias habituales o convencionales (Mitscher *et al.*, 2000).

El interés creciente por las plantas medicinales ha dado paso a un nuevo mercado de medicamentos elaborados con plantas completas o con sus extractos; surgiendo en el mundo industrias novedosas de medicamentos "soft" o naturales que se sustentan en métodos y conceptos farmacológicos diferentes a los utilizados por la industria farmacéutica convencional. Este tipo de medicamentos tiene una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad, tanto de las clases sociales más necesitadas como de las ricas. Este último sector encuentra a este tipo de medicina como novedosa y eficaz (Lozoya, 1993).

Ante el incremento significativo en el uso de los medicamentos herbolarios, existe un marcado interés por regular su comercio así como garantizar su eficacia, inocuidad y calidad a nivel global. Desafortunadamente, la regulación de los productos herbolarios no ha evolucionado según un modelo estructurado de control. Hay diferentes maneras en las cuales los países definen las plantas o hierbas medicinales o los productos derivados de las mismas; también, los enfoques para la autorización, el expendio, la fabricación, la comercialización y los criterios para asegurar su inocuidad, calidad y eficacia varían en las distintas regiones del mundo. Por este motivo, la OMS planteó en 1979 la necesidad de elaborar monografías específicas para cada droga vegetal, con métodos generales de control de calidad y enfatizando el impulso de las buenas prácticas de manufactura. Estas monografías incorporarían además la recopilación de datos botánicos, químicos, toxicológicos, farmacológicos y clínicos de la especie vegetal (De Smet, 2002; Hersch, 1996; OMS, 2002).

En la resolución WHA42.43 (1989), la Asamblea Mundial de la Salud instó a los estados miembros a que efectuaran una evaluación completa de sus sistemas de medicina tradicional; a realizar sistemáticamente un inventario y un estudio científico detallado de las plantas medicinales más utilizadas en las prácticas médicas tradicionales; a implantar medidas con el fin de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales; a establecer y mantener estándares adecuados de esos productos; a identificar las plantas medicinales o los medicamentos de ellas derivados, que tengan una relación eficacia/efecto-secundario satisfactoria y que, por lo cual, deben incluirse en los formularios o farmacopeas nacionales y por último a realizar estudios clínicos y preclínicos (OMS, 2002; WHO, 1999).

Los medicamentos herbolarios también han sido objeto de discusión en la Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA) desde 1986. Durante la Cuarta y la Quinta Conferencia de la ICDRA en 1986 y 1989, se llevaron a cabo talleres sobre la reglamentación de los medicamentos herbolarios de circulación internacional. Las discusiones se limitaron a la explotación comercial de las medicinas tradicionales por medio de productos rotulados de venta libre. La conclusión más relevante de esa reunión fue que la OMS establecería las normas modelo, cada una con elementos básicos de legislación y registro para los productos

herbolarios. Posteriormente, en una reunión de consulta de la OMS, en Munich, Alemania, en junio de 1991, se redactaron normas para la evaluación de los medicamentos herbolarios que fueron adoptadas para uso general durante la sexta conferencia de la ICDRA en Ottawa, en octubre de 1991. Estas normas (OMS/TRM/91.4) definen los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los medicamentos herbolarios y así ayudar a las autoridades normativas sanitarias de los países miembros de la OMS, organizaciones científicas y fabricantes a que emprendan una evaluación de la documentación que se requiere para regular tales productos. Una regla general de tal evaluación es que se debe considerar la experiencia tradicional en el uso de estos productos así como, los antecedentes médicos, históricos y etnológicos, mediante descripciones detalladas en la bibliografía médica y farmacéutica, o en las reseñas documentadas de sus aplicaciones (OMS, 2002).

Las normas publicadas en 1991 contienen además de los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la seguridad y la eficacia de los fitomedicamentos, los requisitos para su rotulación y el prospecto de información para los consumidores. Los requisitos de evaluación farmacéutica abarcan temas como identificación, formulación galénica, análisis y estabilidad. La determinación de la inocuidad debe cubrir, al menos, la experiencia documentada de estudios toxicológicos. La evaluación de la eficacia comprende la valoración del uso atribuido mediante un análisis de la bibliografía y pruebas farmacológicas que apoyen las afirmaciones de indicación. Las normas incluyen también capítulos especiales sobre productos combinados y la información para el consumidor sobre el producto. Por lo tanto, el propósito de las normas de la OMS es de facilitar el trabajo de las autoridades reguladoras, los órganos científicos y la industria en el desarrollo, la evaluación y el registro de los medicamentos herbolarios, poniendo de manifiesto los resultados científicos que podrían ser la base para la clasificación futura de estos medicamentos (OMS, 2002).

En 1994, la oficina regional de la OMS para el mediterráneo oriental publicó normas para la formulación de una política global sobre medicamentos herbolarios. Como la mayoría de la población mundial acude a consultorios médicos tradicionales para tratar afecciones del aparato digestivo, dolencias de las vías respiratorias superiores y enfermedades de las vías urinarias y

piel; es evidente la necesidad de formular políticas generales sobre la fitoterapéutica tradicional y promover la cooperación entre los estados miembros. Tales políticas servirían, entonces, para formular las reformas reglamentarias y jurídicas para asegurar una buena práctica y ampliar así la cobertura de la atención primaria de la salud, mientras se aseguran la autenticidad, la seguridad y la eficacia de estos medicamentos. De esta forma, además se lograría: el reconocimiento de la medicina tradicional como parte integrante de los sistemas nacionales de atención de salud, la cooperación entre la medicina moderna y la tradicional, la promoción del uso racional de los productos, la introducción de los sistemas de garantía de la calidad, la garantía de suministros regulares, la promoción de la investigación y la elaboración de medidas normativas. La OMS ha recomendado a los países miembros que establezcan un comité nacional de expertos, que sería la autoridad apropiada para identificar las medidas y los planes necesarios para formular una política nacional en esta esfera y, luego, preparar, dirigir y vigilar las diversas fases de su ejecución. Entre las funciones y las actividades del comité nacional de expertos deben figurar las siguientes: formular una lista nacional de los medicamentos herbolarios esenciales, preparar normas para los requisitos de registro, asesorar sobre un sistema nacional de concesión de licencias, aconsejar en cuanto a los medios para informar sobre reacciones adversas y proponer métodos apropiados de comunicación y cooperación con el Ministerio de Salud. Los criterios para la selección de las hierbas medicinales esenciales deben ser principalmente su seguridad, eficacia, necesidades en asuntos de salud y la disponibilidad de suministros continuos. Sobre la base de la lista aprobada de plantas medicinales de cada país, la política debe indicar claramente como asegurar el suministro de dichas plantas. El procedimiento de suministro debe comprender la recolección, el cultivo, la producción y la elaboración local, las importaciones y la preservación de la flora nacional. En un sistema nacional de garantía de la calidad, es preciso fijar normas y reglamentos a fin de asegurar la calidad de todas las plantas medicinales y sus preparados que están disponibles en el mercado. Las normas contienen un capítulo especial dedicado a los criterios para la investigación sobre los medicamentos herbolarios tradicionales y los criterios para su uso racional (OMS, 2002).

Las recomendaciones de la sexta reunión de la ICDRA antes mencionadas, impulsaron a

la OMS, para la elaboración de monografías farmacopeicas de los medicamentos herbolarios más utilizados, con base en las normas para la evaluación de los medicamentos herbolarios que publicó este organismo internacional en 1991. Tras un cuidadoso análisis la OMS, decidió publicar las monografías de 28 plantas. La finalidad de este documento es proporcionar información científica sobre la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de las plantas medicinales seleccionadas y así facilitar el uso adecuado de los medicamentos herbolarios; suministrar modelos para que los estados miembros de la OMS elaboren las monografías de vegetales autóctonos y facilitar el intercambio de información con otros países. Cada monografía consta de dos partes: la primera se refiere a la definición de la droga, la distribución geográfica, los análisis químicos y el aseguramiento de la calidad. La segunda parte, basada en una extensa revisión de trabajos científicos, expone los usos tradicionales, no demostrados experimentalmente, así como los datos sobre experimentación farmacológica y clínica, posibles contraindicaciones, precauciones, efectos secundarios y posología. Las 28 monografías se presentaron en la octava reunión de la ICDRA, que tuvo lugar en Bahrein en noviembre de 1996. En el año 2002, la OMS publicó un segundo volumen con 32 monografías adicionales de plantas medicinales de amplio uso en el mundo. Evidentemente, este tipo de trabajos es de utilidad para los usuarios de plantas medicinales, autoridades sanitarias, investigadores científicos y fabricantes, así como para la industria farmacéutica. En el Apéndice 1 se incluye la monografía tipo OMS de la especie *Angelica sinensis* (Apiaceae) (OMS, 2002; WHO, 1999).

A pesar de los esfuerzos de la OMS, la medicina herbolaria ha evolucionado de manera diferente en las distintas regiones del mundo. Así en la República Popular de China, por ejemplo, la medicina tradicional tiene una larga historia de más de 4,000 años. El conjunto de medicamentos naturales chinos constituye una de las fuentes más amplias y mejor documentadas, con más de 7,000 especies de plantas medicinales. La constitución de la República Popular de China estipula que la medicina moderna y la tradicional deben desarrollarse simultáneamente. Por consiguiente, desde la fundación de la República Popular de China, la medicina tradicional china se ha desarrollado en forma sostenida. Para fines de 1995, había 2,522 hospitales de medicina tradicional con un total de 276,000 camas. La mayoría de los

hospitales generales tienen un departamento dedicado a esta medicina. Hay 940 industrias destinadas a la fabricación de los productos herbolarios. En 1995, el consumo de preparados medicinales a base de plantas significó una erogación de 17,600 millones de yuanes, un aumento de un 123% con respecto a 1990. Así, la venta de medicamentos herbolarios patentados para 1993 constituyó un 24% de la venta total de medicamentos en todo el país, mientras que las ventas de materiales de plantas en bruto para decocciones constituyeron tan sólo un 9%. La Farmacopea China en su edición de 1990 incluía 784 artículos sobre los medicamentos chinos tradicionales y 509 artículos sobre los medicamentos chinos patentados. Las monografías describen la fuente o las sustancias usadas, las prescripciones, los métodos de preparación, la identificación, el examen, la extracción, los efectos y las indicaciones, así como los métodos principales de uso, la dosificación y las precauciones. Los medicamentos herbolarios en China son considerados como productos medicinales con requisitos especiales para su comercialización. Los medicamentos nuevos tienen que examinarse y aprobarse según la Ley de Administración de Medicamentos. Después de la aprobación, se le permite a la fábrica colocar el producto en el mercado. Este procedimiento refleja el respeto con que se tratan las experiencias tradicionales, mientras que se usa el conocimiento moderno científico y técnico para evaluar los efectos terapéuticos, y la calidad de los medicamentos herbolarios, contribuyendo así al uso racional de la medicina tradicional china (OMS, 2002).

En la comunidad europea, los países miembros han seguido diferentes enfoques al examinar las fitomedicinas y no existen criterios uniformes en lo referente a la evaluación de la inocuidad y la eficacia de estos productos. En 1989, se fundó la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP), cuyos objetivos principales son: establecer criterios armonizados para la evaluación de las fitomedicinas, apoyar la investigación científica y contribuir a la aceptación de la fitoterapia a nivel europeo. A la fecha la ESCOP ha publicado seis fascículos con 10 monografías cada uno. Cada monografía consta de los siguientes apartados: denominación latina e inglesa de la droga, definición de las plantas utilizadas, constituyentes principales, métodos de análisis, indicaciones terapéuticas, posología y forma de administración, precauciones, posibles interacciones, efectos sobre el embarazo y la lactancia, efectos secundarios indeseables,

sobredosis, propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas, ensayos clínicos y datos preclínicos de seguridad (Barnes, 2003a y 2003b).

Por otro lado, el uso de los medicamentos herbolarios en los Estados Unidos es menos generalizado que en la mayoría de las naciones desarrolladas. El motivo es que su distribución se ha limitado a las tiendas naturistas que son frecuentadas sólo por una pequeña proporción de la población. La mayoría de los productos naturales en los Estados Unidos están reglamentados como alimentos o suplementos dietéticos. Bajo las leyes federales, los suplementos dietéticos no necesitan la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) para su comercialización. En este sentido, las posibilidades de comercializar un producto herbolario como medicamento y de sostener que tiene efectos medicinales son escasas, debido a que la FDA no acepta pruebas bibliográficas de eficacia, sino que prefiere ensayos controlados aleatorizados como prueba (Engel y Straus, 2002; OMS, 2002).

Para asegurar la calidad, la seguridad y la eficacia de los productos medicinales, la Farmacopea Herbolaria Americana “American Herbal Pharmacopoeia® (AHP)” ha publicado folletos, textos y monografías de plantas de amplio uso en los Estados Unidos. La misión primordial de estas publicaciones es promover el uso responsable de los medicamentos herbolarios. Cada monografía publicada por la AHP contiene información crítica y detallada sobre los usos populares de las especies medicinales de mayor uso. Las monografías de la AHP también incluyen los estudios toxicológicos y farmacológicos y, en lo posible, clínicos, que sustentan la eficacia y la seguridad de esas plantas; así como sus principios activos, pruebas de pureza, composición e identidad. Otro de los objetivos de la AHP es generar muestras de referencia de utilidad para los ensayos de control de calidad. Recientemente, la FDA publicó en el año 2003 las guías de buenas prácticas de manufactura (GMP's) para productos herbolarios. Este documento ha estimulado de manera notable la investigación conducente al establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, la pureza, la calidad y la potencia de las drogas crudas y productos fitofarmacéuticos derivados de éstas en los Estados Unidos (Bone, 2001; Flaster y Lassiter, 2004; OMS, 2002; Reif *et al.*, 2004; Sharpless *et al.*, 2004).

México, país con una gran tradición en el uso de hierbas con fines curativos, no está

exento de la influencia de los cambios ocurridos en el desarrollo y comercialización de los fitomedicamentos. Estos remedios herbolarios se fundamentan igualmente en el uso tradicional de las mismas que en algunos casos se remonta a los tiempos prehispánicos. De acuerdo a un inventario realizado por investigadores del Instituto Nacional Indigenista, en México existen más de 3,500 especies medicinales, las cuales son utilizadas por un gran sector de la población para tratar la sintomatología de los padecimientos más comunes. Sin embargo, el porcentaje de especies botánicas estudiadas desde un punto de vista farmacológico es relativamente bajo. Si bien es cierto que durante más de tres décadas la investigación científica de las plantas medicinales en México se ha destacado por un notable avance en los estudios químicos, el nivel de conocimiento de los recursos herbolarios nacionales es insuficiente en comparación con lo logrado en otros países. Las plantas medicinales que han podido cursar por las diferentes etapas del proceso de investigación que permiten la validación farmacológica de su uso tradicional, su inocuidad y la calidad de las mismas son escasas a pesar de que son productos destinados a procurar la salud humana (Lozoya, 1993; Bye *et al.*, 1995). La mayoría de las plantas que se emplean para la elaboración de preparados herbolarios se recolectan en su ámbito natural puesto que son escasas las plantas medicinales cultivadas con fines industriales. De ahí que la calidad de los productos sea precaria (Hersch, 1996; Lozoya, 1993).

Debido al interés del público por consumir plantas medicinales, las empresas nacionales procuran proveer productos novedosos que tengan una repercusión comercial; estos productos generalmente se elaboran con base en las recetas de las farmacopeas mexicanas de tiempos pasados. Estas circunstancias determinan el cuadro general que tiene el consumo de las plantas medicinales en el México actual y que va desde el ancestral puesto de hierbas frescas en miles de mercados del país, hasta el consumo de productos procesados industrialmente con diversos niveles de calidad y especificaciones de uso pero que se distribuyen en los mercados y tianguis urbanos, donde la población busca productos vegetales medicinales como formas curativas alternas (Lozoya, 1993).

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS**

Debido al incremento general que tiene el consumo de medicamentos herbolarios en el México actual, en el mes de febrero de 1997, 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 dichos productos. Asimismo, en el mes de diciembre de 1999, se publicó en el mismo documento una lista de plantas prohibidas para la elaboración de tisanas, infusiones y aceites vegetales comestibles. 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 respuesta ante la creciente necesidad de referentes respecto a los recursos herbolarios y como una repercusión de la propuesta de la OMS. Sin embargo, a pesar de la reconocida riqueza herbolaria de nuestro país, las monografías de especies autóctonas o introducidas pero de uso médico tradicional resultaron muy limitadas en cantidad y calidad, por el simple hecho de que no se dispone de la información suficiente para integrarlas. En consecuencia, los centros de investigación en el área de la salud, incluyendo las universidades, deben generar la información necesaria para conformar las monografías de las plantas medicinales más utilizadas en nuestro país.

La investigación requerida para conformar una monografía tipo OMS de las plantas medicinales y sus preparados es de carácter multidisciplinario. El estudio comienza con el análisis botánico y etnomédico. Luego aparecen los estudios toxicológicos, la caracterización química relativa a la composición de la especie y a los procedimientos de control de calidad y la estandarización de la droga en función de dicha composición. Otros aspectos importantes son el toxicológico, el farmacológico que implica la caracterización del efecto terapéutico de las especies y el clínico. Esta investigación es frecuentemente muy compleja ya que los medicamentos herbolarios tienen dos características especiales que los distinguen de los medicamentos químicos: el uso de hierbas sin elaborar y el uso prolongado.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial generar parte de la información científica necesaria para la elaboración de la monografía de la especie medicinal *Brickellia veronicaefolia* de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud. La información generada sentará las bases para el desarrollo y la aplicación de procedimientos apropiados para la validación de la seguridad y el control de calidad de la especie en estudio, los cuales son necesarios para la elaboración, la revisión y la actualización de monografías farmacopeicas. También será de utilidad para los practicantes de la medicina alternativa, los industriales, los médicos, los farmacéuticos y otros profesionistas de la salud.

Para llegar a la meta planteada se formularon los siguientes objetivos particulares:

1. Determinar la toxicidad aguda en ratones y el potencial mutagénico de la planta de acuerdo con el método de Lorke y la prueba de Ames, respectivamente, con el propósito de iniciar los estudios relativos a su inocuidad.
2. Determinar el potencial farmacológico del extracto íntegro y del aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas de *B. veronicaefolia* con la finalidad de corroborar en forma parcial la eficacia de la planta en las prácticas médicas alternativas de México.
3. Establecer los principios activos y/o marcadores que permitan tanto la estandarización de los preparados herbolarios a base de *B. veronicaefolia*, como el establecimiento de las pruebas de identidad y composición de la droga cruda y preparados de la planta.
4. Desarrollar al menos dos métodos analíticos, uno por resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) y otro por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para cuantificar los principios biodinámicos y los compuestos marcadores presentes en la especie.

### III. ANTECEDENTES DE LA ESPECIE *Brickellia veronicaefolia*

#### 3.1 Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

*Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray es un arbusto pequeño cuyas medidas oscilan entre 40 cm y 1 m de altura. Presenta hojas opuestas, ovadas de 4 a 15 cm de largo por unos 5 cm de ancho, borde crenado, pecíolos de 3 a 6 cm de largo; las flores en cabezuelas miden de 12 a 17 mm y son rosadas (Figura 1). La especie tiene por hábitat el bosque mesófilo de montaña y el bosque de encino o de pino, a una altitud de 1750 a 2750 m sobre el nivel del mar (Argueta *et al.*, 1994).

En México, se conoce comúnmente con los nombres de peistón, pexto, oreganillo, oreganito, hierba del jaito, hierba del haito, chilaco blanco, gordolobo corriente, mejorana de campo y señate. La planta se utiliza para tratar desórdenes gastrointestinales, tales como el dolor de estómago y los cólicos agudos; también se utiliza para curar el reumatismo, dolores de apéndice y contra las enfermedades biliares (Argueta *et al.*, 1994). *B. veronicaefolia* se consume sola o en combinación con otras hierbas medicinales como la manzanilla, la guayaba, el hinojo, la raíz de crameria, la hoja de San Nicolás y la hierba de San Juan, entre otras. Entre los preparados comerciales, el Estomacure es quizás el más popular y se utiliza para la cura de desórdenes gastrointestinales y procesos inflamatorios. Este preparado, al igual que muchos otros, corrobora el hecho de que la mayoría de los productos herbolarios comercializados a nivel industrial provienen de plantas de reconocido uso en la medicina popular.

#### 3.2 Estudios químicos y farmacológicos.

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie *B. veronicaefolia* posee una gran diversidad de constituyentes químicos. Los principales metabolitos secundarios aislados de esta planta pertenecen a las categorías de los triterpenoides, los diterpenoides de tipo

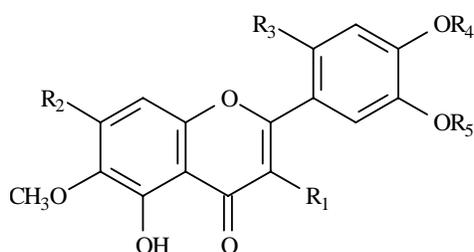
labdano (Calderón *et al.*, 1983) y los flavonoides, en su mayoría 6-metoxiflavonoides (Iinuma *et al.*, 1985; Pérez *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 1980 y 1984). Este último grupo de compuestos constituyen los productos del metabolismo secundario más abundante y ampliamente distribuidos entre las especies del género *Brickellia*.



**Figura 1.** *Brickellia veronicaefolia*.

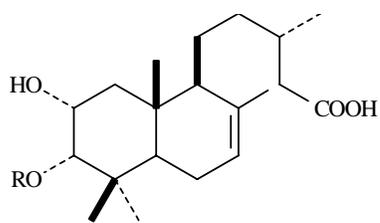
En el primer estudio realizado por Roberts y colaboradores (1980) fue posible aislar trece flavonoides, incluyendo dos heterósidos y cuatro sulfatos, a partir de un extracto metanólico de la especie. Los compuestos se caracterizaron por métodos químicos y espectroscópicos e incluyen: la artemetina (1), la casticina (2), la eupatina (3),

la eupatolitina (4), la 3,6,7-trimetoxiquercetagetina (5), el digalactósido de la veronicafolina (6), el galactósido de la eupatolitina (7) y los sulfatos de eupatina (8), eupatolitina (9), patuletina (10) y veronicafolina (11). En 1984, estos mismos autores describen la presencia de una flavona novedosa, la brickellina (12), en un material vegetal que se recolectó en el estado de Nuevo León, México (Roberts *et al.*, 1984).

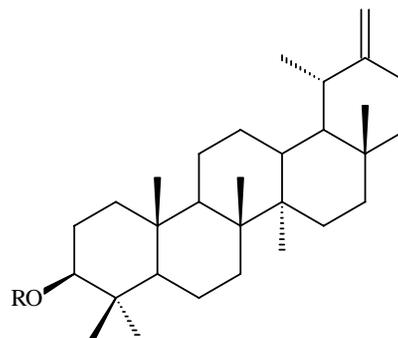


Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
(1)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
(2)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
(3)	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>
(4)	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H
(5)	OCH <sub>3</sub>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

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



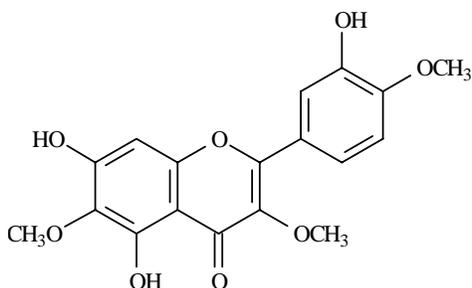
Compuesto	R
<b>13</b>	H
<b>14</b>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{---CO---C---CH}_2\text{---CH}_3 \\   \\ \text{OH} \end{array}$



Compuesto	R
<b>15</b>	H
<b>16</b>	COCH <sub>3</sub>

Recientemente, Pérez y colaboradores realizaron el fraccionamiento biodirigido de un extracto hexánico hipoglucemiante de *B. veronicaefolia*, recolectada en el estado de Guerrero; este estudio condujo al aislamiento de la 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona, la centaureidina (**17**). El flavonoide no presentó efecto hipoglucemiante significativo en ratones normoglucémicos y diabéticos. La diferencia en la actividad del extracto hexánico, que disminuyó los niveles de glucosa en un 72 % a la dosis de 300 mg/Kg en 24 h, y de la flavona **17**, que tan sólo ocasionó un decremento de los niveles de la glucosa en un 29 % a la dosis de 50 mg/Kg en 4.5 h, indican que este no es el principio activo hipoglucemiante de la planta. La centaureidina (**17**), sin embargo, como otros flavonoides, es un excelente captador de radicales libres, por lo que los autores le atribuyen propiedades antioxidantes (Pérez *et al.*, 1998, 2000 y 2004). Por último, los investigadores concluyen que el efecto hipoglucemiante comprobado experimentalmente corrobora el uso popular de *B. veronicaefolia* como un agente antidiabético. No obstante, en la revisión bibliográfica y los estudios de campo realizados durante el período de la presente investigación no fue posible encontrar información respecto a ese uso medicinal de la planta.

La literatura farmacológica describe también la actividad antibiótica de un extracto etanólico de la especie contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella lutea*, *Bacillus subtilis* y *Shigella disenteriae* (Argueta *et al.*, 1994).



[17]

Por ultimo, cabe destacar, que esta especie se considera de utilidad como un agente fitorremediador ya que es capaz de transportar el arsénico del suelo a las partes aéreas de la planta (Flores-Tavizon *et al.*, 2003).

## **IV. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 MATERIAL VEGETAL**

El material utilizado en el presente estudio (*B. veronicaefolia*) se recolectó en dos localidades. La primera recolecta se realizó en la región de La Soledad, Municipio de Aculco, estado de México en los meses de diciembre de 2000 y 2003 (Lote 1 y 2, respectivamente) y junio de 2005 (Lote 3). La segunda se recogió en la región de Loma Bonita, estado de Michoacán en mayo de 2004 (Lote 4). De manera adicional, una muestra se adquirió en el mercado de Sonora proveniente del estado de Puebla (dato no confirmado) en abril de 2004 (Lote 5). La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM). En cada caso, un ejemplar de referencia (Vouchers: BRC-1, BRC-2, BRC-3, BRC-4 y BRC-5, respectivamente) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

### **4.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS**

#### **4.2.1 Determinación del efecto relajante de extractos, fracciones y productos puros sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.**

El efecto relajante del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos de *B. veronicaefolia* (Lote I) sobre la contracción espontánea del íleon de cobayo se determinó de acuerdo a un diseño experimental previamente establecido (Hernández *et al.*, 2004). A continuación, se describe con detalle el procedimiento utilizado.

##### **4.2.1.1 Aislamiento del íleon.**

Para la obtención del tejido, se utilizaron cobayos macho adultos (200-300 g) alimentados *ad libitum* y mantenidos en un bioterio con libre acceso al agua. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen del

animal para aislar el íleon, el cual se colocó en una solución Ringer Krebs-Henseleit (Ringer RH), con la siguiente composición (mM): NaCl 119, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.5, NaHCO<sub>3</sub> 20 y glucosa 11.4. La solución se preparó con agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5). El íleon aislado se limpió y se cortó en segmentos de 1 cm.

#### **4.2.1.2 Sistema de registro.**

Para determinar el efecto de las muestras de prueba sobre la contracción espontánea del íleon, se empleó un sistema de registro isométrico vertical para tejido aislado. Para ello, los segmentos del íleon se colocaron en una cámara de incubación con 20 mL de la solución Ringer RH burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa al 5% de CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> a una temperatura de 37 °C, la cual se mantuvo uniforme mediante un baño recirculador. En estas condiciones, el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor de fuerza Grass Modelo FT 03, el cual registra constantemente las señales mecánicas de las contracciones y las envía a un polígrafo Grass Modelo 7D de cuatro canales o a un sistema BIOPAC. La fuerza de tensión que se empleó para el tejido fue de 1g, que corresponde a 2 cm del desplazamiento de la pajilla.

#### **4.2.1.3 Evaluación del efecto relajante.**

Con la finalidad de estabilizar el tejido a las condiciones *in vitro*, cada segmento del mismo se incubó y mantuvo en solución Ringer RH durante un período de 30 min con una tensión constante de aproximadamente un gramo. Para determinar el efecto de las diferentes concentraciones de las muestras de prueba, en primer lugar, se registró la actividad espontánea durante un período de 10 min, la cual se consideró como el control (100% actividad).

El efecto de diferentes concentraciones del extracto, fracciones y compuestos puros obtenidos de la especie *B. veronicaefolia* y del control positivo se registró inmediatamente

después de transcurrir el período control. Para ello, se adicionó al baño las muestras de prueba a diferentes concentraciones, disueltas en DMSO (dimetil sulfóxido) o agua destilada, en un volumen de 50  $\mu$ L (una concentración por cada segmento del íleon) y el efecto de cada muestra se registró durante 10 min. Después de cada experimento, los tejidos se lavaron tres veces con solución Ringer RH para permitir su recuperación.

Los efectos de las muestras de prueba y del control positivo (papaverina) sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo, se determinaron por comparación de las áreas bajo la curva (ABC) registradas por la frecuencia y la amplitud de las contracciones antes y después de la aplicación de los materiales de estudio. Los resultados representan un promedio de seis réplicas  $\pm$  EEM. El ajuste de las curvas se realizó mediante un análisis de regresión no lineal utilizando el programa de análisis estadístico PRISMA. La significancia estadística de los resultados se estableció mediante un análisis de varianza (ANDEVA,  $p < 0.05$ ) seguido por una prueba de Tukey. Los valores de  $CI_{50}$  (**concentración requerida para inhibir en un 50 % la contracción espontánea del órgano aislado**) se calcularon mediante el análisis estadístico indicado anteriormente.

#### **4.2.2 Efecto de los productos naturales sobre la enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1) dependiente de calmodulina (CaM).**

La actividad de la PDE1 en presencia de CaM se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (Sharma y Wang, 1979) como se explica a continuación:

*Preparación del medio de reacción:* 0.015 unidades de PDE1 de cerebro de bovino, 0.83  $\mu$ g de CaM de cerebro de bovino, 0.3 unidades de 5'-nucleotidasa de veneno de *Crotalus atrox* y 30 nM de ASB (albúmina sérica de bovino) se incubaron, durante 1 hora a 30 °C, en un vial que contenía exactamente 2.5 mL de buffer de reacción.

*Procedimiento:* el ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250  $\mu$ L de capacidad). Para cada muestra de prueba se prepararon 9 diluciones seriadas, de forma tal de obtener concentraciones

finales de 65, 50, 32, 20, 13, 7, 4, 2 y 1  $\mu\text{M}$ . A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 10  $\mu\text{L}$  de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones antes indicadas y 40  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción previamente preparada y mantenida a una temperatura aproximada de 30 °C. Posteriormente, la placa se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se agregó a cada pozo 10  $\mu\text{L}$  de AMPc 10.8 mM en intervalos de 10 segundos. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al término de este segundo periodo de incubación se adicionó a cada pozo 190  $\mu\text{L}$  de verde de malaquita para detener la reacción. La cantidad de fosfato generado durante la reacción de hidrólisis del AMPc se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica de las muestras a 695 nm en un espectrofotómetro marca BioRad modelo 660. La actividad de la enzima se calcula de manera indirecta al interpolar las densidades ópticas registradas en una curva estándar preparada con fosfato monobásico de potasio en un intervalo de 0.2 a 3 nmol. Para cada muestra se realizaron seis réplicas independientes. Como control positivo se empleó clorpromazina.

#### **4.2.3 Determinación de las constantes de inhibición ( $K_i$ ) de los productos naturales.**

La evaluación de las constantes de inhibición de los benzoatos de bencilo (**24**, **25** y **30**) se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita en el inciso 4.2.2, variando únicamente la concentración de CaM presente en el medio de reacción (0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 ng).

#### **4.2.4 Evaluación de la toxicidad aguda.**

La evaluación del efecto tóxico agudo potencial del extracto orgánico obtenido a partir de *B. veronicaefolia* se determinó de acuerdo con el protocolo experimental establecido por Lorke (Lorke, 1983). El ensayo se realizó empleando ratones macho adultos (20-25 g) con ayuno de 18 horas. Para determinar la toxicidad aguda del extracto de prueba se realizan dos fases. En la primera se emplearon dosis correspondientes a 1000, 100 y 10 mg/Kg de peso corporal, mientras que en la segunda se emplearon dosis de 5000, 2900 y 1600 mg/Kg de peso. El efecto tóxico del

extracto se determinó mediante la administración oral de las muestras de prueba a los animales de experimentación. El efecto de la muestra y el control negativo (solución salina isotónica) se determinó mediante la observación directa del comportamiento de los animales durante 14 días. Al término de este periodo, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen para aislar los órganos vitales (hígado, riñones, corazón y estómago) y evaluar posibles alteraciones. Los resultados representan un promedio de tres réplicas. La  $DT_{50}$  se evaluó mediante el cálculo de la media geométrica siguiendo los criterios establecidos por Lorke.

#### 4.2.5 Determinación del potencial mutagénico.

El potencial mutagénico del extracto de *B. veronicaefolia* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Ames (Maron y Ames, 1983). Para este ensayo se emplearon las cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 y TA102 con diferentes tipos de mutación en el operón de la histidina. En el Cuadro 1 se indican las características de las cepas empleadas para los diferentes ensayos.

##### a) Preparación del homogenado de la fracción S9.

Para preparar la fracción S9 se utilizaron cinco ratas macho adultos (200 g). Los animales fueron administrados vía intraperitoneal con una dosis única de 500 mg/Kg del carcinógeno Aroclor 1254. Después de cinco días, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Enseguida, se realizó una disección en el abdomen de la rata para aislar el hígado, el cual se colocó en una solución estéril de KCl 0.15 M, en estas condiciones el hígado aislado se limpió mediante lavados consecutivos. Posteriormente, el tejido se suspendió en 150 mL de una solución de KCl 0.15 M. La suspensión resultante se centrifugó a 8700 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 1 mL y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Lowry.

##### b) Preparación de la muestra.

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: 50 mg del extracto orgánico

objeto de estudio se disolvieron en 1 mL de DMSO. A partir de la solución anterior se prepararon las diluciones necesarias para que 20  $\mu$ L de la misma contengan entre 1000, 500 y 250  $\mu$ g.

c) *Preparación del inóculo.*

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

**Cuadro 1.** Características de las cepas de referencia utilizadas para los diferentes ensayos.

<i>S. typhimurium</i>			
	TA 98	TA 100	TA 102
Revertantes de histidina/ placa	30-50	120-200	240-320
Condiciones de incubación	aerobio, 37 °C	aerobio, 37 °C	aerobio, 37 °C
Mutágeno s/S9	ácido picrolónico	etilen-N-nitroso guanidina	mitomicina C
Mutágeno c/S9	2-aminoantraceno	ciclofosfamida	mitomicina C 2-aminoantraceno
Mutación en el operón de histidina	his D3052	his G46	his G428 (pAQ1)

d) *Procedimiento.*

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

Como control positivo en todos los ensayos se emplearon los mutágenos de referencia indicados en el Cuadro 1. El mismo procedimiento se siguió para los controles negativos que contenían únicamente el disolvente. Se trabajaron tres réplicas independientes por muestra.

### 4.3 ESTUDIO FITOQUÍMICO

El estudio fitoquímico que se describe en este inciso se realizó utilizando el Lote 1 del material de estudio.

#### 4.3.1 Análisis cromatográficos.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230  $\mu\text{m}$  ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, en placas de vidrio o de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 G<sub>254</sub> Merck), utilizando varios sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa de software Millennium 2000 (Waters). La separación y purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters,  $\mu\text{porasil}$ , 125 Å, tamaño de partícula 10  $\mu\text{m}$ ) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La detección se ajustó entre 215-254 nm.

#### 4.3.2 Registro de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

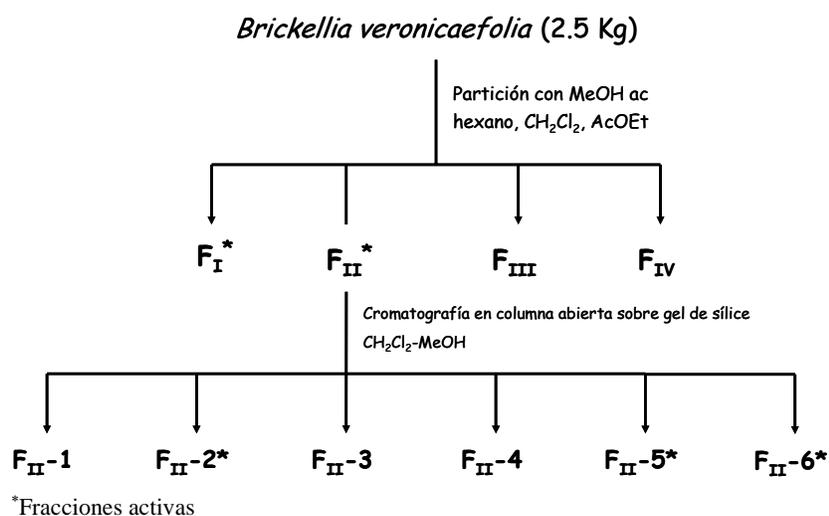
Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jonhs y se reportan sin corregir. Los espectros en el IR se obtuvieron en pastillas de KBr o película y se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 59913. Los espectros en el UV se registraron utilizando un espectrómetro Lambda II UV en MeOH. Los espectros RMN <sup>1</sup>H (300 MHz), <sup>13</sup>C (75 MHz), COSY, NOESY, HMBC y HMQC se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300 utilizando CDCl<sub>3</sub> o CD<sub>3</sub>OD como disolventes y TMS como referencia interna. Los espectros de

masas por impacto electrónico se obtuvieron utilizando un espectrómetro JEOL SX 102 mediante inyección directa con una energía de ionización de 70 eV.

La identificación de los componentes presentes en las esencias obtenidas de *B. veronicaefolia*, se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5989A. La columna utilizada fue del tipo 5 % metil silicón HP, con una longitud de 30 m por 0.32 mm de diámetro. El helio se empleó como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la columna se programó de 70-250 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV.

#### 4.3.3 Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto espasmolítico.

El material vegetal seco y molido (2.5 Kg) se extrajo tres veces mediante un proceso de maceración con 8 L de una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1). El extracto resultante se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose 230 g de un residuo verde. El extracto resultante (230 g, CI<sub>50</sub> = 39.22 µg/mL) se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de partición entre metanol acuoso (50%), hexano, diclorometano y acetato de etilo, en forma consecutiva (Figura 2).



**Figura 2.** Extracción y fraccionamiento preliminar del extracto espasmolítico de *Brickellia veronicaefolia*.

La fracción activa resultante de la partición con diclorometano ( $F_{II}$  (75.4 g),  $CI_{50} = 74.52 \pm 8.43 \mu\text{g/mL}$ ) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (1 Kg) en columna abierta. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con incrementos de polaridad ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ , 1:0→2:8). Se obtuvieron un total de 95 fracciones (300 mL) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para obtener seis conjuntos de fracciones secundarias (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción espasmolítica  $F_{II}$ .

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas (Clave)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	100	1-21	1-12 ( $F_{II-1}$ )	$48.28 \pm 1.08$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	99:1	22-33	13-35 ( $F_{II-2}^*$ )	$68.42 \pm 8.30$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	98:2	34-50	36-58 ( $F_{II-3}$ )	$73.93 \pm 9.20$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	97:3	51-62	59-80 ( $F_{II-4}$ )	$56.76 \pm 0.70$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	96:4	63-72	81-88 ( $F_{II-5}^*$ )	$78.64 \pm 3.65$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	95:5	73-78	89-95 ( $F_{II-6}^*$ )	$48.85 \pm 6.90$
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	93:7	79-83		
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	90:10	84-90		
$\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$	80:20	91-95		

\*Fracciones activas

#### 4.3.4 Aislamiento del ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**18**), el ácido 2-metoxibenzoico (**19**) y el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**).

La fracción activa  $F_{II-2}$  (1 g,  $CI_{50} = 68.42 \pm 8.3 \mu\text{g/mL}$ ) se sometió a un fraccionamiento terciario mediante cromatografía en columna abierta, utilizando 30 g de gel de sílice y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente. Este proceso permitió la obtención de tres productos mayoritarios, el ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**18**), el ácido 2-metoxibenzoico (**19**) y el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**). El ácido **18** se obtuvo como un sólido cristalino blanco (20 mg) con un punto de fusión (pf) de 62-63°C; el ácido **19** se aisló como un sólido cristalino blanco (10 mg) con un pf de 100-101°C y el producto **22** como un sólido cristalino blanco con un pf de 144-145°C.

**Ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (18):** IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 1686, 1398, 807, 746, 686  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN<sup>1</sup> H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  12.17 (1H, s, COOH), 11.36 (1H, s, OH), 7.42 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 6.73 (1H, dd,  $J = 8.7, 1.2$  Hz, H-5), 6.5 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.2$  Hz, H-3), 4.07 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz):  $\delta$  170.8 (C=O), 164.3 (C-2), 158.4 (C-6), 135.6 (C-4), 112.4 (C-5), 101.6 (C-1), 101.2 (C-3); EMIE (m/z): 168 calc. para C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> : 168.0423.

**Ácido 2-metoxibenzoico (19):** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  11.0 (1H, s, COOH), 8.2 (1H, dd,  $J = 7.5, 1.7$  Hz, H-6), 7.57 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-4), 7.14 (1H, dd,  $J = 7.3, 0.9$  Hz, H-5), 7.07 (1H, dd,  $J = 8.8, 0.9$  Hz, H-3), 4.1 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz):  $\delta$  165.2 (C=O), 158.0 (C-2), 135.1 (C-4), 133.9 (C-6), 122.3 (C-5), 117.6 (C-1), 111.6 (C-3); EMIE (m/z): 152 calc. para C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> : 152.04735.

#### 4.3.5 Separación de los compuestos activos presentes en las fracciones F<sub>II</sub>-5-III y F<sub>II</sub>-5-VI mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

La fracción activa F<sub>II</sub>-5 (3 g, CI<sub>50</sub> = 78.64 ± 3.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se sometió a un fraccionamiento terciario por cromatografía sobre gel de sílice (150 g) en columna abierta. Como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes con incrementos de polaridad (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, 1:0→2:8). Se obtuvieron un total de 45 fracciones (50 mL cada una) reuniéndose aquellas que resultaron cromatográficamente similares, para así obtener seis conjuntos de fracciones terciarias (F<sub>II</sub>-5-I a F<sub>II</sub>-5-VI).

La resolución mediante CLAE de la fracción F<sub>II</sub>-5-III se realizó en una columna de fase normal empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 3 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria constituida por CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, en proporción 98:2. Para la fracción F<sub>II</sub>-5-VI se utilizó una columna analítica de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 0.6 mL/min y como eluyente una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5).

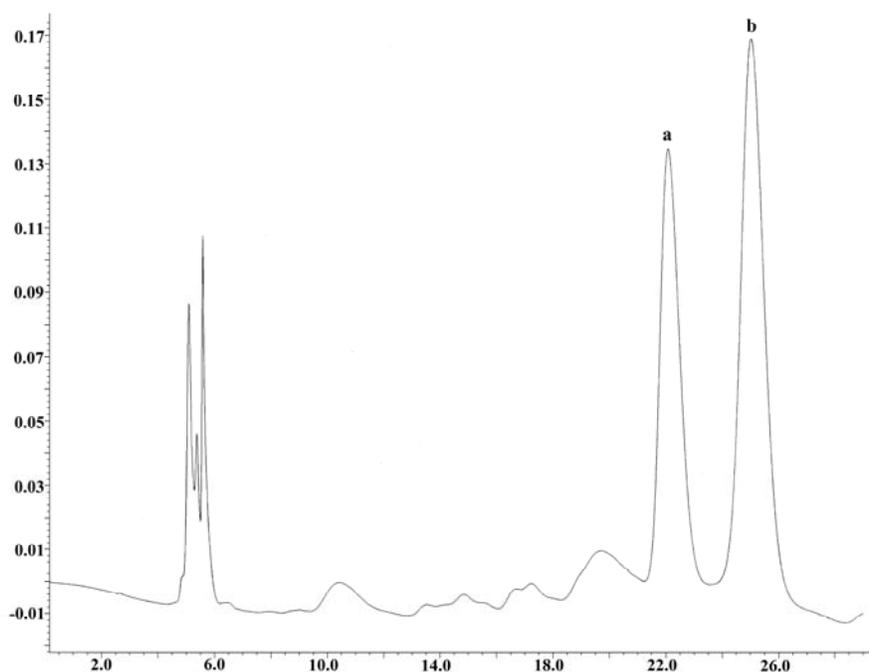
##### 4.3.5.1 Aislamiento del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) [21].

De la fracción F<sub>II</sub>-5-III se aisló el  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) [21] como un aceite amarillo (20 mg); el tiempo de retención del producto fue de 6.7 min.

#### 4.3.5.2 Aislamiento del $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**) y del 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**).

De la fracción F<sub>II</sub>-5-VI se aislaron el  $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**) y el 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**). Los productos **20** (10 mg) y **23** (13 mg) se aislaron como aceites amarillos con tiempos de retención de 22.1 y 25.8 min, respectivamente (Figura 3).

**$\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**):** IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$ : 3450, 1500, 1263, 1220, 1070  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.07 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5), 6.82 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-3), 6.71 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.1$  Hz, H-6), 5.93 (1H, ddd,  $J = 17.1, 10.3, 6.9$  Hz, H-2''), 5.05 (1H, m, H-3''), 4.84 (1H, d,  $J = 7.3$ , H-1'), 3.68 (1H, dd,  $J = 11.9, 4.7$ , H-6'), 3.4 (1H, d,  $J = 6.7$ , H-7); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  150.8 (C-2), 146.3 (C-1), 139.0 (C-2'), 136.5 (C-4), 122.1 (C-5), 118.2 (C-6), 115.9 (C-3'), 114.1 (C-3), 103.1 (C-1''), 78.2 (C-3''), 77.8 (C-5''), 74.9 (C-2''), 71.3 (C-4''), 62.5 (C-6''), 56.7 ( $\text{OCH}_3$ -2); EMIE (m/z): 327 calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7$ : 326.1365.



**Figura 3.** Cromatograma de la fracción espasmolítica F<sub>II</sub>-5-VI. Condiciones de análisis: Detector UV/Visible,  $\lambda$  254 nm. Sistema de elución:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (95:5). Flujo: 0.6 mL/min. Picos: **a**  $t_R$  22.1 (**20**) y **b**  $t_R$  25.8 min (**23**).

### 4.3.6 Fraccionamiento secundario de la fracción espasmolítica F<sub>I</sub>.

La fracción F<sub>I</sub> (60 g) emanada de la partición con hexano (CI<sub>50</sub> = 47.61 ± 4.7 µg/mL) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía sobre gel de sílice (1.3 Kg) en columna abierta. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con incrementos progresivos de polaridad (Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:0→0:1; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, 1:0→8:2). Se obtuvieron un total de 140 fracciones (300 mL), reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para así obtener 15 conjuntos de fracciones secundarias. En el Cuadro 3 se sintetiza el fraccionamiento secundario de la fracción F<sub>I</sub> y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos y fracciones combinadas.

**Cuadro 3.** Resumen del fraccionamiento secundario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción espasmolítica F<sub>I</sub>.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones combinadas	Clave
hexano	100	1-7	1-19	F <sub>I</sub> -1
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	8-30	20-22	F <sub>I</sub> -2
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	31-52	23-49	F <sub>I</sub> -3
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	53-93	50-55	F <sub>I</sub> -4
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	64-75	56-63	F <sub>I</sub> -5
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	60:40	76-83	64-67	F <sub>I</sub> -6
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	84-93	68-75	F <sub>I</sub> -7
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	40:60	94-104	76-82	F <sub>I</sub> -8
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30:70	105-120	83-89	F <sub>I</sub> -9
hexano-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	10:90	121-126	90-92	F <sub>I</sub> -10
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	127-130	93-97	F <sub>I</sub> -11
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	90:10	131-135	98-102	F <sub>I</sub> -12
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	80:20	136-140	103-113	F <sub>I</sub> -13
			114-126	F <sub>I</sub> -14
			127-140	F <sub>I</sub> -15

#### 4.3.6.1 Separación mediante CLAE de los compuestos presentes en las fracciones secundarias F<sub>I</sub>-1, F<sub>I</sub>-12 y F<sub>I</sub>-15.

La resolución mediante CLAE de la fracción F<sub>I</sub>-1 se realizó en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 6 mL/min y hexano como fase móvil. El camazuleno (**32**) se obtuvo como un aceite azul intenso (50 mg) con un t<sub>R</sub> de 13.8 min.

**Camazuleno (32):** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 8.16 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-8), 7.61 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-2), 7.38 (1H, dd, *J* = 10.2, 2.1 Hz, H-6), 7.21 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-3), 6.98 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-5), 2.8 (2H, q, *J* = 7.8 Hz, H-11), 2.83 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9), 2.6 (3H, s, CH<sub>3</sub>-10), 1.34 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, H-12); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz): δ 144.1 (C-8a), 137.1 (C-3a), 136.2 (C-7), 135.9 (C-8), 135.6 (C-6), 134.6 (C-5), 124.9 (C-1), 124.8 (C-2), 112.6 (C-3), 33.8 (C-11), 24.1 (C-10), 17.4 (C-12), 12.9 (C-9); EMIE (m/z): 184 calc. para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>:184.1252.

La separación de los benzoatos de bencilo mediante CLAE a partir de la fracción F<sub>I</sub>-12 se realizó en una columna de fase normal empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 6 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria constituida por hexano-AcOEt, en la proporción 3:1. Para la resolución de la fracción F<sub>I</sub>-15 se utilizó la misma columna, un flujo de 6 mL/min y como fase móvil una mezcla binaria de hexano-AcOEt en una relación 88:12 (Figura 4).

De la fracción F<sub>I</sub>-12 se aislaron los benzoatos de bencilo: 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**25**). El compuesto **24** se purificó como un sólido cristalino blanco con un pf de 57 °C (30 mg) con un t<sub>R</sub> de 15.1 min y el compuesto **25** se obtuvo como un aceite transparente (10 mg) con un t<sub>R</sub> de 13.4 min.

**2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (24):** RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 7.44 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-2' y H-6'), 7.35 (2H, m, H-3' y H-5'), 7.34 (1H, m, H-4'), 7.27 (1H, t, *J* = 8.3 Hz, H-4), 6.54 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3 y H-5), 5.38 (2H, s, H-7'), 3.8 (6H, s, OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz): δ 166.4 (C-7), 157.4 (C-2 y C-6), 136.1(C-1'), 131.1(C-4), 128.3 (C-3' y C-5'), 128.1 (C-2' y C-6'), 127.9 (C-4'), 113.1 (C-1), 103.9 (C-3 y C-5), 66.8 (C-7'), 56 (OCH<sub>3</sub>); EMIE (m/z): 272 calc. para C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>: 272.1049.

**2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (25):** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  11.4 (1H, s, OH), 7.34 (1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 7.30 (1H, t,  $J = 10.4$  Hz, H-5'), 7.05 (2H, da, H-2' y H-6'), 6.87 (1H, dd,  $J = 10.4, 3.2$  Hz, H-4'), 6.59 (1H, dd,  $J = 11.2, 1.2$  Hz, H-3), 6.40 (1H, dd,  $J = 11.8, 1.2$  Hz, H-5), 5.4 (2H, s, H-7'), 3.84 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -6), 3.80 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ -3'); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  170.7 (C-7), 163.5 (C-6), 160.9 (C-2), 159.6 (C-3'), 137.2 (C-1'), 135.1 (C-4), 129.5 (C-5'), 119.5 (C-6'), 113.2 (C-2' y C-4'), 113.1 (C-1), 109.9 (C-3), 102.3 (C-5), 66.7 (C-7'), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ -6), 55.3 ( $\text{OCH}_3$ -3'); EMIE (m/z): 288 calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ : 288.0998.

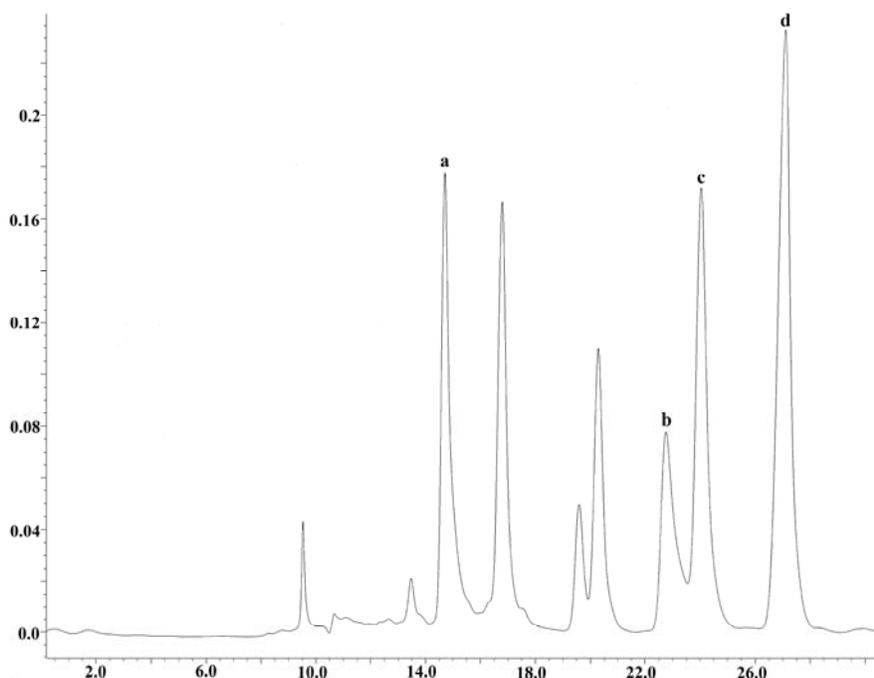
De la fracción  $\text{F}_1$ -15 se aislaron los benzoatos de bencilo 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**26**), 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**27**), 2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo (**28**) y 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**). Todos los productos se purificaron como aceites transparentes con  $t_{\text{R}}$ 's de 14.7, 22.9, 24.0 y 27.2 min, respectivamente.

**2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (26):** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  10.9 (1H, s, OH), 7.48 (1H, dd,  $J = 8.3, 1.2$  Hz, H-3), 7.43-7.37 (5H, m, H-2'-H-6'), 7.04 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz, H-5), 6.82 (1H, t,  $J = 8.1$  Hz, H-4), 5.4 (2H, s, H-7'), 3.9 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  170.2 (C-7), 152.2 (C-6), 148.6 (C-2), 135.2 (C-1'), 128.7 (C-3' y C-5'), 128.5 (C-2' y C-6'), 128.2 (C-4'), 121.2 (C-3), 118.5 (C-4), 116.7 (C-5), 115.3 (C-1), 67.1 (C-7'), 56.2 ( $\text{OCH}_3$ ); EMIE (m/z): 258 calc. para  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$ : 258.0892.

**2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo (27):** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  11.2 (1H, s, OH), 7.39 (3H, m, H-2' y H-6'), 7.37 (2H, m, H-3' y H-5'), 6.96 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-5), 6.34 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-4), 5.43 (2H, s, H-7'), 3.85 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.80 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  170.5 (C-7), 154.3 (C-6), 152.9 (C-2), 142.6 (C-3), 135.6 (C-1'), 128.5 (C-3' y C-5'), 128.1 (C-4'), 127.6 (C-2' y C-6'), 117.0 (C-4), 104.5 (C-1), 101.2 (C-5), 67.0 (C-7'), 56.8 ( $\text{OCH}_3$ -5), 56.4 ( $\text{OCH}_3$ -6); EMIE (m/z): 288 calc. para  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5$ : 288.0998.

**2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo (28):** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.45 (2H, da,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, H-2' y H-6'), 7.35 (3H, m, H-3' y H-5'), 6.87 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 6.60 (1H, d,  $J = 9.0$  Hz, H-5), 5.40 (2H, s, H-7'), 3.82 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.76 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  165.8 (C-7), 150.7 (C-6), 147.2 (C-2), 146.9 (C-3), 135.9 (C-1'), 128.4 (C-3' y C-5'), 128.1 (C-2' y C-6'), 114.4 (C-1), 106.3 (C-4 y C-5), 67.0 (C-7'), 61.5 ( $\text{OCH}_3$ -2), 56.6 ( $\text{OCH}_3$ -3), 56.3 ( $\text{OCH}_3$ -6); EMIE (m/z): 302 calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ : 302.1154.

**2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (29):** RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  7.28 (1H, t,  $J = 8.4$  Hz, H-4), 7.27 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.01 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz, H-6'), 6.86 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, H-4'), 6.83 (1H, m, H-2'), 6.55 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-3 y H-5), 5.36 (2H, s, H-7'), 3.81 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.80 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz):  $\delta$  166.4 (C-7), 159.7 (C-3'), 157.5 (C-2 y C-6), 137.7 (C-1'), 131.1 (C-4), 129.3 (C-5'), 120.2 (C-6'), 113.5 (C-1), 113.5 (C-2'), 113.4 (C-4'), 103.9 (C-3 y C-5), 66.6 (C-7'), 55.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 55.2 ( $\text{OCH}_3$ ); EMIE (m/z): 302 calc. para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$ : 302.1154.



**Figura 4.** Cromatograma obtenido de la fracción F<sub>I</sub>-15. Condiciones de análisis: Detector UV/Visible,  $\lambda$  254 nm. Sistema de elución: hexano-AcOEt (88:12). Flujo: 6 mL/min. Picos: **a**  $t_R$  14.7 (**26**), **b**  $t_R$  22.9 (**27**), **c**  $t_R$  24.0 (**28**), **d**  $t_R$  27.2 min (**29**).

#### 4.3.6.2 Aislamiento del acetato de taraxasterilo (**31**) y el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**).

De la fracción F<sub>I</sub>-10 cristalizaron 200 mg del compuesto **31**, como un sólido blanco y con pf de 77-78 °C. El residuo de la fracción F<sub>I</sub>-10 se purificó mediante CLAE en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 6 mL/min y una mezcla de hexano-AcOEt (75:25) como fase móvil. Este procedimiento permitió la purificación del compuesto **30** con un  $t_R$  de 13.95 min.

#### **4.4 PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *B. veronicaefolia*.**

Para la preparación de las esencias analizadas en el presente estudio se utilizaron todos los lotes de material vegetal. En todos los casos se utilizó la técnica de hidrodestilación y la esencia se separó del destilado mediante un proceso de partición con diclorometano. Cada extracción se repitió tres veces. Las fases orgánicas resultantes se concentraron a presión reducida, obteniéndose un residuo azul intenso. Los constituyentes presentes en la esencia se identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Cada espectro de masas resultante se comparó con la biblioteca del instrumento. En todos los casos, el porcentaje de correlación fue mayor al 95 %.

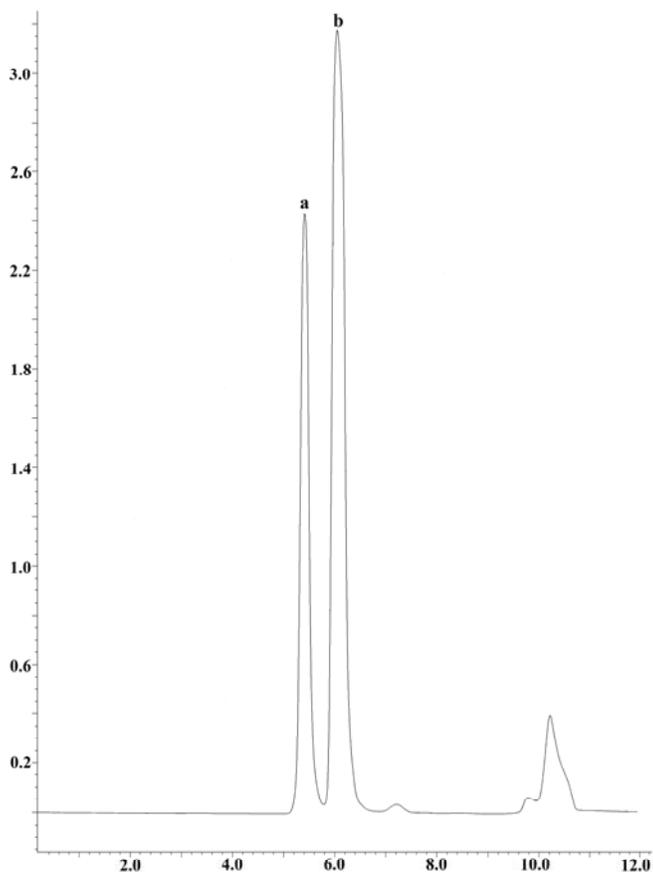
##### **4.4.1 Aislamiento del camazuleno (32) y el germacrano D (33) a partir de la esencia.**

La purificación por CLAE (Figura 5) de la esencia de *B. veronicaefolia* ( $CI_{50} = 0.27$   $\mu\text{g/mL}$ ) se realizó en una columna de gel de sílice (fase normal) utilizando un flujo de 6 mL/min y hexano como fase móvil. Estas condiciones cromatográficas permitieron la purificación del germacrano D (33) y cantidades adicionales de camazuleno (32). El germacrano D (33) se obtuvo como un aceite transparente con un  $t_R$  de 6.22 min.

##### **4.4.2 Cuantificación de los componentes presentes en la esencia.**

50 mg de la esencia a analizar y 1 mg de 1,4-dimetoxibenceno se disolvieron en 0.8 mL de  $\text{CDCl}_3$ . Los constituyentes activos presentes en la esencia se cuantificaron registrando el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) en un espectrómetro marca Varian Mercury 300.

Para determinar el valor de cada integral se utilizó el programa Mestre-C. El ajuste de la fase y la corrección de la línea base se realizó en el intervalo de 7.10-4.20 donde aparecen las señales diagnósticas para los siete compuestos analizados. La cantidad en miligramos de cada compuesto se calculó por medio de la fracción mol.



**Figura 5.** Cromatograma obtenido de la esencia de *B. veronicaefolia*. Condiciones de análisis: Detector UV/Visible,  $\lambda$  254 nm. Sistema de elución: hexano. Flujo: 6 mL/min. Picos: **a**  $t_R$  5.6 (**32**), **b**  $t_R$  6.2 min (**33**).

#### 4.4.3 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.

##### 4.4.3.1 Linealidad.

Para evaluar la linealidad del método se prepararon una serie de soluciones estándar mediante la adición de diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar (2,6-dimetoxibenzoato de bencilo y  $\beta$ -cariofileno) a 50 mg de la matriz de trabajo. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  se registraron empleando el procedimiento descrito anteriormente (ver inciso 4.4.2).

Para el cálculo de la ordenada al origen, la pendiente de la recta, el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación, se utilizó un análisis de regresión lineal.

#### 4.4.3.2 Exactitud.

La exactitud del método analítico se determinó utilizando la misma metodología descrita en el inciso anterior. Los resultados obtenidos se expresan en términos de porcentaje de la cantidad recuperada (% de recobro).

#### 4.4.3.3 Precisión.

La precisión del método se evaluó a partir del análisis de tres réplicas independientes de una solución estándar preparada de la siguiente forma: a 25 g de la droga cruda se adicionaron 1 mg de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y 0.9 mg de  $\beta$ -cariofileno (**36**). Enseguida, el material vegetal enriquecido se sometió a un proceso de hidrodestilación con 300 mL de agua durante 1.5 horas. La esencia resultante se separó del destilado mediante un proceso de partición exhaustivo con diclorometano. Los resultados se expresan en términos de desviación estándar (*S*) o DER.

#### 4.5 Hidrólisis básica del $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**).

A 3 mg del producto **21** se adicionaron 1 mL de metanol y 1 mL de KOH al 5%. La solución resultante se mantuvo en reflujo con agitación durante 2 horas. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano y se analizó por cromatografía en capa delgada.

#### 4.6 Obtención del derivado metilado del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (22).

Para obtener el derivado metilado del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (22) se utilizó una mezcla etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de etanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 mL de éter etílico. El producto **22** se disolvió en éter etílico y se le agregó 5 mL de la solución etérea de diazometano; la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas. El producto resultante fue idéntico en todos sus aspectos (pf, IR, RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) al producto natural 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (29).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Pruebas de eficacia e inocuidad de preparados de *B. veronicaefolia*.

De acuerdo al prontuario publicado por Herbolaria Universal en el año de 1997, *B. veronicaefolia* es una de las cien especies medicinales más comercializadas en México con fines curativos, tanto en centros de acopio de hierbas curativas como en mercados, tianguis y otros expendios de drogas crudas y productos herbolarios acabados. De tal forma que la persistencia de *B. veronicaefolia* para curar trastornos gastrointestinales en los establecimientos destinados al comercio de plantas medicinales, y la alta incidencia de este tipo de padecimientos en México, hacen de esta especie un candidato idóneo para la elaboración de una monografía tipo OMS.

Una vez seleccionada la especie, se procedió a generar parte de la información científica necesaria para integrar la monografía de acuerdo con las especificaciones de la OMS. Los resultados correspondientes se discutirán con detalle en la presente sección.

En primer lugar se realizaron los estudios preliminares de la inocuidad de la especie. Estos consistieron en la evaluación de la toxicidad aguda y del potencial mutagénico de un extracto íntegro de la planta, de acuerdo a los procedimientos de Lorke (Lorke, 1983) y Ames (Maron y Ames, 1983), respectivamente. Estas determinaciones se realizaron a pesar de que la especie se ha utilizado por varios decenios sin que se hayan documentado efectos tóxicos o reacciones adversas. Cabe destacar que no siempre la falta de documentación respecto a los efectos tóxicos secundarios significa que una planta sea inocua. Por último, se consideró que la OMS recomienda que cuando las hierbas se utilizan en combinación se debe determinar la toxicidad de cada uno de los ingredientes (OMS, 2002).

El ensayo de Lorke para determinar la toxicidad aguda se realiza en ratones y permite calcular la  $DT_{50}$  utilizando un número pequeño de animales durante un periodo de tiempo relativamente corto. Los resultados de esta prueba (Cuadro 4) permitieron establecer que la droga cruda derivada de *B. veronicaefolia* no provoca efectos tóxicos

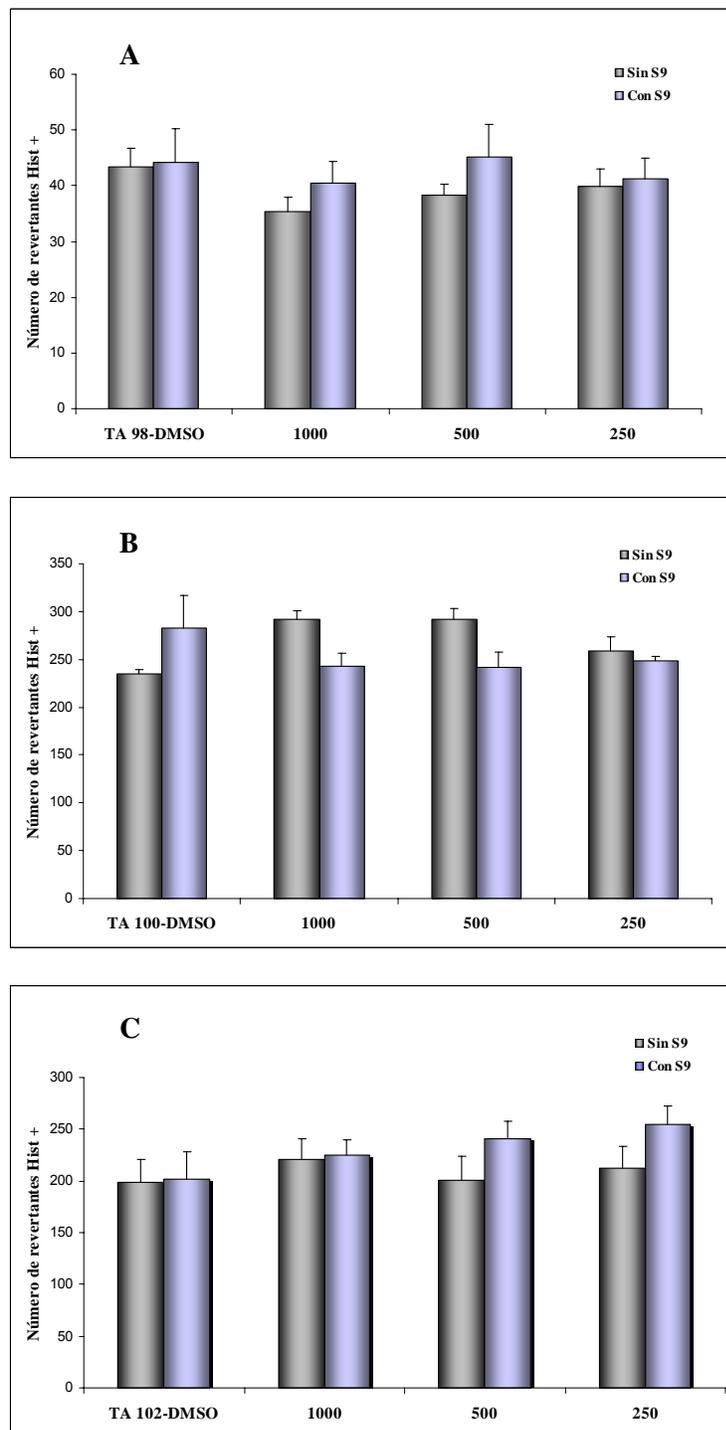
agudos importantes en animales. Durante la realización del experimento, los animales no presentaron un comportamiento anómalo ni daños visibles. Al cabo del ensayo, se realizó la necropsia de los animales y se encontró que los órganos vitales no se afectaron con los distintos tratamientos. La  $DT_{50}$  calculada fue de 2852 mg/Kg, por lo tanto este extracto se considera poco tóxico de acuerdo con los criterios de Lorke.

**Cuadro 4.** Toxicidad aguda del extracto de *Brickellia veronicaefolia*.

Fase 1		Fase 2	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	1/3
1000	0/3	5000	3/3

La prueba de Ames se basa en la reversión de una mutación bacteriana en distintas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA 98, 100 y 102) especialmente diseñadas para detectar productos que provoquen daño genético. Las cepas utilizadas en el ensayo de Ames poseen diferentes mutaciones en el operón de la histidina, por lo tanto, no pueden sintetizar este aminoácido. Debido a que en los últimos años se ha demostrado que algunos carcinógenos requieren de una activación metabólica se utilizó, también, la prueba de mutagenicidad de Ames modificada. La modificación consiste en ensayar el potencial mutagénico en presencia de la fracción postmitocondrial S9. Esta fracción contiene fragmentos del retículo endoplásmico y, por lo tanto, la mayor parte de las monooxigenasas requeridas para activar mutágenos y carcinógenos potenciales (Maron y Ames, 1983; Reyes-López *et al.*, 2004). Los resultados de la Figura 6 indican que los tratamientos del extracto íntegro de *B. veronicaefolia* contra las cepas de *Salmonella typhimurium* no ocasionaron la reversión puntual del sitio donde se encuentra la mutación original de la His<sup>r</sup>. En consecuencia, la especie no es mutagénica.

Para establecer la eficacia de cualquier producto de uso terapéutico deben realizarse experimentos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro* y los estudios clínicos



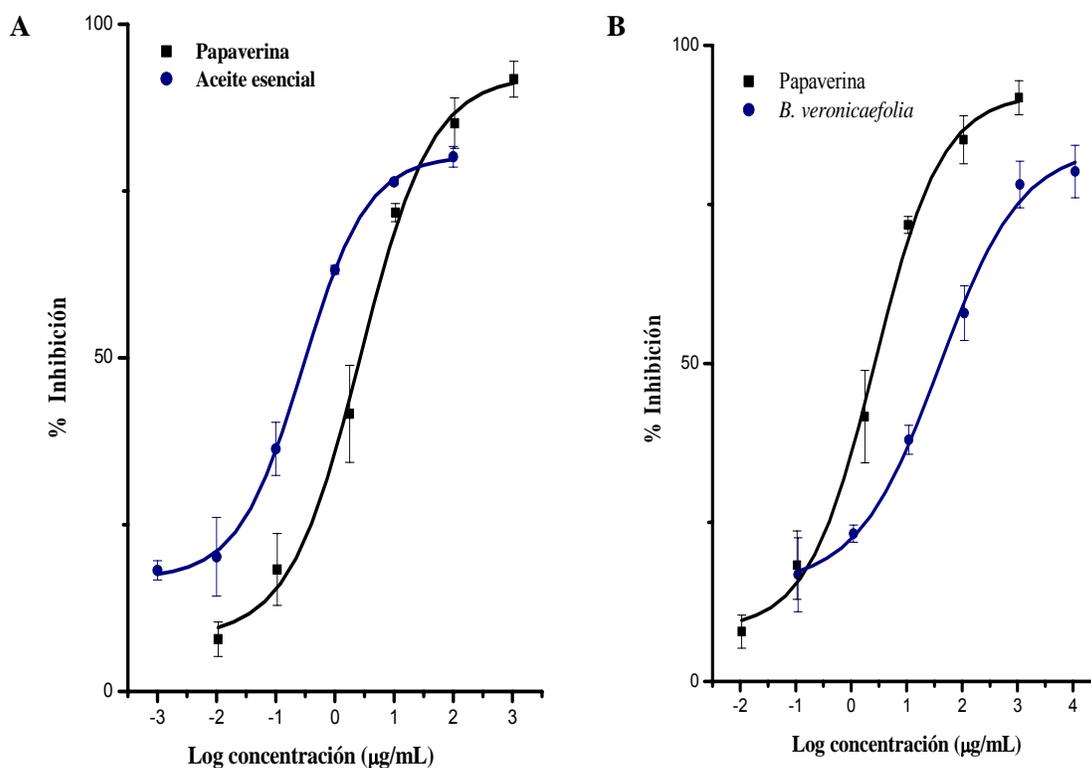
**Figura 6.** Efecto del extracto orgánico de *B. veronicaefolia* contra las cepas modificadas de *Salmonella typhimurium* (A: cepa TA98; B: cepa TA100 y C: cepa TA102).

pertinentes (OMS, 2002). Los ensayos se seleccionan de acuerdo a los usos mejor documentados de las hierbas en las prácticas médicas tradicionales. Al igual que en el caso de la toxicidad, la OMS considera que el uso prolongado de una hierba puede constituir el mejor testimonio de su eficacia. En el presente trabajo, sin embargo, se decidió determinar el potencial espasmolítico de *B. veronicaefolia* mediante experimentos *in vitro*. Cabe mencionar que los posibles efectos analgésicos, relacionados también con el uso popular de la planta, se establecieron en otra investigación mediante el empleo de modelos animales (Ángeles y Castañeda, 2006).

El extracto y la esencia se ensayaron para determinar su potencial espasmolítico utilizando como modelo farmacológico el íleon aislado de cobayo. Este ensayo consiste en determinar la relajación de la musculatura lisa del íleon provocada por la sustancia de prueba. Para ello, se determina el efecto de la misma sobre las contracciones espontáneas o inducidas del intestino de cobayo. El resultado de esta determinación indicó que los dos preparados de *B. veronicaefolia* ensayados en este trabajo inducen la relajación de las contracciones espontáneas del íleon de cobayo de manera dependiente de la concentración (Figura 7). Los valores de  $CI_{50}$  calculados fueron de 39.22 y 0.27  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. El efecto fue mayor que el de la papaverina, conocido agente espasmolítico, utilizado como control positivo. Con base en estos resultados se estableció que *B. veronicaefolia* contiene principios espasmolíticos.

## **5.2 Obtención y caracterización de los principios activos presentes en el extracto y aceite esencial.**

Con la finalidad de obtener los constituyentes espasmolíticos se realizó un estudio fitoquímico biodirigido. Este tipo de estudio ha demostrado en diversas ocasiones ser el más eficiente para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos de interés medicinal (Ghisalberti, 1993; Hamburger y Hostettman, 1991; Kinghorn *et al.*, 1995; *inter alia*). El extracto activo (230 g,  $CI_{50} = 39.22 \mu\text{g/mL}$ ) se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante particiones sucesivas del extracto íntegro



**Figura 7.** Curvas concentración-respuesta del (A) extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) y (B) la esencia de *B. veronicaefolia*.

suspendido en MeOH acuoso (50%) con hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt. La actividad espasmolítica se encontró en las fracciones hexánica (F<sub>I</sub>) y de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (F<sub>II</sub>). El aislamiento y purificación de los compuestos presentes en las fracciones primarias activas (F<sub>I</sub> y F<sub>II</sub>) se realizó mediante el empleo de las cromatografías en columna abierta y de líquidos de alta eficiencia. El proceso global condujo al aislamiento y la purificación de 16 metabolitos secundarios (Figura 8), tres de los cuales se describen por vez primera y doce son novedosos en la especie. Los compuestos aislados se caracterizaron como: ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico (**18**), ácido 2-metoxibenzoico (**19**), β-D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo (**20**), β-D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**),

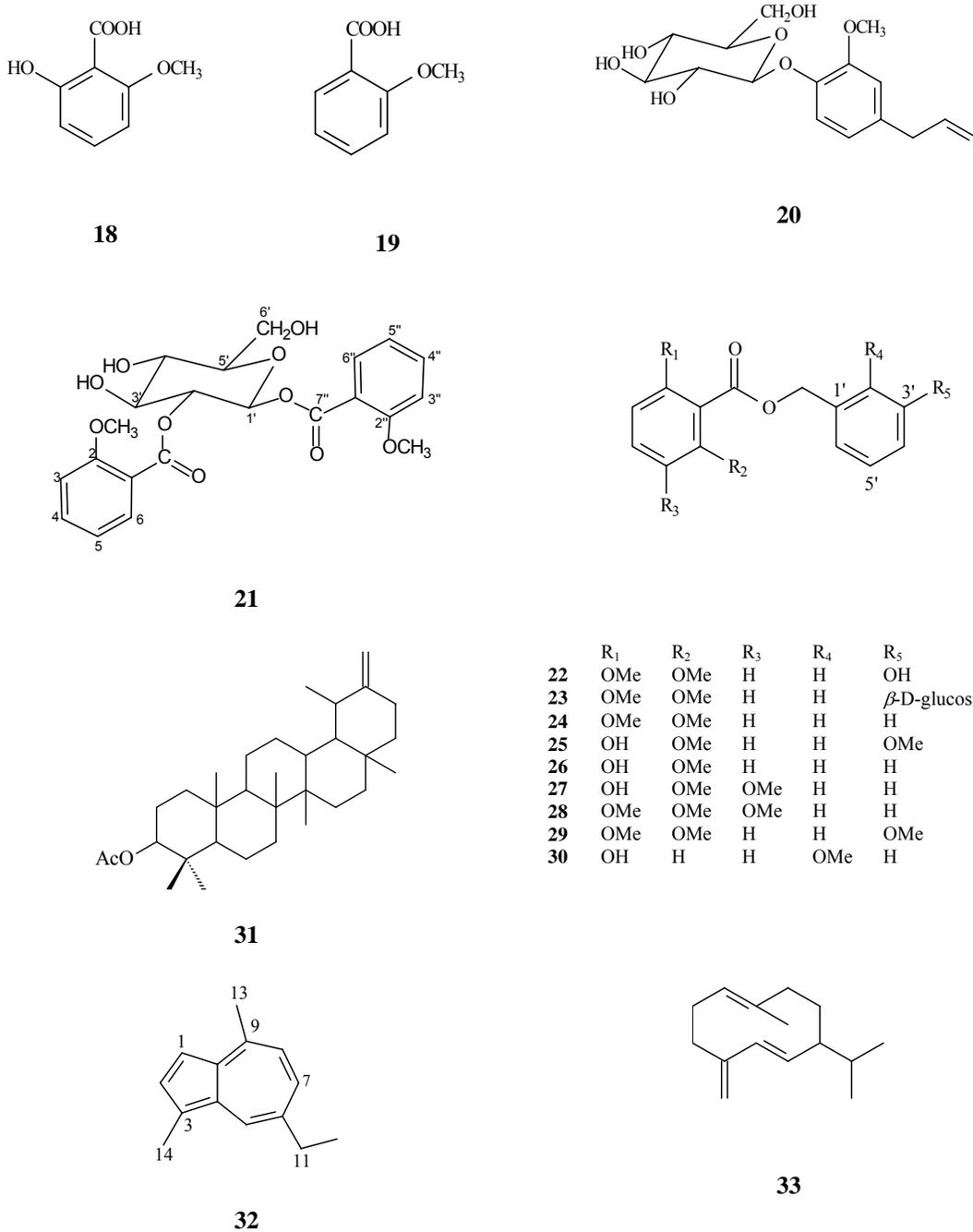
2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**), 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**), 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**25**), 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo (**26**), 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**27**), 2,5,6-trimetoxibenzoato de bencilo (**28**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), acetato de taraxasterilo (**31**), camazuleno (**32**) y germacrano D (**33**) (Andrade *et al.*, 1991; Bartelli *et al.*, 1968; Bohlmann *et al.*, 1976; 1981; Fujita *et al.*, 1992; Kodpinid *et al.*, 1984; Lu *et al.*, 1993; Palazzino *et al.*, 2000; Ragasa *et al.*, 2002; Reynolds y Sawyer, 1984; Schwab *et al.*, 1990; Tamayo-Castillo *et al.*, 1988; Yueh-Hsiung *et al.*, 2002). Los productos naturales novedosos son el **21**, **22** y **23** en tanto que el triterpenoide **31** fue descrito como un metabolito de la especie por Calderón y colaboradores (1980).

### 5.2.1 Caracterización estructural de los productos naturales novedosos.

La elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. La elucidación de las estructuras de los tres compuestos novedosos se discutirá con detalle en esta sección.

El  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**) se obtuvo como un aceite amarillo (20 mg). Su fórmula molecular se estableció por EM modalidad FAB positivo como C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub> que permite un índice de deficiencia de hidrógenos de 11. El espectro en el IR indica la presencia de grupos hidroxilo (3400 cm<sup>-1</sup>) y carbonilo de éster (1732 cm<sup>-1</sup>). El análisis cromatográfico de los productos obtenidos al tratar una pequeña cantidad del producto natural con KOH (5%) permitió detectar a la glucosa y al ácido 2-metoxibenzoico (**19**), aislado también como producto natural en el presente estudio.

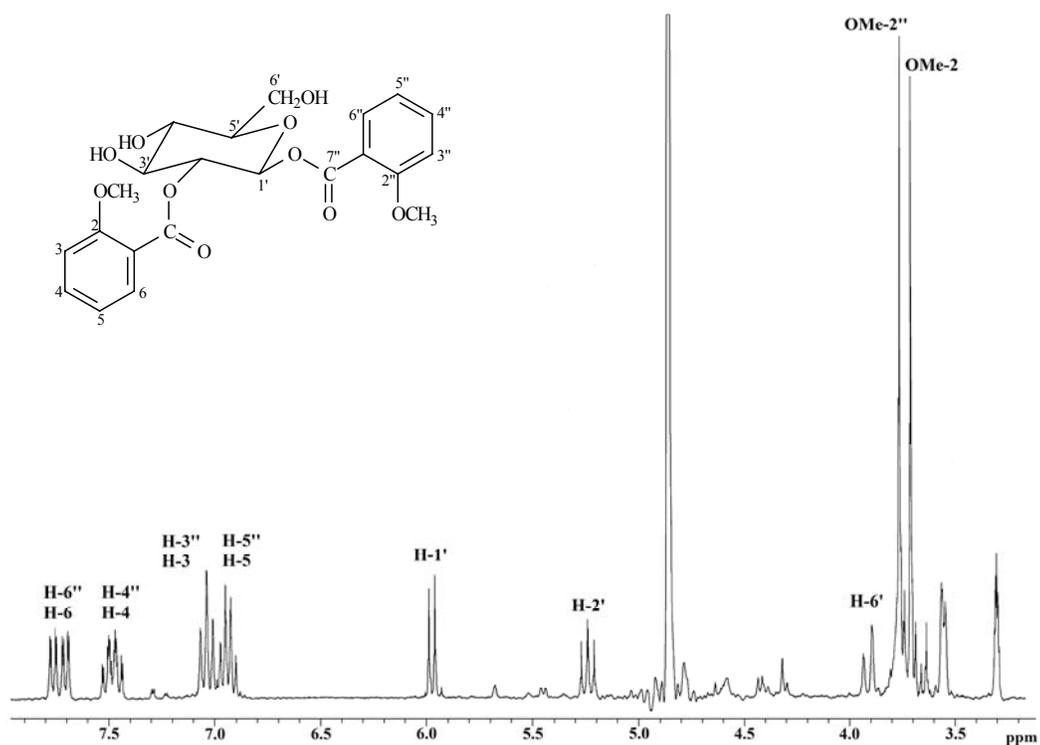
Las características más importantes observadas en los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C del producto **21** se resumen a continuación:



**Figura 8.** Compuestos aislados de *B. veronicaefolia*.

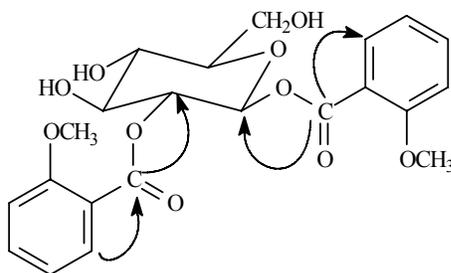
1. En la región aromática del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 1) se aprecia un conjunto de señales para dos anillos aromáticos disustituidos asignables a ocho protones en  $\delta_{\text{H}}$  7.02 (H-3), 7.47 (H-4), 6.92 (H-5), 7.70 (H-6), 7.05 (H-3''), 7.50 (H-4''), 6.95 (H-5'') y 7.76 (H-6'') los cuales correlacionan en el espectro HMQC con las absorciones en  $\delta_{\text{C}}$  114 (C-3), 136 (C-4), 122 (C-5), 133 (C-6), 114.1 (C-3''), 137 (C-4''), 121.9 (C-5'') y 134 (C-6''). Además, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 2) presenta señales para cuatro carbonos cuaternarios [ $\delta_{\text{C}}$  120 (C-1''), 122 (C-1), 161 (C-2) y 162 (C-2'')] y en la zona de los carbonilos dos señales en  $\delta_{\text{C}}$  166.4 (C-7) y 168.1 (C-7''). Los desplazamientos químicos de las señales en  $\delta_{\text{C}}$  161 y 162 sugieren carbonos unidos a funciones oxigenadas.
2. En la región comprendida en el intervalo  $\delta_{\text{C}}$  54-97 en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y  $\delta_{\text{H}}$  2.5-5.97 en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se aprecian señales para una unidad de glucosa [ $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  63.1/3.92, 72.1/3.56, 75.3/5.24, 76.8/3.78, 80.0/3.56, 94.7/5.97] y dos metoxilos ( $\delta_{\text{H}}$  3.63 y 3.70;  $\delta_{\text{C}}$  57.1) unidos a carbonos aromáticos. El valor de los desplazamientos químicos de los carbonos anomérico y C-2' sugiere que los residuos del ácido 2-metoxibenzoico se encuentran esterificando los hidroxilos en C-1' y C-2' (Cuadro 5).

El análisis de los cuadros de conectividad en el espectro HMBC (Espectro 3) del producto natural permitió corroborar las posiciones de esterificación en el residuo de glucosa ya que el grupo carbonilo de uno de los residuos de ácido 2-metoxibenzoico correlaciona con el hidrógeno anomérico, en tanto que el carbonilo del segundo residuo del ácido correlaciona con H-2'. Los carbonos C-7 y C-7'' correlacionan también con H-6'' y H-6 corroborando la ubicación de los grupos metoxilo *orto* al carbonilo de la función éster (Figura 9). El valor de la constante de acoplamiento ( $J$ ) entre H-1' y H-2' (8.4 Hz) es congruente con su relación *trans-diaxial* y, por ende, con la orientación *ecuatorial* de los residuos de benzoilo.

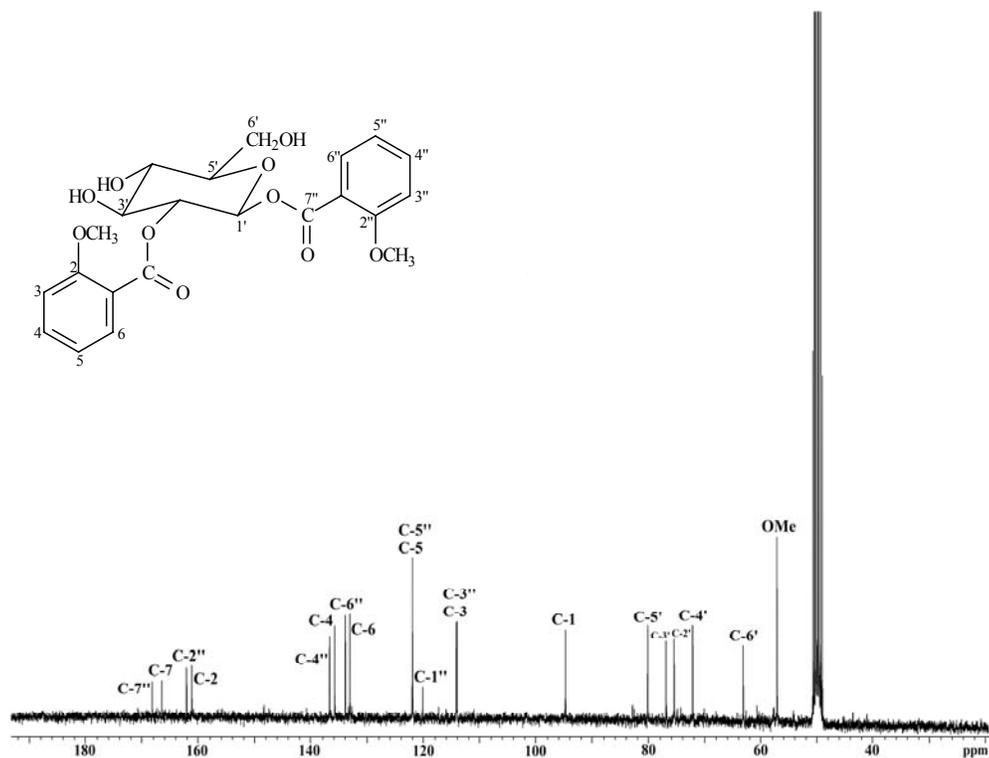


**Espectro 1.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**, en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

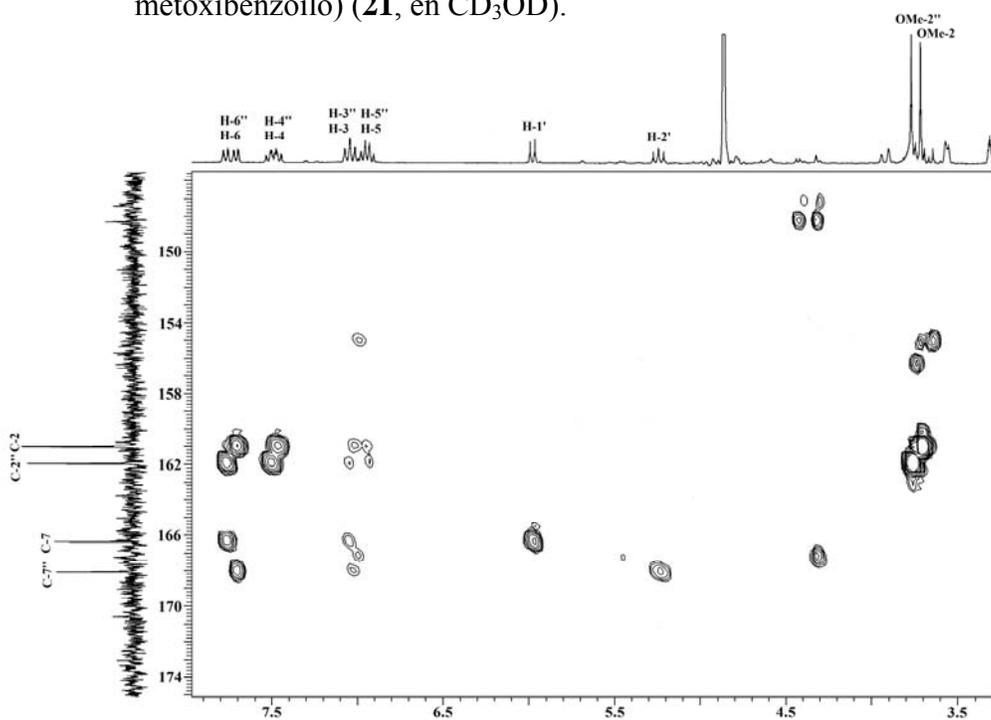
Con base en las evidencias presentadas el nuevo producto natural se caracterizó como el  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**).



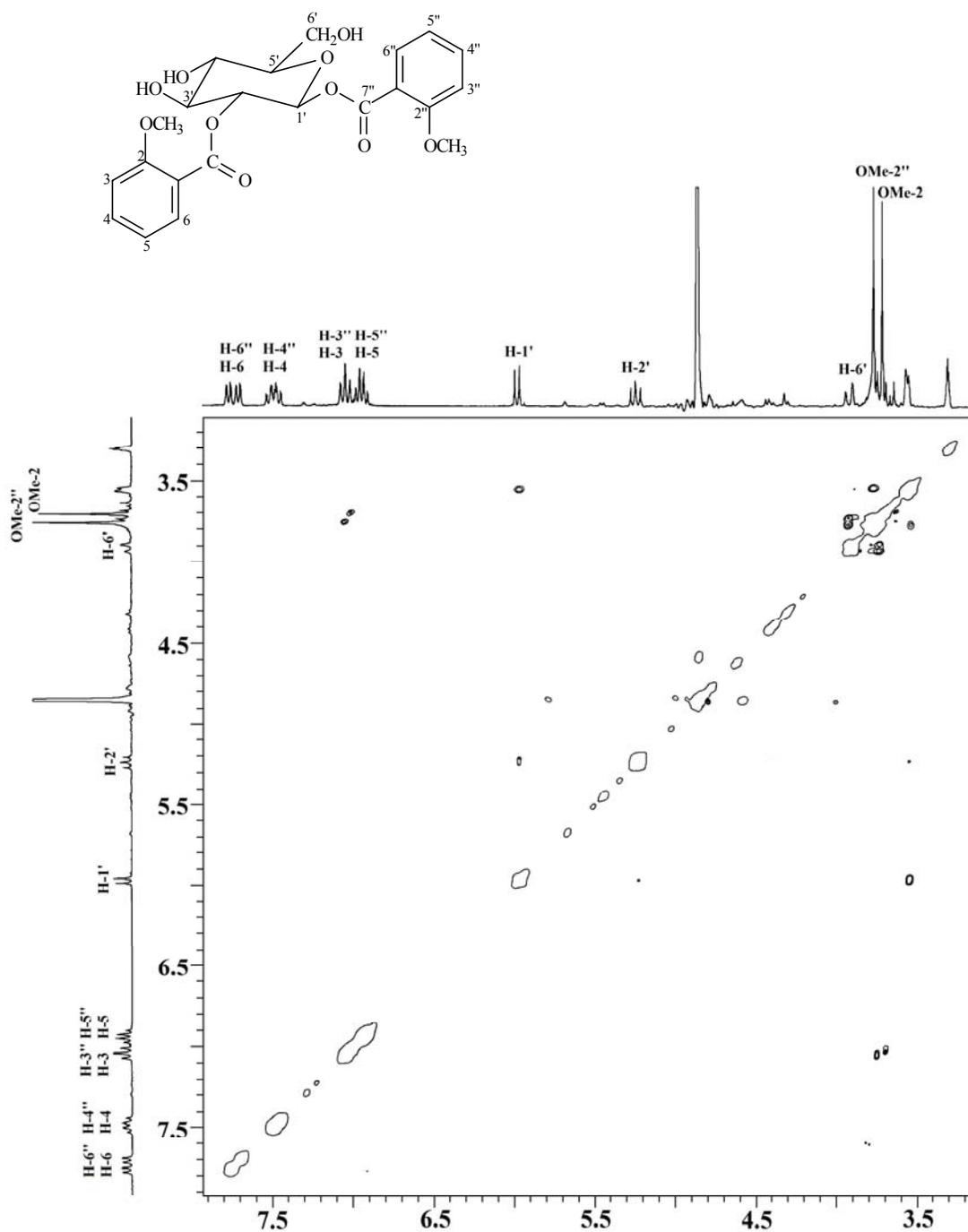
**Figura 9.** Correlaciones más importantes observadas en el espectro bidimensional de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -HMBC del compuesto **21**.



**Espectro 2.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**, en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Espectro 3.** Vista parcial del espectro HMBC del  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**).



**Espectro 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  NOESY del  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-O-(2-metoxibenzoilo) (21).

**Cuadro 5.** Desplazamientos químicos obtenidos en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) (**21**).

POSICIÓN	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1		122.0	3
2		161.1	4, 6
3	7.02 da ( $J = 9.0$ )	114.0	1, 5
4	7.47 ddd ( $J = 9.0, 8.4, 1.8$ )	135.7	2, 6
5	6.92 dda ( $J = 8.4, 7.8$ )	121.9	3
6	7.70 dd ( $J = 7.8, 1.8$ )	133.0	2
7		166.4	2', 6
1'	5.97 d ( $J = 8.4$ )	94.7	2'
2'	5.24 dd ( $J = 9.9, 8.4$ )	75.3	3'
3'	3.78 m	76.8	2'
4'	3.56 m complejo	72.1	3', 6'a
5'	3.56 m complejo	80.0	3', 4', 6'b
6'	3.92 da ( $J = 12.0$ ); 3.78 m	63.1	5'
1''		120.1	3''
2''		162.0	4'', 6''
3''	7.05 da ( $J = 9.0$ )	114.1	5'', 1''
4''	7.50 ddd ( $J = 9.0, 8.4, 1.8$ )	136.6	2'', 6''
5''	6.95 dda ( $J = 8.4, 7.8$ )	121.9	3''
6''	7.76 dd ( $J = 7.8, 1.8$ )	133.8	2''
7''		168.1	1', 6''
OMe-2	3.63 s	57.1	
OMe-2'	3.70 s	57.1	

$\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $J$  en Hz,  $\delta$  en ppm],  $^{13}\text{C}$  [75.4 MHz,  $\delta$  en ppm].

El espectro en el IR generado por el 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**) presenta bandas de absorción asociadas a grupos hidroxilo ( $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ) y al carácter aromático ( $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) de la molécula.

Los espectros de RMN del producto **23** son muy similares a los del producto **29** (Cuadro 6, Espectros 6, 7, 9 y 10). La principal diferencia radica en la presencia en los espectros de **23** de señales asociadas con un residuo 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi en lugar de las correspondientes al grupo metoxilo en C-3'. Así, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan seis señales adicionales en la zona comprendida en el intervalo  $\delta_{\text{C}}$  68-101. El desplazamiento químico observado para los carbonos del azúcar sugiere que la glucosa se une a la aglicona a través del hidroxilo anomérico. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observan además de las señales presentes en el producto **29** las siguientes:

1. En  $\delta_H$  4.87 se aprecia un doblete ( $J = 7.5$  Hz) atribuible al hidrógeno anomérico del azúcar. El valor de la constante de acoplamiento permite inferir que la orientación del H-1" es  $\alpha$ , en consecuencia el enlace glucosídico es  $\beta$ .
2. En  $\delta_H$  3.69 (dd,  $J = 11.7, 1.5$  Hz) y 3.45 (dd,  $J = 11.7, 3.9$  Hz) se observan las señales diagnósticas para el hidroximetileno de la  $\beta$ -D-glucosa como un sistema AB.
3. Por último, en el rango comprendido entre  $\delta_H$  3.1-3.5 se observan las señales para los restantes hidrógenos de la porción sacárida.

Con base en estas evidencias, el producto **23** se identificó como el 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el cual es un glucósido novedoso del producto **29**.

El 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**) se obtuvo como un sólido cristalino blanco (200 mg). Su fórmula molecular se estableció por EMIE como  $C_{16}H_{16}O_5$  y permite nueve grados de insaturación. El espectro en el IR presenta como características relevantes bandas asociadas con la presencia de aromaticidad (2935, 1468  $cm^{-1}$ ) y grupos hidroxilo (3370  $cm^{-1}$ ). Los espectros unidimensionales generados por el producto **22** presentan nuevamente una gran similitud con los del producto **29**. Los espectros de RMN del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo **22** y **29** (Cuadro 6, Espectros 5, 7, 8 y 9) difieren en la ausencia de la señal asignable al grupo metoxilo en C-3' en los espectros del segundo. En su lugar los espectros presentaron una señal para una función carbinólica en  $\delta_H/\delta_C$  10/155.6. La disposición de los sustituyentes en el núcleo base se confirmó mediante el análisis de los espectros bidimensionales NOESY y HMBC. De manera adicional, el tratamiento del compuesto **22** con una solución etérea de diazometano generó un producto idéntico en todos sus aspectos (pf, IR, RMN  $^1H$  y  $^{13}C$ ) al producto natural **29**. En consecuencia, el producto **22** se caracterizó como el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo, metabolito secundario novedoso.

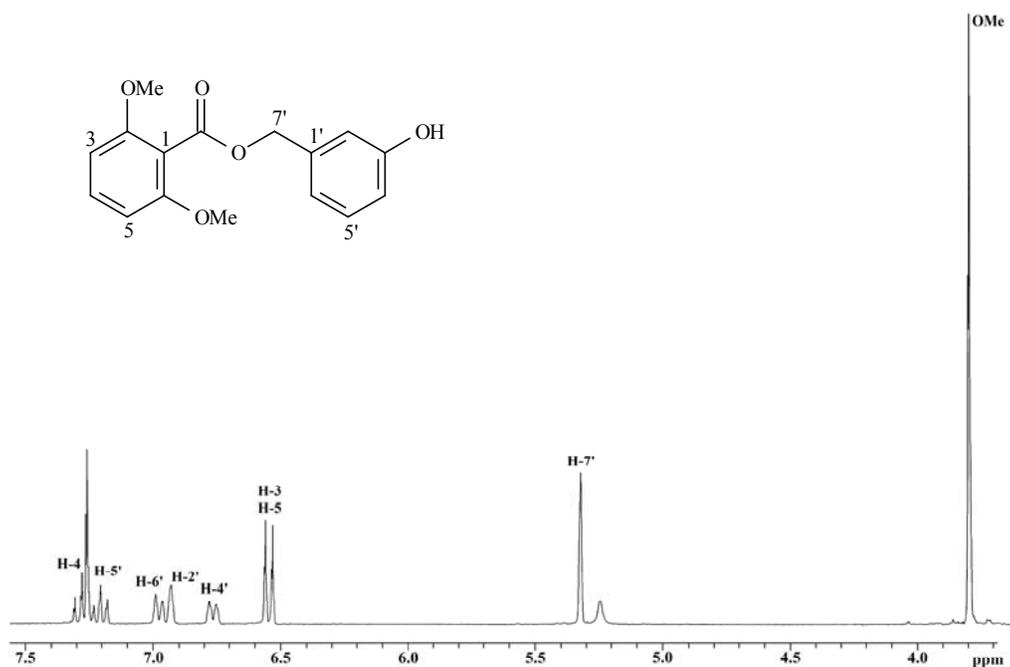
**Cuadro 6.** Desplazamientos químicos en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del: 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**), 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**) y 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**).

POSICIÓN	<b>23</b>		<b>22</b>		<b>29</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		114.1		112.7		113.5
2		158.5		157.3		157.5
3	6.65 d ( $J = 8.4$ )	105.0	6.55 d ( $J = 8.4$ )	103.9	6.55 d ( $J = 8.4$ )	103.9
4	7.33 t ( $J = 8.4$ )	132.4	7.28 t ( $J = 8.4$ )	131.1	7.28 t ( $J = 8.4$ )	131.1
5	6.65 d ( $J = 8.4$ )	105.0	6.55 d ( $J = 8.4$ )	103.9	6.55 d ( $J = 8.4$ )	103.9
6		158.5		157.3		157.5
7		168.1		166.5		166.4
1'		138.8		137.7		137.7
2'	7.17 ta ( $J = 2.5$ )	117.3	6.93 ta ( $J = 2.5$ )	114.8	6.83 ta ( $J = 2.5$ )	113.5
3'		158.9		155.6		159.7
4'	7.06 dda ( $J = 8.1, 2.5$ )	117.0	6.76 dda ( $J = 8.1, 2.5$ )	114.9	6.86 dda ( $J = 8.1, 2.5$ )	113.4
5'	7.28 dd ( $J = 7.9, 8.1$ )	130.2	7.21 dd ( $J = 7.9, 8.1$ )	129.5	7.27 dd ( $J = 7.9, 8.1$ )	129.3
6'	7.07 da ( $J = 7.9$ )	122.6	6.98 da ( $J = 7.9$ )	120.1	7.01 da ( $J = 7.9$ )	120.2
7'	5.28 sa	67.4	5.32 sa	66.6	5.36 sa	66.6
1''	4.92 d ( $J = 7.5$ )	102.1				
2''	3.43 m	74.8				
3''	3.40 m complejo	78.0*				
4''	3.40 m complejo	71.1				
5''	3.40 m complejo	77.9*				
6''	3.86 dd ( $J = 11.7, 1.5$ )	62.3				
	3.69 dd ( $J = 11.7, 3.9$ )					
OH (3')			10 sa			
OCH <sub>3</sub> (2,6)	3.80 s	56.5	3.80 s	56.0	3.80 s	55.9
OCH <sub>3</sub> (3')					3.81 s	55.2

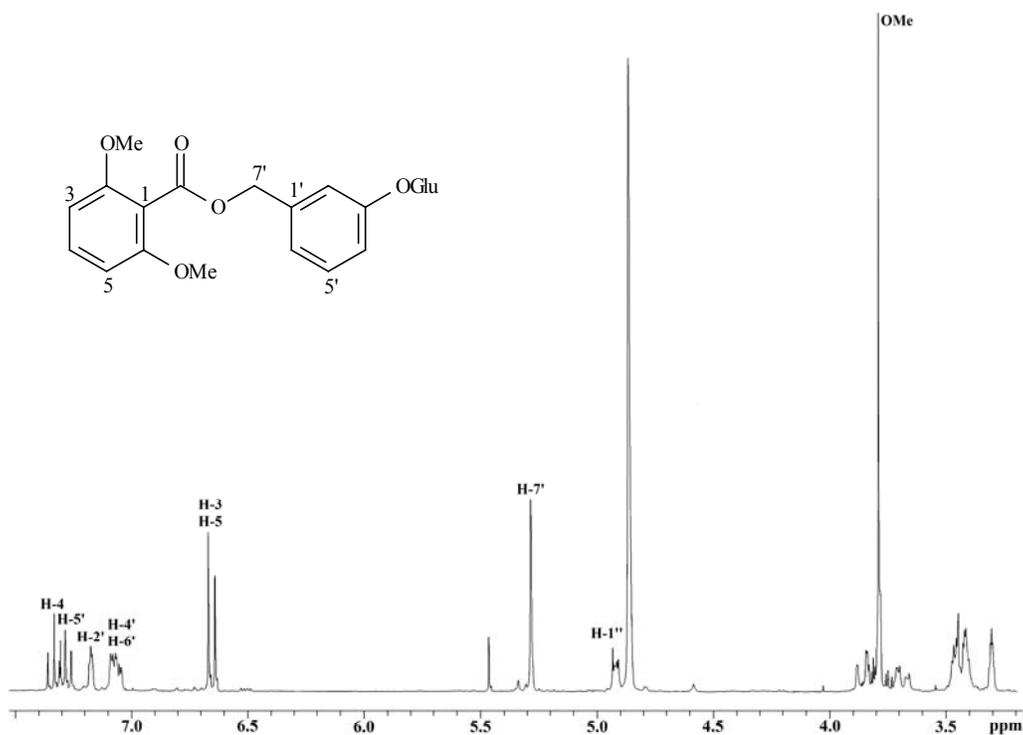
**22** y **29**,  $\text{CDCl}_3$ ,  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $J$  en Hz,  $\delta$  en ppm],  $^{13}\text{C}$  [75.4 MHz,  $\delta$  en ppm].

**23**,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $J$  en Hz,  $\delta$  en ppm],  $^{13}\text{C}$  [75.4 MHz,  $\delta$  en ppm].

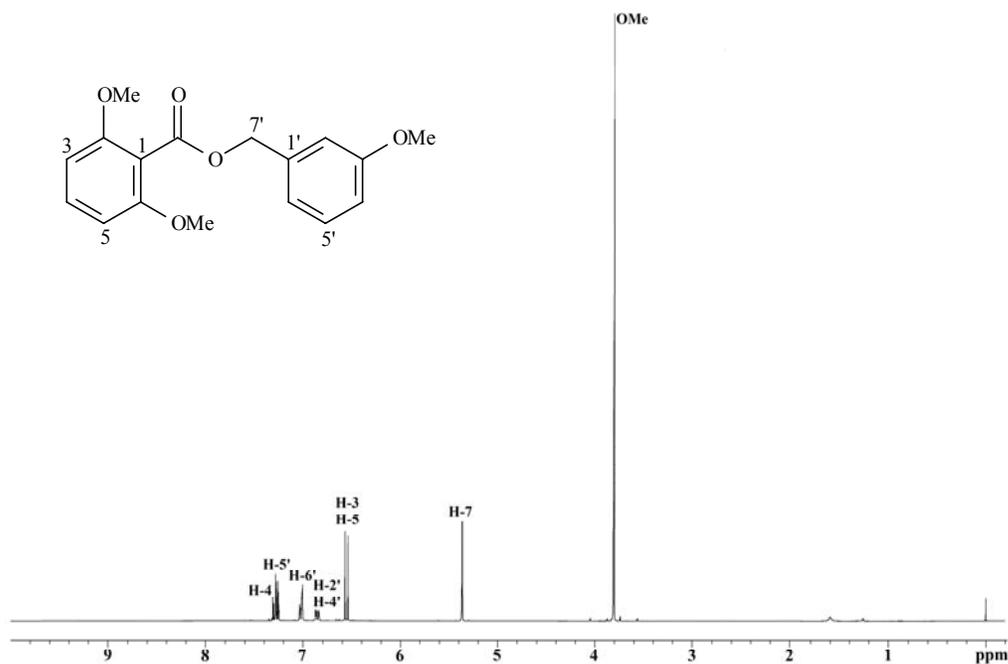
\*Señales intercambiables.



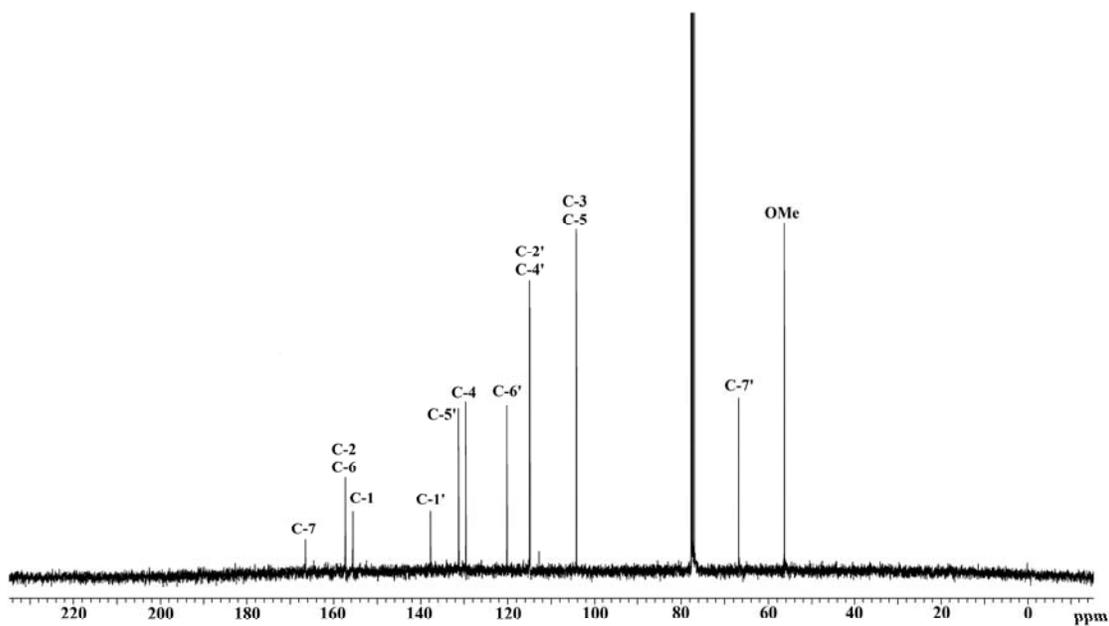
**Espectro 5.** Vista parcial del espectro de RMN <sup>1</sup>H del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**, en CDCl<sub>3</sub>).



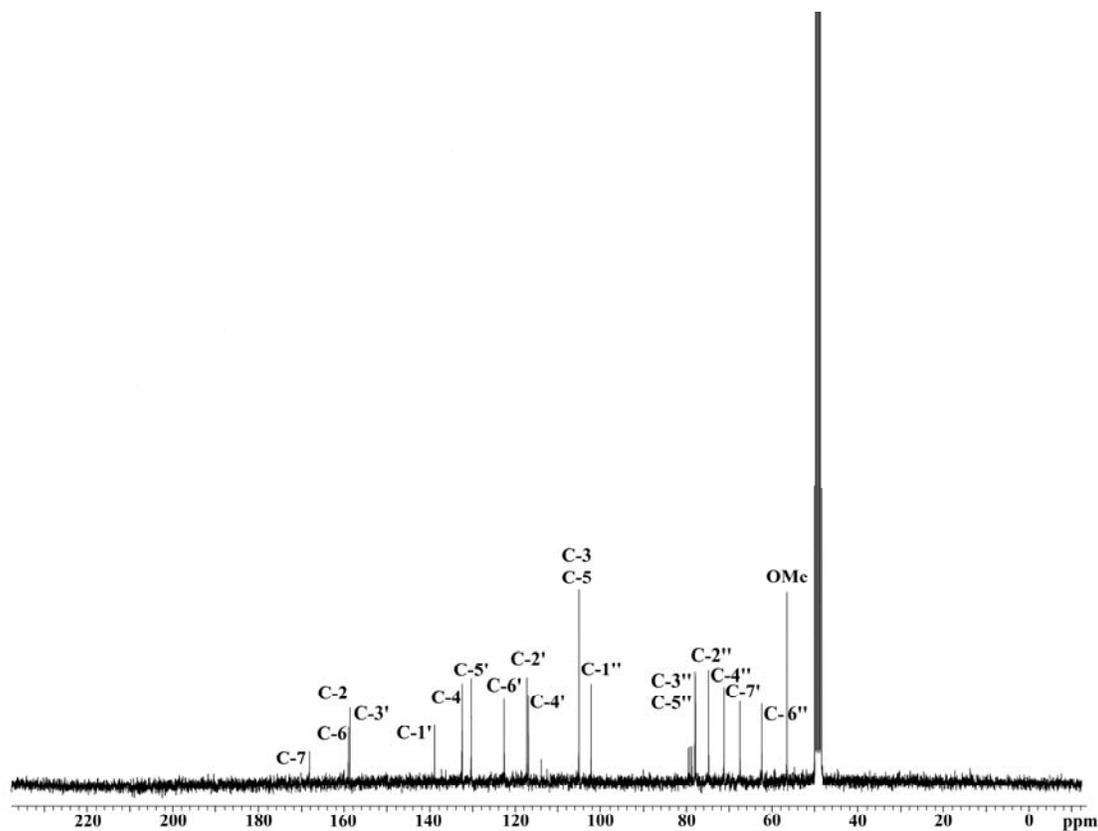
**Espectro 6.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 3'-β-D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**, en CD<sub>3</sub>OD).



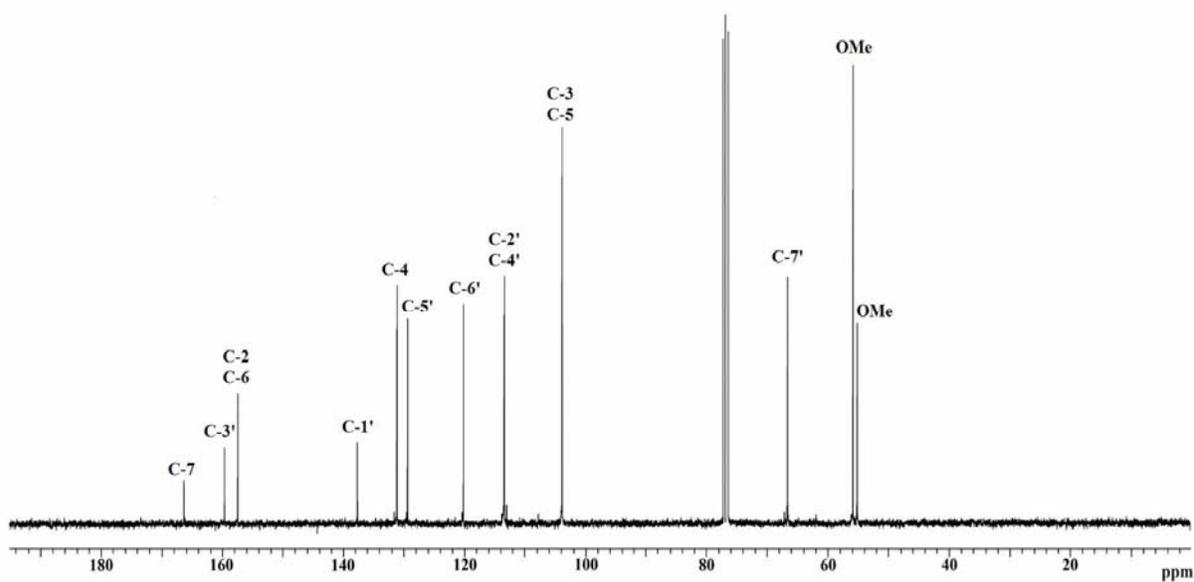
**Espectro 7.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**, en  $\text{CDCl}_3$ ).



**Espectro 8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo (**22**, en  $\text{CDCl}_3$ ).



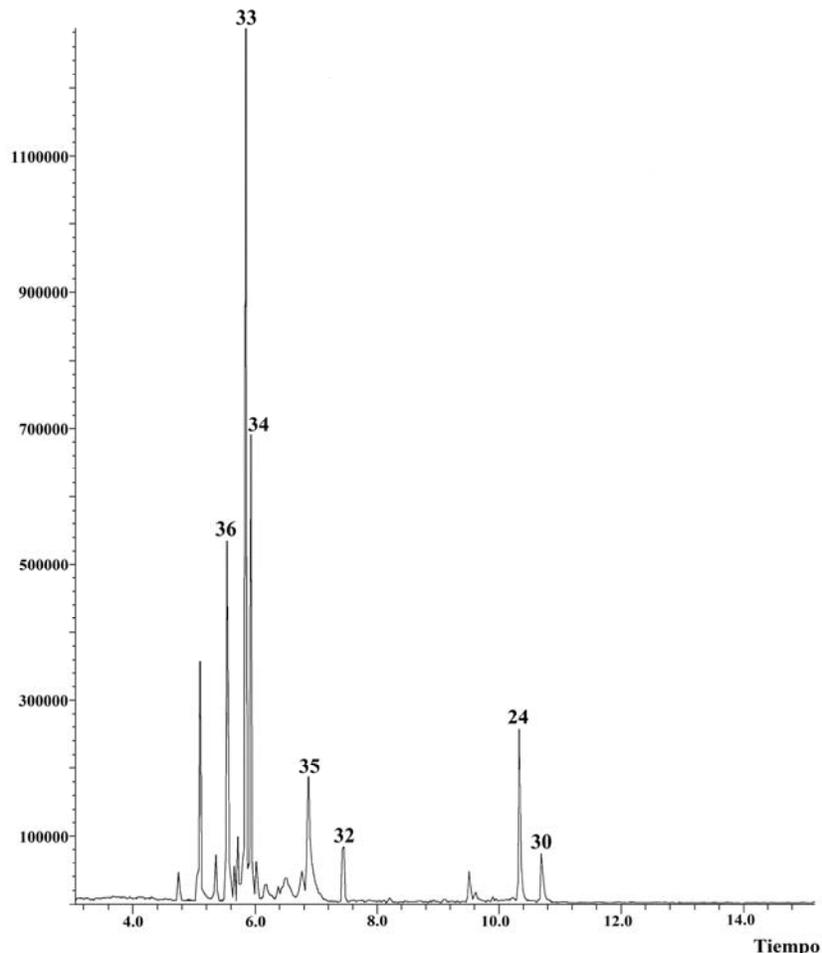
**Espectro 9.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**23**, en  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Espectro 10.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo (**29**, en  $\text{CDCl}_3$ ).

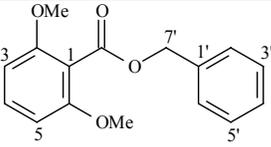
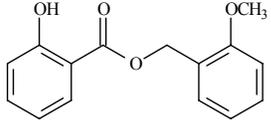
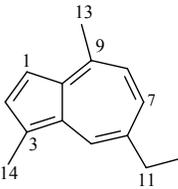
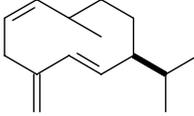
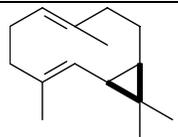
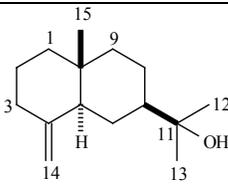
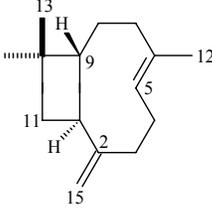
### 5.2.2 Composición química de la esencia de *Brickellia veronicaefolia*.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó en primera instancia mediante un análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). El cromatograma de gases resultante (Figura 10) indicó claramente la presencia de siete componentes mayoritarios en la esencia. Los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo. En el Cuadro 7 se resumen los tiempos de retención y la proporción en la mezcla de cada uno de los componentes.



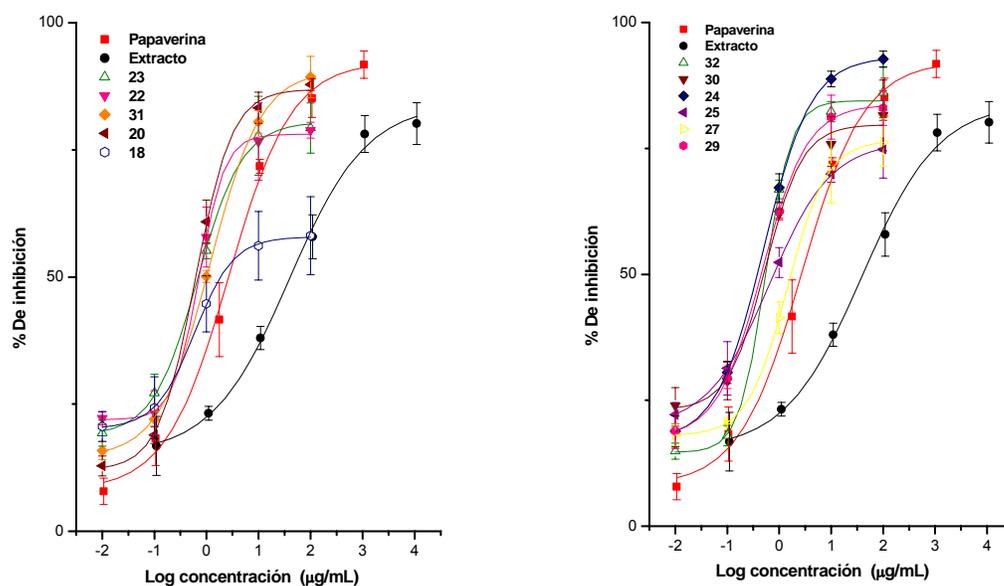
**Figura 10.** Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. veronicaefolia*. Asignación de picos: **(36)**  $\beta$ -cariofileno, **(33)** germacrano D, **(34)** biciclogermacrano, **(35)**  $\beta$ -eudesmol, **(32)** camazuleno, **(24)** 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo y **(30)** 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo.

**Cuadro 7.** Principales componentes presentes en la esencia de *Brickellia veronicaefolia*.

	$t_R$ (min)	Porcentaje en la esencia	Fórmula
 <p><b>24</b></p>	10.4	2.5	$C_{16}H_{16}O_4$
 <p><b>30</b></p>	10.7	6.7	$C_{15}H_{14}O_4$
 <p><b>32</b></p>	7.5	3.1	$C_{14}H_{16}$
 <p><b>33</b></p>	5.9	29.1	$C_{15}H_{24}$
 <p><b>34</b></p>	6.0	17.1	$C_{15}H_{24}$
 <p><b>35</b></p>	6.9	13.2	$C_{15}H_{28}O$
 <p><b>36</b></p>	5.5	14.3	$C_{19}H_{36}$

### 5.3 Evaluación del potencial espasmolítico de los metabolitos secundarios.

El potencial espasmolítico de los metabolitos secundarios obtenidos de *B. veronicaefolia* se determinó mediante la evaluación de sus efectos sobre las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo. En general, todos los productos presentan un efecto espasmolítico significativo dependiente de la concentración. En la Figura 11 se ilustran las curvas concentración-respuesta de los compuestos evaluados.



**Figura 11.** Curvas concentración-respuesta de los productos ensayados sobre la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo.

El Cuadro 8 presenta el efecto máximo ( $E_{max}$ ), la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) y la potencia de cada uno de los compuestos aislados de *B. veronicaefolia*. Todos los compuestos aislados fueron más potentes que el extracto crudo y la papaverina. Los compuestos **23** ( $CI_{50} = 1.49 \pm 0.17 \mu M$ ) y **29** ( $CI_{50} = 1.52 \pm 0.11 \mu M$ ) desarrollaron la mayor potencia en su efecto.

**Cuadro 8.** Inhibición de la contracción espontánea del íleon aislado de cobayo mostrada por los compuestos aislados a partir de la especie *Brickellia veronicaefolia*.

Compuesto	E <sub>max</sub>	CI <sub>50</sub> (μM)	Potencia
Papaverina	91.76 ± 2.65	4.23 ± 0.68	1
Extracto*	84.07 ± 1.47	39.22 ± 12.88	
<b>18</b>	58.11 ± 7.66	3.51 ± 0.04	1.2
<b>20</b>	87.77 ± 1.18	1.90 ± 0.12	2.2
<b>22</b>	78.88 ± 1.57	2.61 ± 0.24	1.6
<b>23</b>	80.34 ± 4.91	1.49 ± 0.17	2.8
<b>24</b>	93.14 ± 1.68	1.84 ± 0.11	2.3
<b>25</b>	76.50 ± 6.96	2.29 ± 0.28	1.8
<b>27</b>	76.64 ± 4.69	4.96 ± 0.39	0.8
<b>29</b>	83.62 ± 3.15	1.52 ± 0.11	2.8
<b>30</b>	78.88 ± 4.80	2.07 ± 0.16	2.0
<b>31</b>	90.18 ± 4.05	2.47 ± 0.15	1.7
<b>32</b>	83.11 ± 1.95	2.88 ± 0.08	1.5

\*El valor de CI<sub>50</sub> del extracto está expresado en μg/mL.

Los valores representan el promedio de seis réplicas ± EEM; n = 6; p < 0.05

La potencia se calculó con la fórmula: CI<sub>50</sub> (μM) papaverina / CI<sub>50</sub> (μM) compuesto, asumiendo un valor de 1.00 para la papaverina.

E<sub>máx</sub> indica el porcentaje de inhibición máximo de las muestras de prueba.

Con la finalidad de iniciar los estudios del modo de acción a nivel molecular de los principios espasmolíticos de *B. veronicaefolia* se decidió explorar su efecto sobre el complejo Ca<sup>2+</sup>- calmodulina (CaM), mismo que juega un papel central en la regulación del proceso de contracción del músculo liso. La calmodulina (CaM) es una proteína eucariótica ubicua de bajo peso molecular (~17 kd) homóloga en estructura y función a la proteína muscular troponina C. La CaM carece de actividad enzimática propia, sin embargo, su participación es importante en la transducción de señales reguladas por Ca<sup>2+</sup> a nivel celular. La CaM unida al calcio (Ca<sup>2+</sup>- CaM) sufre un cambio conformacional que le confiere la propiedad de activar un gran número de enzimas, bombas y otras proteínas diana (Berner-Hansen *et al.*, 2003; Bitar, 2003; Makhoulf *et al.*, 1997; Webb, 2003).

Además de sus efectos sobre las enzimas y el transporte de iones, el complejo Ca<sup>2+</sup>- CaM regula la actividad de numerosos elementos estructurales en las células, como el complejo actina-miosina del músculo liso que está bajo un control β-adrenérgico (Voet, 2002; Webb, 2003).

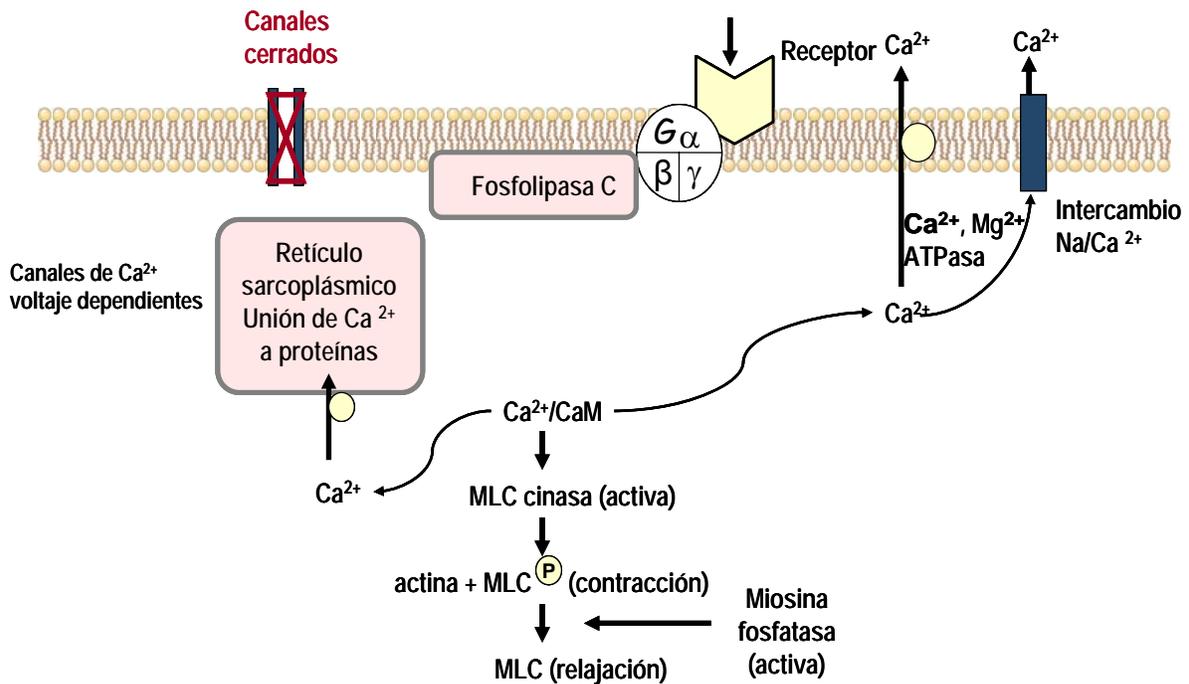
Las células del músculo liso contienen las proteínas contráctiles actina, miosina y tropomiosina. La miosina tiene una actividad ATP-asa dependiente de  $Mg^{2+}$  y se activa por la interacción con actina y CaM. La miosina es además la principal proteína de los filamentos gruesos de la célula del músculo liso y se compone de dos subunidades de elevado peso molecular y cuatro subunidades de bajo peso molecular o cadenas ligeras (Voet, 2002; Webb, 2003).

Las interacciones entre actina y miosina en el músculo liso se encuentran reguladas por  $Ca^{2+}$  mediante diferentes mecanismos bioquímicos. Durante el inicio de la contracción, la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular aumenta mediante la activación de canales de  $Ca^{2+}$  membranales (principalmente canales tipo L) y/o mediante la liberación de  $Ca^{2+}$  a partir de depósitos intracelulares. En la regulación de los filamentos gruesos, el  $Ca^{2+}$  se une a la CaM, y el complejo  $Ca^{2+}$ -CaM se une y activa una cinasa de la cadena ligera de la miosina. La activación de esta cinasa resulta en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (cadena ligera P) con la consiguiente estimulación de la actividad ATPasa del complejo actina-miosina. El enlace a través de puentes cruzados generados por la interacción entre la miosina y la actina generan la fuerza contráctil. De lo anterior, se desprende el importante papel que tiene la CaM durante la fase inicial de la contracción. Cuando la concentración de calcio intracelular disminuye y se incrementa la actividad de la miosina fosfatasa de la cadena ligera, el proceso de contracción se revierte automáticamente. La Figura 12 resume este proceso (Berner-Hansen *et al.*, 2003; Bitar, 2003; Hernández *et al.*, 2004; Makhlouf *et al.*, 1997; Webb, 2003).

La unión de CaM a sus proteínas diana es impedida por su interacción con ciertos fármacos y numerosos metabolitos secundarios. Entre los fármacos más importantes se encuentran los antipsicóticos derivados de la fenotiazina como la clorpromazina y la trifluoroperazina. Estos productos provocan una relajación importante de la musculatura lisa. Otros fármacos que interaccionan con la CaM son los antimicóticos derivados del miconazol, el alcaloide vinblastina y sus congéneres antitumorales, la polimixina B, la ofiobolina A y la melitina, por tan sólo mencionar algunos (Harmat *et al.*, 2000;

Hegemann *et al.*, 1991; Ichimura *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1984; Nakanishi *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1997; Sugimura *et al.*, 1997; Vasta *et al.*, 2004).

Para detectar inhibidores de la CaM se utilizan diversos procedimientos que incluyen: la electroforesis, los métodos enzimáticos, el dicroísmo circular y las técnicas de fluorescencia, por mencionar los más importantes (Harmat *et al.*, 2000; Hegemann *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1997).



**Figura 12.** Mecanismos que controlan la contracción y relajación del músculo liso intestinal.

En general, los métodos enzimáticos consisten en determinar la actividad de enzimas dependientes de CaM en presencia del compuesto de prueba. La enzima fosfodiesterasa del AMPc (PDE1), en particular, la de cerebro de bovino es quizás la enzima más utilizada para detectar inhibidores de CaM. Las fosfodiesterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. Se conocen por lo

menos once familias de fosfodiesterasas que incluyen más de 30 isoformas, pero sólo las enzimas de tipo PDE1 son dependientes de CaM. Las isoenzimas poseen propiedades cinéticas e inmunológicas similares pero se diferencian, entre otras características, por su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  y CaM (Harmat *et al.*, 2000; Hegemann *et al.*, 1991; Ichimura *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1984; Nakanishi *et al.*, 1990; Sharma *et al.*, 1997; Sugimura *et al.*, 1997; Vasta *et al.*, 2004). Otras enzimas dependientes de CaM utilizadas para detectar antagonistas de la proteína son la MLCK, la adenilato ciclasa y la proteína fosfatasa (calcineurina).

En el presente trabajo, el efecto de los compuestos activos sobre la proteína CaM se determinó mediante un método enzimático *in vitro*; como enzima monitora se utilizó la PDE1 de cerebro de bovino. La actividad de la PDE1 en presencia de CaM se analizó de acuerdo con la metodología descrita por Sharma y Wang (1979). Este método correlaciona la actividad de la enzima con la cantidad de fosfato producido durante la reacción de hidrólisis del AMPc en presencia de la enzima 5'-nucleotidasa de *Crotalus atrox*. El método se seleccionó con base en su alta frecuencia de uso y considerando la facilidad para su implementación y bajo costo con relación a los otros procedimientos. Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de los productos naturales sobre la actividad de la PDE1 se indican en el Cuadro 9. Como se desprende de estos resultados los benzoatos de bencilo **24**, **25** y **30** inhiben la actividad del complejo PDE1-CaM- $\text{Ca}^{2+}$  con respecto al control. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  oscilan entre 10.6-23.7  $\mu\text{M}$ . En la Figura 13 se ilustra la curva concentración-respuesta del compuesto más activo.

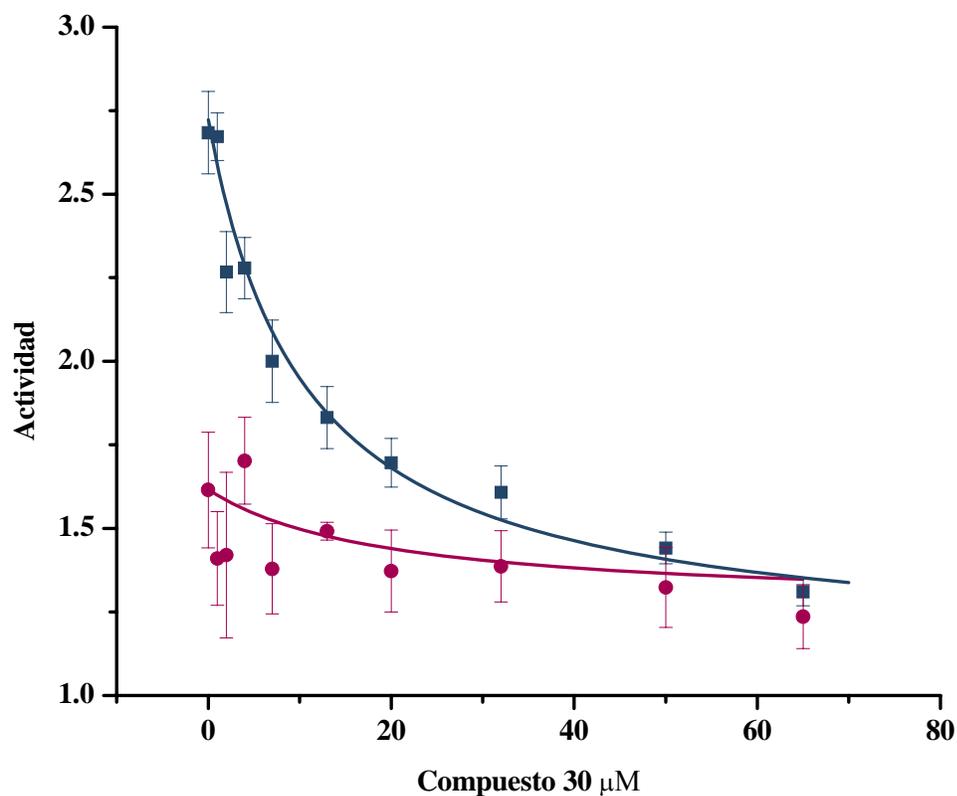
Con la finalidad de investigar si el mecanismo de inhibición ejercido por los productos es de tipo competitivo o no competitivo se realizaron los experimentos conducentes a determinar las constantes de inhibición ( $K_i$ ) de los productos **24**, **25** y **30**. Los resultados de estos experimentos indican claramente que los tres compuestos ensayados actúan como antagonistas competitivos de la CaM ( $K_i = 18.42 \pm 4.36$ ,  $18.59 \pm 6.16$  y  $13.43 \pm 0.06 \mu\text{M}$ , respectivamente). En la Figura 14 se ilustra, a manera de ejemplo, la curva concentración-respuesta del compuesto **30**.

**Cuadro 9.** Inhibición de la actividad de la enzima fosfodiesterasa del AMPc dependiente de calmodulina mostrada por los compuestos aislados.

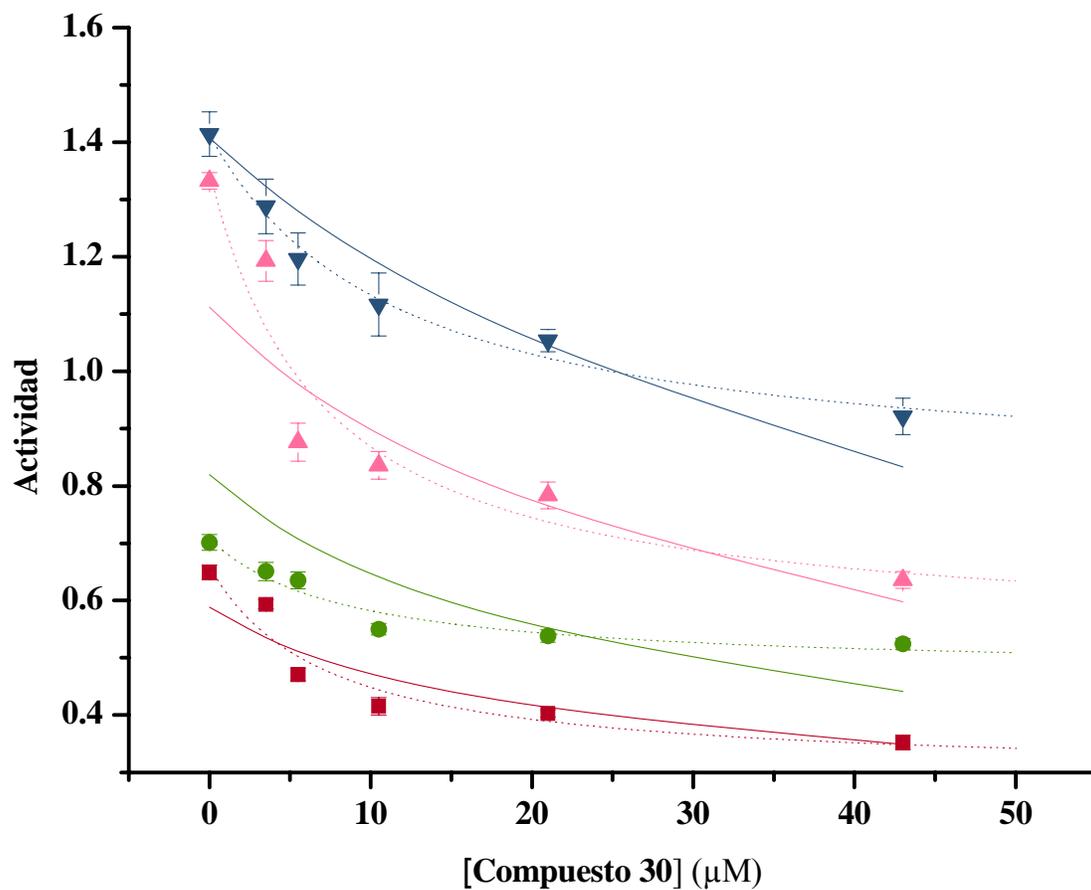
Compuesto	CI <sub>50</sub> (μM)	Clorpromazina CI <sub>50</sub> (μM)	Potencia relativa
18	> 100	----	----
22	67.51 ± 12.36	6.09 ± 2.35	0.10
23	> 100	----	----
24	12.02 ± 4.68	12.31 ± 4.76	1.02
25	14.59 ± 5.27	14.61 ± 3.55	1.00
27	21.01 ± 3.19	11.15 ± 3.65	0.53
28	23.73 ± 4.01	19.35 ± 2.97	0.80
29	46.95 ± 11.18	11.68 ± 4.76	0.24
30	10.61 ± 2.84	19.35 ± 2.97	1.83
32	18.24 ± 5.46	11.15 ± 3.65	0.61

Los valores representan el promedio de seis réplicas ± EEM; n = 6; p < 0.05

La potencia se calculó con la fórmula: CI<sub>50</sub> (μM) clorpromazina / CI<sub>50</sub> (μM) compuesto.



**Figura 13.** Efecto de diferentes concentraciones del compuesto 30 (●) y de la clorpromazina (■) sobre la actividad del complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM-PDE1.



**Figura 14.** Efecto de diferentes concentraciones del compuesto **30** sobre la actividad del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-PDE1 en presencia de diferentes concentraciones de calmodulina (■ 25, ● 50, ▲ 100 y ▼ 200 ng).

#### **5.4 Establecimiento de las pruebas de control de calidad de la droga cruda.**

Las preparaciones vegetales comprenden materiales vegetales enteros o triturados, extractos, tinturas, jugos, gomas, resinas, y aceites esenciales estabilizados o no. El control de calidad de estos productos comprende la identificación del material y sus componentes (pruebas de identidad), la determinación de su pureza y la cuantificación del contenido de principios activos o compuestos marcadores (pruebas de composición).

Asegurar la calidad de los preparados herbolarios es un proceso difícil debido a que los mismos están constituidos por mezclas complejas de compuestos químicos, incluyendo los activos. En algunos casos, los principios activos pertenecen a una sola categoría de productos naturales, sin embargo, en otros son de diversa naturaleza, dificultando por lo tanto, el establecimiento de las estrategias para su identificación y cuantificación. Además, el contenido de metabolitos secundarios en las plantas, está sujeto a variaciones dependiendo de su distribución y ontogenia, por lo tanto, la calidad de diferentes lotes de una droga cruda, es variable.

Cuando se conocen los principios activos, las pruebas de composición enmarcadas en el proceso de control de calidad, se basan en la determinación cuantitativa de los mismos. Sin embargo, en la mayoría de los casos los componentes activos son desconocidos, ya que son pocas las plantas medicinales que han cursado por las diferentes etapas del proceso de investigación que permiten atribuir la actividad terapéutica de la misma a un producto en particular o a un grupo de constituyentes definidos. Aún más, la experiencia señala que el uso de plantas medicinales enteras y sus extractos tienen beneficios reales a largo plazo, ya que los componentes de las mismas actúan conjuntamente unos con otros. No obstante, hay muy poca investigación sobre las plantas enteras porque el proceso de aprobación de medicamentos no da cabida a mezclas indiferenciadas de productos químicos naturales, por lo tanto la función colectiva de los mismos es incierta.

De lo anterior se desprende que cuando los principios activos son desconocidos las pruebas de composición se establecen con base en el contenido de compuestos marcadores. Los compuestos marcadores son poderosas herramientas para asegurar la calidad y la reproducibilidad lote a lote de productos derivados de plantas medicinales. De acuerdo con la legislación europea los compuestos marcadores poseen las siguientes características: son productos característicos del metabolismo secundario; están presentes en cantidad suficiente tanto en la materia prima como en el producto terminado; la identificación y cuantificación de los mismos debe ser posible mediante el empleo de técnicas analíticas convencionales (CG, CLAE y HPTLC); deben de ser estables bajo las condiciones de almacenamiento y disponibles comercialmente; sí este último no fuese el caso, los marcadores deben ser de fácil separación a partir de sus fuentes naturales (Bone, 2001; Flaster y Lassiter, 2004; Reif *et al.*, 2004; Sharpless *et al.*, 2004; WHO, 1999).

#### **5.4.1 Pruebas de Identidad.**

Generalmente, la primera fase en el proceso de control de calidad de las materias primas o sus preparados consiste en la caracterización botánica de la especie vegetal. En el caso de drogas enteras, los caracteres macroscópicos y organolépticos son suficientes para identificarlas. Si bien es cierto que el aspecto general de la muestra es un indicador de las especificaciones oficiales dadas en las farmacopeas, es difícil garantizar bajo este único criterio que su calidad sea la adecuada, ya que es difícil determinar a simple vista el deterioro de las drogas debido a una recolección, transporte o almacenamiento defectuosos, o la alteración producto del envejecimiento de la droga cruda (Wichtl, 1994). En este contexto, el examen microscópico junto con el establecimiento de los perfiles cromatográficos son de extraordinaria utilidad para establecer la identidad de las drogas.

#### 5.4.1.1 Características microscópicas de la droga cruda.

Los aspectos más relevantes del análisis microscópico de las hojas y tallos (droga cruda) de la especie en estudio se resumen a continuación:

##### *A) Morfología de la hoja*

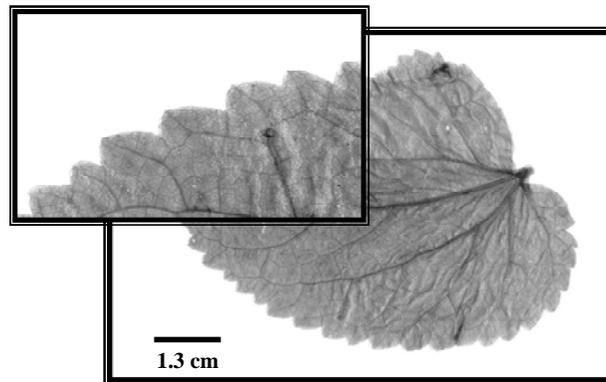
La hoja presenta lámina de tipo notófila, con forma ovada, asimétrica y ápice agudo. La base es de forma cordada con unión peciolar y un margen de tipo dentado (Figura 15). Los dientes son de forma convexo/convexo y el ápice del diente es simple y sin lóbulos. El patrón de venación es de tipo actinodromo basal. El arreglo de las venas secundarias es de tipo broquidodromo festonado con tres venas basales de primer orden y una de segundo; el espaciamiento de las venas es de segundo orden. Las venas intersecundarias son inconspicuas, en tanto que, las venas terciarias son percurrentes y alternas; las areolas son conspicuas y de forma poliédrica con escasas venas terminales no ramificadas.

##### *B) Anatomía microscópica de la hoja*

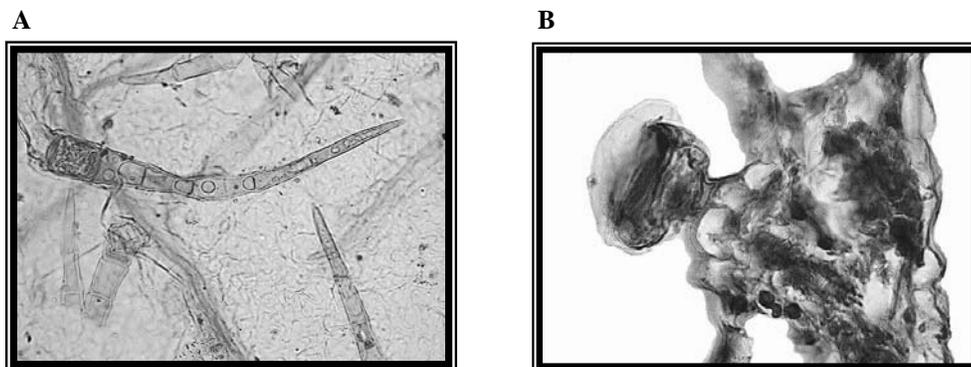
**Epidermis adaxial** (vista superficial). Presenta abundantes tricomas glandulares de dos tipos. El primer tipo está distribuido tanto en la región costal como en la intercostal; además es uniseriado y multicelular; la proyección del tricoma presenta de 6 a 9 células cuadradas o rectangulares cuyas paredes están engrosadas. Las células del pie presentan forma de cono truncado y las células terminales son alargadas y con el extremo libre ahusado. Se observan contenidos en forma de gotas, similares a lípidos. El segundo tipo de tricomas es menos abundante y está distribuido en la región intercostal, su forma es diferente y son visiblemente más cortos. Estos tricomas presentan dos tipos de células, uno es de forma cilíndrica y se encuentra formando el tallo y el otro es globoso y forma la cabeza del mismo (Figura 16).

La epidermis adaxial presenta también células costales e intercostales. Las células costales son de forma rectangular, con paredes engrosadas y organizadas en hileras paralelas a las venas. Las células intercostales son de forma irregular con

paredes anticlinales sinuosas y ligeramente engrosadas. No presenta estomas. En la sección transversal la epidermis es monoestratificada y su cutícula está ligeramente engrosada ( $2.5 \mu\text{m}$ ); las células son de forma obloide y de tamaño variado.



**Figura 15.** Vista superficial de la hoja donde se observa un acercamiento del margen y el patrón de venación.



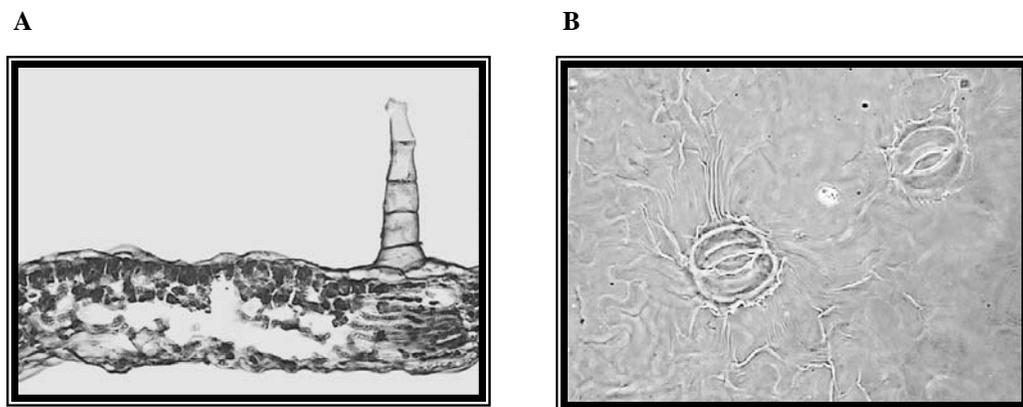
**Figura 16.** (A) Tricomas glandulares uniseriados con contenidos celulares similares a lípidos. (B) Tricoma glandular globoso.

**Epidermis abaxial** (vista superficial). Los tricomas son abundantes y de forma similar a los observados en la epidermis adaxial. La epidermis abaxial presenta células costales e intercostales. Las células costales son similares a las presentes en la epidermis

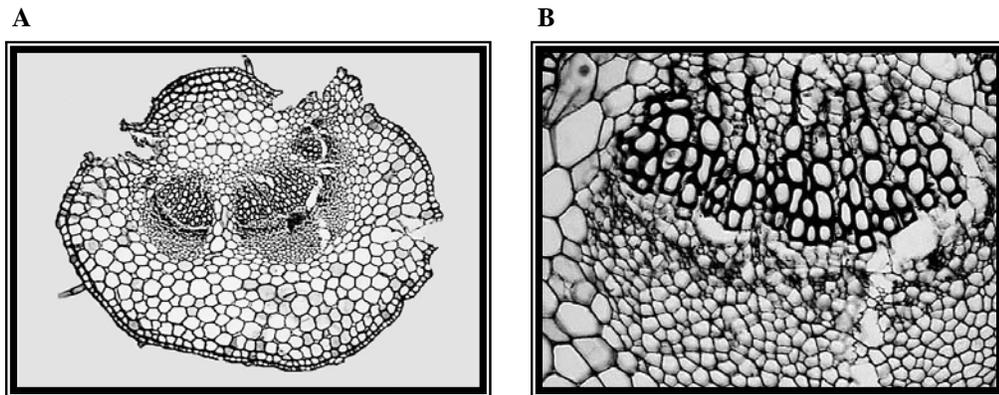
adaxial. Las células intercostales también presentan similitud con las de la epidermis adaxial pero sus paredes son delgadas. Los estomas presentes son de tipo anomocítico (Figura 17). Las células epidérmicas adyacentes a las oclusivas presentan estriaciones. En la sección transversal la epidermis es monoestratificada y posee una cutícula ligeramente engrosada además las células son más pequeñas que las de la epidermis adaxial.

**Mesófilo** (sección transversal). En el extremo adaxial se observan de uno a dos estratos de células ligeramente sinuosas y alargadas en sentido perpendicular a la superficie. Los contenidos celulares son abundantes y similares a taninos. Los espacios aéreos son frecuentes entre ellas. Hacia el extremo medio abaxial se observa un parénquima con escasas células lobuladas de forma irregular y con contenidos celulares similares (Figura 17).

**Vena media** (sección transversal). La epidermis adaxial es monoestratificada con células de forma obloide o isodiamétrica y sus paredes están tangenciales engrosadas. La epidermis abaxial es monoestratificada con células de diferentes tamaños y similares en forma a las de la epidermis adaxial. El tejido fundamental presenta colénquima de tipo laminar con dos o tres estratos en el extremo adaxial y uno en el extremo abaxial; el resto del tejido fundamental presenta células isodiamétricas de paredes delgadas y sin contenidos celulares. El tejido vascular presenta tres grandes haces vasculares colaterales distribuidos en forma de media luna con el xilema hacia el extremo adaxial y el floema hacia el extremo abaxial (Figura 18).

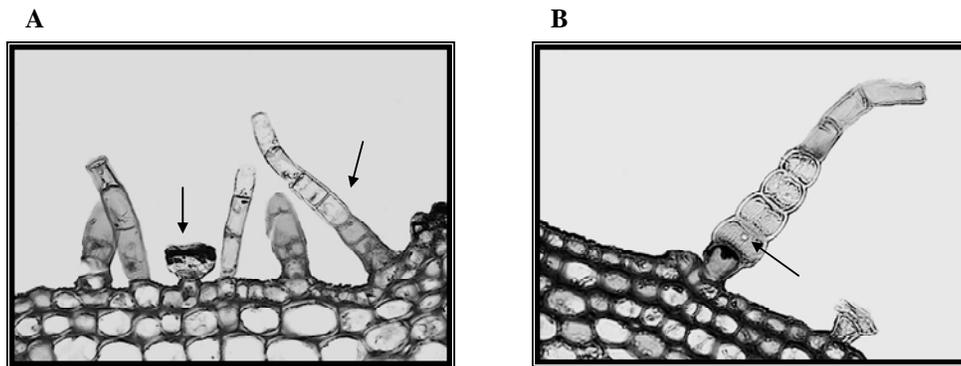


**Figura 17.** (A) Sección transversal del mesófilo. (B) Estomas anomocíticos con células epidérmicas adyacentes estriadas.



**Figura 18.** (A) Sección transversal de la vena media. (B) Haz vascular de la vena media, el xilema se observa en el extremo superior y el floema en el extremo inferior.

**Pecíolo.** El tejido dérmico presenta tricomas glandulares de dos tipos (Figura 19). El primer tipo de tricomas es uniseriado y multicelular. Las células de la proyección son rectangulares; las células del pie son más cortas que las restantes y con estriaciones similares a las observadas en las células epidérmicas. Todas ellas poseen paredes celulares engrosadas con contenidos celulares similares a cristales. El segundo tipo de tricomas es pequeño, escaso y con tres células. Las células basales presentan forma de cono truncado y su pared celular está engrosada; las células intermedias semiglobosas presentan paredes celulares menos engrosadas y las células terminales globosas también poseen pared celular poco engrosada. En todas ellas se observa abundante contenido celular. La cutícula es estriada de 5  $\mu\text{m}$  de grosor; la epidermis es monoestratificada; sus células son isodiamétricas, oblongas y cuadradas y sus paredes están tangenciales engrosadas. El tejido fundamental incluye dos regiones. La región externa presenta dos o tres estratos de colénquima tipo laminar y en el centro presenta células isodiamétricas de paredes delgadas y de mayor tamaño que las colenquimatosas. El tejido vascular está formado por 6 ó 7 haces colaterales de diferente tamaño distribuidos en forma de media luna, el xilema está en posición adaxial y floema en posición abaxial.



**Figura 19.** (A) Tricomas glandulares de dos tipos (indicados con flechas) y células epidérmicas de diferentes formas. (B) Tricoma glandular con contenidos celulares similares a cristales (indicado por la flecha).

**Xilema.** Presenta abundantes vasos como elementos de conducción, éstos están organizados en hileras radiales inmersos en el parénquima, los diámetros tangenciales son variados.

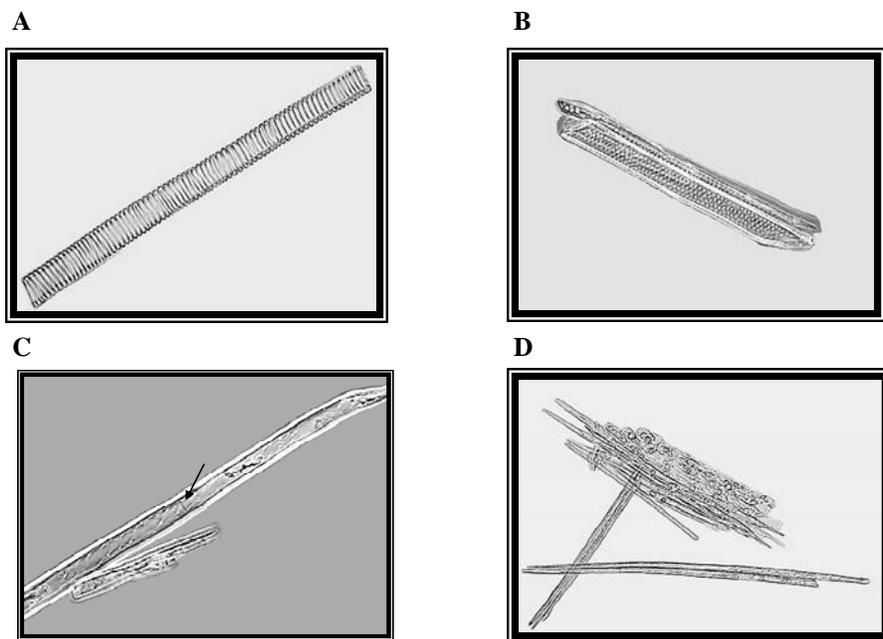
**Floema.** Está organizado como un sólo paquete, presenta células cribosas y acompañantes. El parénquima es más abundante en el extremo distal del haz, en este nivel algunos haces contienen escasas fibras.

### C) Anatomía microscópica del tallo

**Tejido dérmico** (sección transversal). El tejido dérmico presenta tricomas evidentes pero no determinados; la epidermis es monoestratificada y sus células son de forma obloide o rectangular. En algunas zonas la epidermis se observa obliterada.

**Tejido fundamental** (sección transversal). El córtex posee dos regiones, la periférica y la central. La región periférica incluye un colénquima de tipo laminar con tres o cuatro estratos celulares; las células son rectangulares, de mayor tamaño que las células epidérmicas y con un eje longitudinal perpendicular a la superficie del tallo. La región central ocupa dos tercios del córtex y las células parenquimatosas, de paredes delgadas, están tangencialmente alargadas. La médula está formada por tejido parenquimático con células de forma isodiamétricas, grandes y de paredes delgadas. No se observan espacios aéreos y los contenidos celulares son conspicuos no determinados.

**Tejido vascular** (sección transversal). El tejido vascular presenta un floema exarca y un xilema endarca y, está formado por un anillo continuo alrededor del tallo. El xilema posee vasos como elementos principales de conducción y están distribuidos en cadenas radiales, alternadas con bandas de fibras. Los vasos más grandes tienen 35  $\mu\text{m}$  de diámetro tangencial y son de tres tipos. El primer tipo presenta engrosamientos helicoidales y placas terminales simples casi horizontales; el segundo tipo de vasos posee engrosamientos escalariformes con placa terminal simple y ángulo de inclinación de  $45^\circ$ . El tercero tiene ornamentaciones en sus paredes laterales, similares a puntos bordeados, alternos de vaso a vaso y, de vaso a radio. La placa terminal es simple y el ángulo de inclinación es de  $90^\circ$ . Las fibras son de tipo libriforme, algunas de ellas son septadas y con restos de contenido celular. De manera general las fibras son más cortas y angostas, sin septos ni contenidos celulares evidentes (Figura 20). El floema presenta células cribosas y acompañantes hacia el extremo distal con un casquete de fibras fuertemente lignificadas.



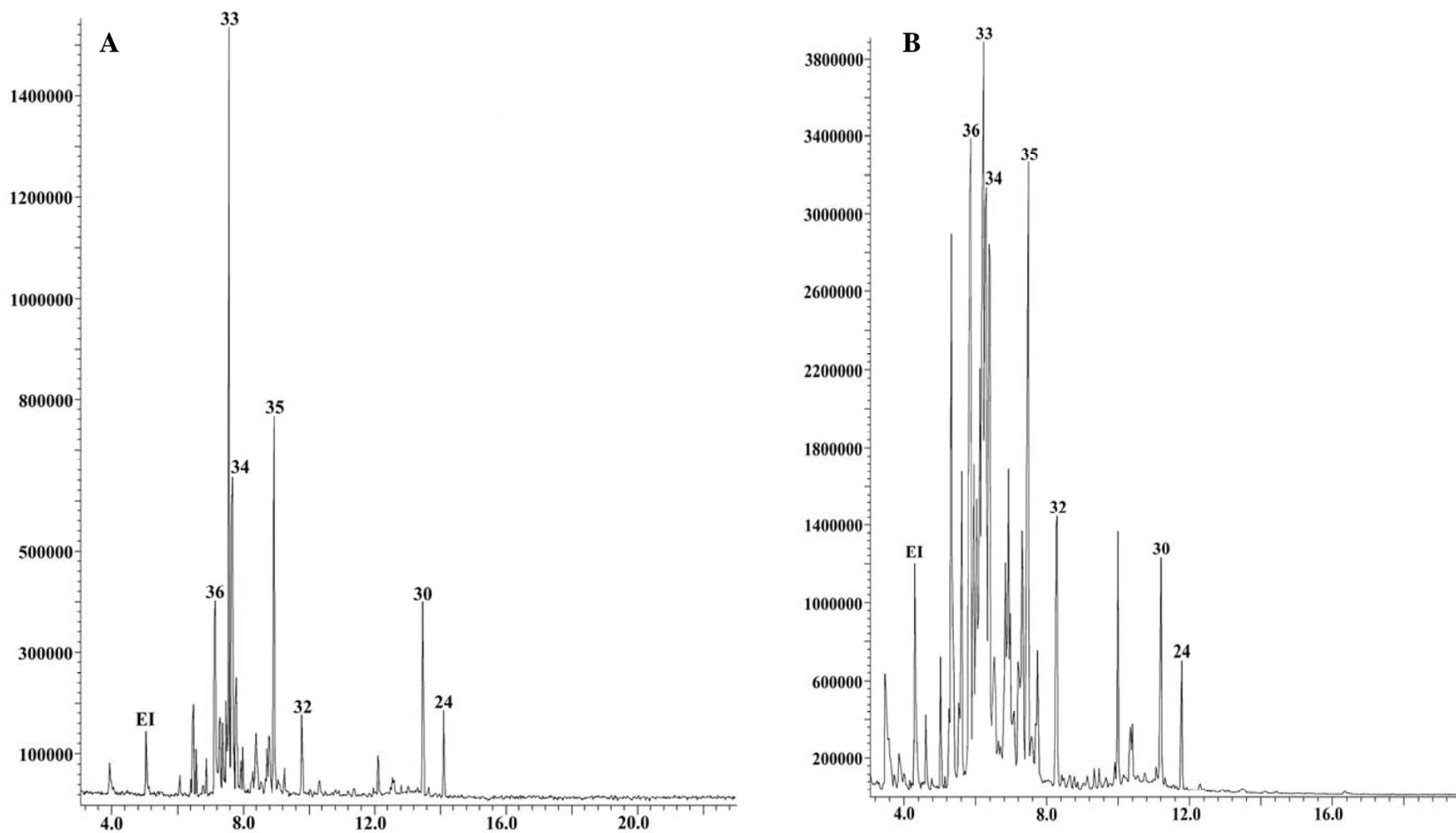
**Figura 20.** (A) Elemento de vaso con engrosamientos helicoidales. (B) Elemento de vaso con punteaduras bordeadas alternas. (C) Fibra libriforme septada (indicada con la flecha). (D) Fibras cortas y angostas sin septos.

### 5.5 Establecimiento de los compuestos marcadores y perfiles cromatográficos y espectroscópicos del aceite esencial.

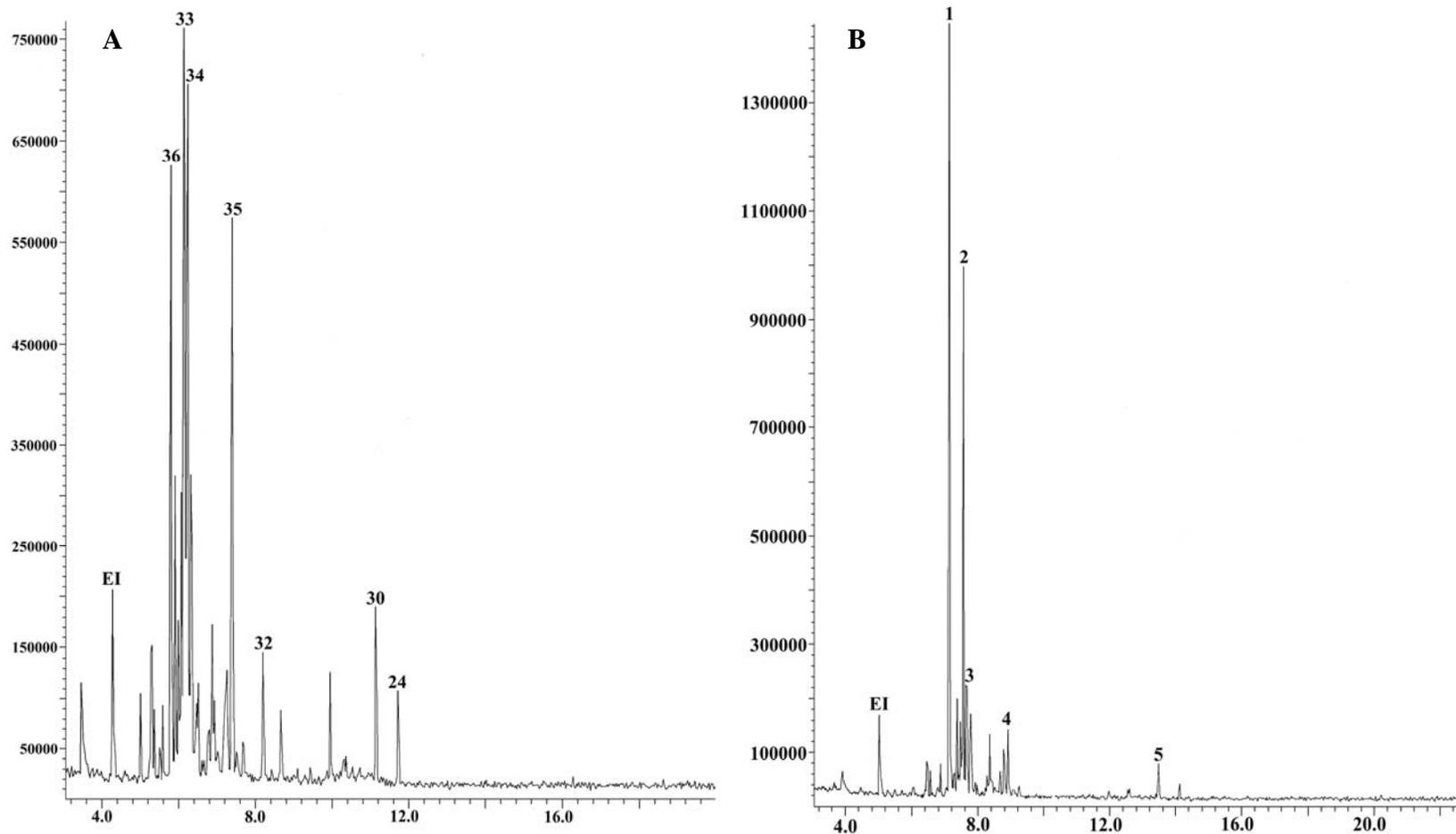
La cromatografía de gases es sin duda, el método analítico más adecuado para el control de calidad de aceites esenciales debido a la volatilidad de sus constituyentes. Esta técnica permite obtener perfiles cromatográficos representativos y característicos de una esencia así como, los límites de concentración de cada constituyente (Liang *et al.*, 2004). Con base en estas consideraciones, se planteó en primer lugar la posibilidad de utilizar esta técnica para cuantificar los metabolitos secundarios presentes en la esencia.

El análisis por CG-EM del aceite esencial de cinco lotes diferentes (Lotes I-V) de *B. veronicaefolia* permitió corroborar que los constituyentes mayoritarios de la esencia preparada por hidrodestilación son el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), así como los sesquiterpenoides camazuleno (**32**), germacrano D (**33**), biciclogermacrano (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**). Como en el caso del análisis del lote I (sección 5.2.2), los constituyentes se caracterizaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo y coelución con muestras auténticas. En el Cuadro 10 se resumen comparativamente los resultados del análisis de cada lote; en todos los casos el germacrano D (**33**), el biciclogermacrano (**34**) y el  $\beta$ -cariofileno (**36**) son los constituyentes predominantes en las esencias. Como era de esperarse, las cantidades relativas de los metabolitos variaron de acuerdo a la procedencia geográfica y a la época de recolección. En las Figuras **21** y **22** se ilustran los perfiles cromatográficos correspondientes.

Una vez establecido el método de análisis, se procedió a efectuar las réplicas de acuerdo al protocolo de validación propuesto. Sin embargo no fue posible completar dicho protocolo debido a la inestabilidad de los sesquiterpenoides, cuyas proporciones variaban entre las réplicas de un mismo lote. En los casos de los germacrano **33** y **34**, es posible que su descomposición se deba a la tendencia de estos compuestos a polimerizarse, y en el del  $\beta$ -cariofileno (**36**), a su alta susceptibilidad a oxidarse a



**Figura 21.** Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. veronicaefolia* (Lotes II y III). Asignación de picos: **A** y **B**: (36)  $\beta$ -cariofileno, (33) germacrano D, (34) biciclogermacrano, (35)  $\beta$ -eudesmol, (32) camazuleno, (30) 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo y (24) 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo.



**Figura 22.** Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. veronicaefolia* (Lotes IV y V). Asignación de picos A y B: (36)  $\beta$ -cariofileno, (33) germacrano D, (34) biciclogermacrano, (35)  $\beta$ -eudesmol, (32) camazuleno, (30) 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo y (24) 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo.

**Cuadro 10.** Componentes presentes en las diferentes esencias de *Brickellia veronicaefolia*.

Compuesto	Lote I		Lote II		Lote III	
	t <sub>R</sub> (min)	%	t <sub>R</sub> (min)	%	t <sub>R</sub> (min)	%
camazuleno ( <b>32</b> )	7.5	3.12	9.80	2.78	8.20	2.37
2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>24</b> )	10.4	2.53	14.13	2.32	11.72	1.76
2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo ( <b>30</b> )	10.7	6.72	13.50	5.42	11.14	3.11
germacrano D ( <b>33</b> )	5.9	46.10	7.58	19.40	6.16	22.02
β-cariofileno ( <b>36</b> )	5.5	14.37	7.16	8.42	5.80	10.13
β-eudesmol ( <b>35</b> )	6.9	13.23	8.96	13.37	7.40	9.50
biciclogermacrano ( <b>34</b> )	6.0	46.10	7.68	13.94	6.24	14.18
estándar interno ( <b>EI</b> )			5.06		4.2	

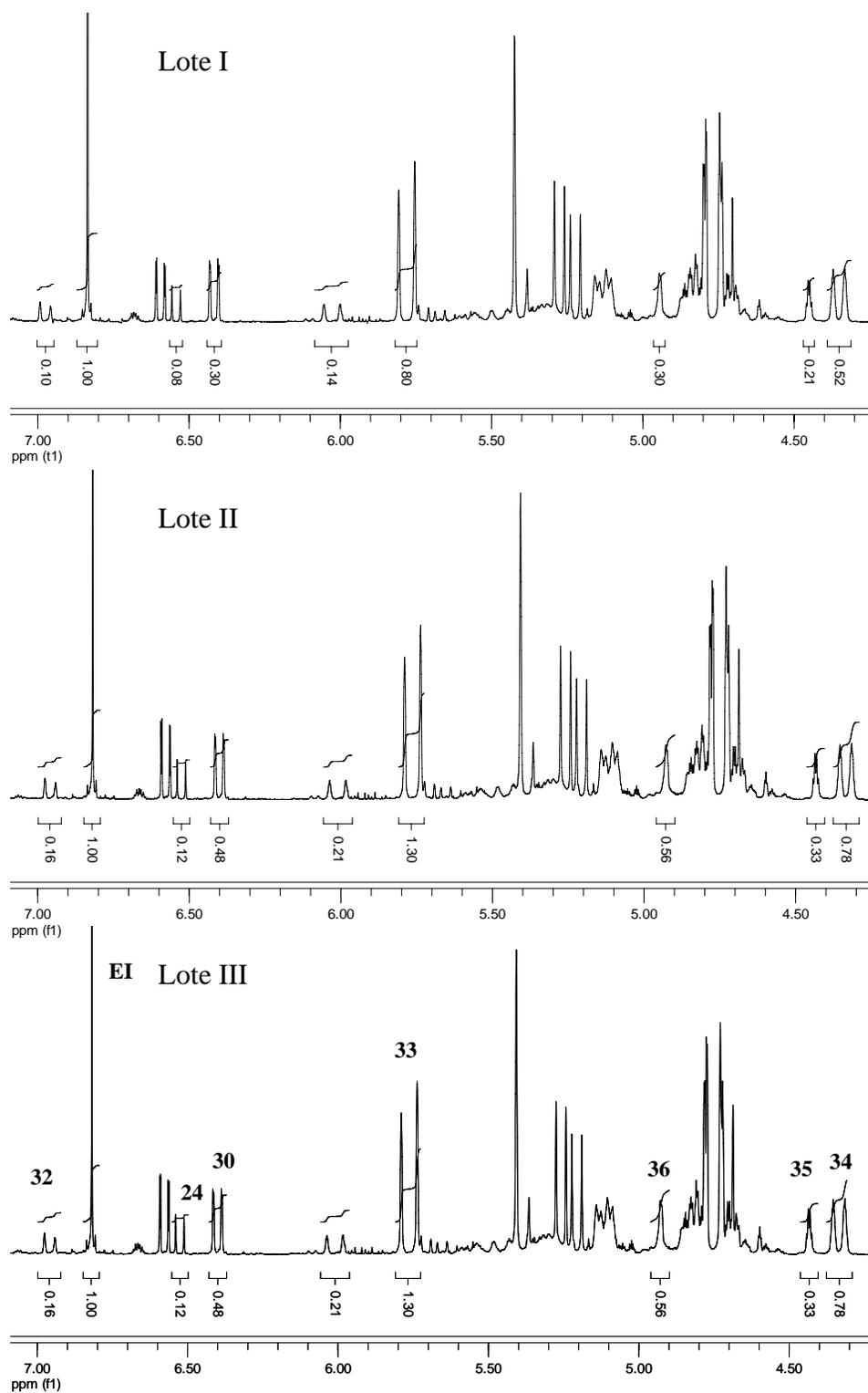
Compuesto	Lote IV		Lote V	
	t <sub>R</sub> (min)	%	t <sub>R</sub> (min)	%
camazuleno ( <b>32</b> )	8.28	3.75		
2,6-dimetoxibenzoato de bencilo ( <b>24</b> )	11.79	0.88		
2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo ( <b>30</b> )	11.21	2.15	13.50	1.92
germacrano D ( <b>33</b> )	6.20	10.23	7.58	22.89
β-cariofileno ( <b>36</b> )	5.84	7.55	7.16	37.33
β-eudesmol ( <b>35</b> )	7.47	6.44	8.94	3.15
biciclogermacrano ( <b>34</b> )	6.28	6.59		
estándar interno ( <b>EI</b> )	4.31		5.05	

temperaturas mayores a 30 °C (Lee *et al.*, 2005). Por lo tanto, la técnica de CG-EM sólo fue de utilidad para el desarrollo de perfiles cromatográficos tipo que permiten asegurar la autenticidad de la esencia.

Con base en los resultados anteriores se elaboró un nuevo protocolo de validación utilizando la RMN  $^1\text{H}$  como técnica analítica para cuantificar los constituyentes activos del aceite esencial de *B. veronicaefolia*. En años recientes esta técnica ha sido utilizada con bastante éxito para cuantificar los componentes activos de algunos preparados herbolarios (Bilia *et al.*, 2001 y 2002; Choi *et al.*, 2003; Féderich *et al.*, 2003; Maniara *et al.*, 1998; Stévigny *et al.*, 2004; Pauli, 2001; Pauli *et al.*, 2005). La RMN  $^1\text{H}$  es una poderosa herramienta para determinar cuantitativamente los componentes presentes en una mezcla sin la necesidad de realizar procedimientos de separación o fraccionamiento preliminares. Quizá el requerimiento más importante de esta técnica es la definición clara de la señal seleccionada para cuantificar cada componente activo presente en la mezcla (Pauli, 2001; Pauli *et al.*, 2005).

En el caso particular del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del aceite esencial de *B. veronicaefolia*, las señales claves de los siete compuestos mayoritarios se resuelven satisfactoriamente (Figura 23); aún más al efectuar las réplicas necesarias para validar el método se encontró una excelente reproducibilidad no solo del perfil del espectro, sino también del valor de la integral.

En todos los lotes, los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23) presentaron las siguientes señales diagnósticas: en el intervalo comprendido entre  $\delta_{\text{H}}$  7.10-6.20 se observan señales para el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**) y el camazuleno (**32**). Por analogía con los desplazamientos químicos observados en los espectros de los compuestos puros, las señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.54 (d,  $J = 8.8$  Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  6.42 (d,  $J = 8.4$  Hz) fueron asignadas a los protones H-3/H-5 y H-3 de los productos **24** y **30**, respectivamente. En tanto que la absorción en  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (d,  $J = 10.8$  Hz) fue asignada de manera inequívoca al protón H-5 del camazuleno (**32**). En la región



**Figura 23.** Vista parcial del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ) del aceite esencial de tres diferentes lotes de *Brickellia veronicaefolia*.

comprendida entre  $\delta_H$  5.90-4.30 se observan las absorciones correspondientes a los hidrógenos vinílicos del germacrano D (**33**; 5.78, d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), el  $\beta$ -eudesmol (**35**, 4.48, m, H-14), el  $\beta$ -cariofileno (**36**, 4.95, sa, H-15) y el biciclogermacrano (**34**, 4.33, d,  $J = 11.5$  Hz, H-5).

El 1,4-dimetoxibenceno se utilizó como estándar interno (**EI**); la señal correspondiente a los hidrógenos aromáticos de este producto se aprecia en  $\delta_H$  6.84; por lo tanto no interfiere con las señales de los analitos (Rizzo y Pincioli, 2005).

La cantidad en miligramos de cada compuesto se calculó por medio de la fracción mol. La fracción mol de cada componente es el cociente del área de cada señal entre el área total del espectro. Los resultados de este análisis (Cuadro 11) indicaron de nueva cuenta, que el germacrano D (**33**), el  $\beta$ -cariofileno (**36**) y el biciclogermacrano (**34**) son los productos mayoritarios de las esencias en todos los casos.

**Cuadro 11.** Composición de los aceites esenciales de *B. veronicaefolia*.

No. Lote	25	30	32	36	33	34	35
Lote II	0.24±0.01	2.40±0.05	0.63±0.04	6.52±0.03	11.44±0.21	6.30±0.3	4.91±0.20
Lote III	0.28±0.01	2.19±0.04	0.52±0.03	1.91±0.12	3.31±2.46	2.86±0.19	1.29±0.06
Lote IV	0.47±0.01	3.51±0.01	0.85±0.01	3.27±0.12	7.63±0.26	4.42±0.17	2.06±0.02
Lote V	0.08±0.01	0.67±0.01	0.05±0.02	10.78±0.12	4.49±0.16	1.30±0.06	0.04±0.01

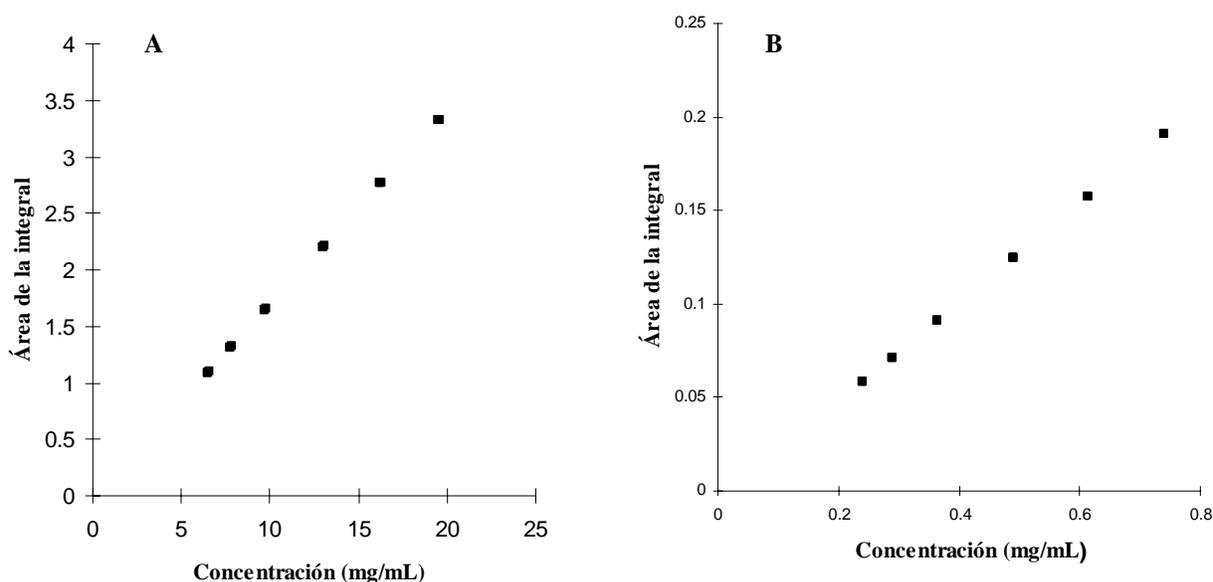
Los resultados se encuentran expresados en mg. Las muestras fueron preparadas con 50.0 mg de la esencia + 1.0 mg del estándar interno.

Una parte integral en el desarrollo de cualquier método analítico y en particular el conducente a cuantificar ingredientes activos es la validación de éste. La validación de un método analítico puede definirse como el proceso mediante el cual queda establecido, en forma experimental, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende.

En el presente estudio, las características de calidad que se evaluaron para validar el método analítico propuesto comprenden: linealidad, precisión y exactitud de acuerdo con las Guías de Validación publicadas por la FDA (ICH, 1997). A continuación, se resumen los resultados obtenidos para cada característica de calidad evaluada.

### 5.5.1 Linealidad del método.

La linealidad de un método analítico es su capacidad de obtener resultados que sean directamente proporcionales a las concentraciones de analitos en las muestras dentro de un determinado intervalo. La linealidad del método se determinó, construyendo una curva de calibración con diferentes niveles de concentración de  $\beta$ -cariofileno (**36**) y 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) en la matriz de trabajo (esencia). Las concentraciones cubren el 50-150% de la concentración encontrada como 100% (2.39 mg para **36** y 0.24 mg para **24**) mediante la realización de ensayos preliminares a diferentes muestras de esencias. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 24 y en el Cuadro 12.



**Figura 24.** Gráficas de linealidad. **A.** Gráfica experimental para el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**). **B.** Gráfica experimental para el  $\beta$ -cariofileno (**36**).

**Cuadro 12.** Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método.

Matriz de trabajo (mg de 24 + mg de 36)	EI	32	24	30	33	36	35	34
Réplica-0	1.00	0.64	0.24	2.39	11.59	6.50	4.83	6.33
Réplica-1 (24: 0.050 mg + 36: 1.30 mg)	1.00	0.64	0.28	2.47	11.23	7.75	4.83	6.09
Réplica-2 (24: 0.125 mg + 36: 3.25 mg)	1.00	0.69	0.35	2.47	11.59	10.23	5.08	6.50
Réplica-3 (24: 0.250 mg + 36: 6.50 mg)	1.00	0.69	0.51	2.39	11.47	12.77	4.69	5.85
Réplica-4 (24: 0.375 mg + 36: 9.75 mg)	1.00	0.59	0.63	2.39	11.65	16.79	5.28	6.80
Réplica-5 (24: 0.500 mg + 36: 13.00 mg)	1.00	0.59	0.75	2.39	11.29	20.99	4.95	6.33
Réplica-0	1.00	0.64	0.24	2.39	11.59	6.50	4.83	6.33
Réplica-1 (24: 0.050 mg + 36: 1.30 mg)	1.00	0.64	0.28	2.32	11.53	7.80	5.08	6.50
Réplica-2 (24: 0.125 mg + 36: 3.25 mg)	1.00	0.64	0.35	2.39	11.47	9.93	4.83	6.15
Réplica-3 (24: 0.250 mg + 36: 6.50 mg)	1.00	0.69	0.47	2.32	11.59	13.13	4.70	5.85
Réplica-4 (24: 0.375 mg + 36: 9.75 mg)	1.00	0.64	0.63	2.47	11.65	16.91	4.95	6.39
Réplica-5 (24: 0.500 mg + 36: 13.00 mg)	1.00	0.59	0.75	2.39	11.53	19.87	5.28	6.80
Réplica-0	1.00	0.59	0.24	2.39	11.12	6.56	5.08	6.56
Réplica-1 (24: 0.050 mg + 36: 1.30 mg)	1.00	0.59	0.28	2.32	11.12	8.10	4.89	6.21
Réplica-2 (24: 0.125 mg + 36: 3.25 mg)	1.00	0.69	0.43	2.54	11.12	9.52	4.95	6.27
Réplica-3 (24: 0.250 mg + 36: 6.50 mg)	1.00	0.69	0.59	2.54	11.53	12.77	5.15	6.68
Réplica-4 (24: 0.375 mg + 36: 9.75 mg)	1.00	0.69	0.67	2.47	11.41	16.20	4.89	6.44
Réplica-5 (24: 0.500 mg + 36: 13.00 mg)	1.00	0.64	0.79	2.47	11.47	20.16	5.02	6.39

Los resultados se encuentran expresados en mg. Las muestras fueron preparadas con 50.0 mg de esencia + 1.0 mg del estándar interno + diferentes cantidades de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**). EI: estándar interno

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Para el cálculo de los coeficientes de regresión se utilizó el programa de análisis estadístico STATISCA for Windows (Release 4.2, StatSoft, Inc. 1993). Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permiten estimar las siguientes ecuaciones:

$$\text{Área de la integral} = -0.00575 + 0.26564 (\text{concentración de } \mathbf{24}); \text{ y}$$

$$\text{Área de la integral} = -0.02295 + 0.17139 (\text{concentración de } \mathbf{36}).$$

Para evaluar si las ecuaciones de regresión describen adecuadamente la relación entre las dos variables, y si pueden utilizarse convenientemente con fines de predicción y estimación, se realizó un análisis de variancia. Como se desprende de los resultados indicados en los Cuadros 13 y 14, el estadístico F (44860 y 265299 para **24** y **36**, respectivamente) calculado supera el valor crítico [ $F_{0.05}(1, 16) = 4.49$ ], por lo tanto, se concluye que la variación en la respuesta, se encuentra explicada por un modelo de regresión lineal simple, es decir, los modelos estadísticos son adecuados.

Finalmente, los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) calculados mediante el análisis estadístico fueron igual a 0.9972 y 0.9979 para **24** y **36**, respectivamente. Estos valores, indican que aproximadamente el 99% de la variación total de la variable Y (área de la integral) se encuentra explicada por una relación lineal con los valores de la variable aleatoria X (concentración). Con base en estos resultados, se establece que el método analítico propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones establecido.

**Cuadro 13.** Análisis de variancia para la regresión lineal simple (datos para **24**).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad
Modelo	.043079	1	.043079	44860.90	.000001
Residuo	.000015	16	.000001		
Total	.043094				

**Cuadro 14.** Análisis de variancia para la regresión lineal simple (datos para **36**).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Nivel de probabilidad
Modelo	12.25916	1	12.25916	265299.6	.000000
Residuo	.00074	16	.00005		
Total	12.25989				

### 5.5.2 Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés. Los resultados de este parámetro de calidad se resumen en los Cuadros 15 y 16. De estas evaluaciones se infiere que el método analítico es exacto ya que el por ciento de recobro se encuentra entre 98-102 y  $DER \leq 2.00$ .

**Cuadro 15.** Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método (datos para 24).

	Valor de la Integral	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro
	0.06	0.24	0.24	100
	0.06	0.24	0.24	100
	0.06	0.24	0.24	100
PROMEDIO	0.06	0.24	0.24	100
DESVEST				
	0.07	0.28	0.28	100
	0.07	0.28	0.28	100
	0.07	0.28	0.28	100
PROMEDIO	0.07	0.28	0.28	100
DESVEST				0
	0.13	0.49	0.49	100
	0.12	0.49	0.49	100
	0.15	0.49	0.5	102.040816
PROMEDIO	0.13333333		0.49333333	100.680272
DESVEST	0.01527525		0.0057735	1.17826586
	0.19	0.74	0.75	101.351351
	0.19	0.74	0.75	101.351351
	0.2	0.74	0.74	100
PROMEDIO	0.19333333		0.74666667	100.900901
DESVEST	0.0057735		0.0057735	0.78020307

**Cuadro 16.** Resultados experimentales para evaluar la exactitud del método (datos para **36**).

	Valor de la Integral	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Recobro
	1.1	6.5	6.5	100
	1.1	6.5	6.5	100
	1.11	6.56	6.56	100
PROMEDIO	1.10333333	6.52	6.52	100
DESVEST	0.0057735	0.03464102	0.03464102	0
	1.31	7.8	7.75	99.3589744
	1.32	7.8	7.81	100.128205
	1.37	7.86	8.1	103.053435
PROMEDIO	1.33333333	7.82	7.88666667	100.846872
DESVEST	0.0321455	0.03464102	0.18717194	1.94926169
	2.16	13	12.77	98.2307692
	2.22	13	13.13	101
	2.16	13.06	12.77	97.7794793
PROMEDIO	2.18	13.02	12.89	99.0034162
DESVEST	0.03464102	0.03464102	0.2078461	1.74375338
	3.55	19.5	19.9	102.051282
	3.36	19.5	19.87	101.897436
	3.41	19.56	19.8	101.226994
PROMEDIO	3.44	19.52	19.8566667	101.725237
DESVEST	0.09848858	0.03464102	0.04189935	0.43829445

En síntesis, el método analítico propuesto para cuantificar 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), camazuleno (**32**), germacrano D (**33**), biciclogermacrano (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**) es: lineal, específico y exacto.

Otra de las bondades del método desarrollado en este trabajo, es la reproducibilidad de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los distintos lotes analizados. Por lo tanto los espectros de RMN  $^1\text{H}$  constituyen también perfiles espectroscópicos de utilidad para la identificación de la especie.

## VI. CONCLUSIONES

- 6.1 Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda y genotoxicidad, así como, el uso continuo de la especie, permiten inferir que el consumo de la planta no ocasiona efectos tóxicos agudos, ni provoca mutagenicidad. Estos hallazgos constituyen evidencias preliminares acerca de la inocuidad de la especie.
- 6.2 El efecto espasmolítico provocado por el extracto íntegro y el aceite esencial de *Brickellia veronicaefolia* sobre las contracciones espontáneas del íleon de cobayo *in vitro*; el efecto analgésico *in vivo* comprobado por Ángeles y Castañeda (2006) y el uso continuo de la especie para el tratamiento de cólicos y dispepsia sustentan de manera preliminar y parcial la eficacia de la especie en las prácticas médicas populares.
- 6.3 El estudio químico biodirigido de las partes aéreas de *B. veronicaefolia* permitió establecer de manera precisa los principios espasmolíticos. De acuerdo con la potencia demostrada por los constituyentes aislados de las fracciones activas se concluyó que los benzoatos de bencilo (**22-25**, **27**, **29** y **30**) y el camazuleno (**32**) constituyen los compuestos espasmolíticos de la planta. La actividad de los benzoatos de bencilo fue mayor o similar a la de la papaverina. La evidencia experimental obtenida en la presente investigación permite sugerir que los benzoatos de bencilo **24**, **25** y **30** ejercen su efecto espasmolítico a través de la proteína reguladora calmodulina ya que se comportan como antagonistas competitivos de esta proteína *in vitro*. Este antagonismo posiblemente bloquea la transducción de señales mediadas por la proteína durante los procesos de relajación-contracción de la musculatura lisa gastrointestinal.

6.4 La presencia de benzoatos de bencilo y derivados del ácido salicílico en *B. veronicaefolia* constituyen una contribución original al conocimiento de la química del género, ya que la presencia de estos compuestos no tiene precedente. Previamente los benzoatos de bencilo han sido descritos en ciertas especies de las familias Hypoxidaceae, Leguminoseae, Asteraceae, Rosaceae y Salicaceae. En la familia Asteraceae, se ha comprobado la existencia de estos compuestos en las especies *Solidago gigantea* y *S. decurrens*, que al igual que *B. veronicaefolia*, pertenecen a la tribu Eupatoriae. *S. gigantea* se comercializa ampliamente en Europa para curar la inflamación de los riñones y la vejiga; el leicarpósido (diglucósido del éster del alcohol 2-hidroxibencílico y del ácido 2,4-dihidroxi-3-metoxibenzoico) se identificó como el principio activo analgésico y antiinflamatorio de la especie. En la familia Leguminoseae los benzoatos de bencilo son abundantes en los bálsamos, los cuales se usan tópicamente debido a sus propiedades antisépticas, antipruriginosas y cicatrizantes. Por lo tanto, los benzoatos de bencilo aislados de *B. veronicaefolia* representan un nuevo prototipo estructural para el desarrollo de agentes espasmolíticos eficaces.

6.5 La presencia de camazuleno (**32**) y derivados del ácido salicílico en la especie apoyan el uso tradicional de la misma para curar el reumatismo y dolores de artritis.

6.6 El análisis por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM) del aceite esencial obtenido a partir de la planta recolectada en diferentes regiones del país y en diferentes épocas del año, permitió determinar que la proporción de sus constituyentes varía a lo largo de su desarrollo y localización geográfica. Este análisis reveló también que el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), el germacrano D (**33**), el bicilogermacrano (**34**) y el  $\beta$ -cariofileno (**36**) son los componentes constantes en los cinco lotes analizados.

Considerando que los tres sesquiterpenoides tienen una amplia distribución en la familia, el compuesto **30** es el único que reúne las características de un compuesto marcador de utilidad para fines de identificación y estandarización de preparados herbolarios de la planta. Otros constituyentes presentes en las esencias fueron el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), el camazuleno (**32**) y el  $\beta$ -eudesmol (**35**). Estos últimos se detectaron en cuatro de los cinco lotes analizados y fueron los constituyentes mayoritarios del extracto íntegro bioactivo analizado originalmente.

6.7 El método analítico desarrollado por RMN  $^1\text{H}$  para valorar el contenido de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**), 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), camazuleno (**32**), germacrano D (**33**), biciclogermacrano (**34**),  $\beta$ -eudesmol (**35**) y  $\beta$ -cariofileno (**36**) de manera simultánea en la esencia de *B. veronicaefolia* es selectivo, exacto y lineal. Este método será de utilidad para determinar el contenido de principios activos tanto en la esencia como en productos herbolarios elaborados con la planta. Además, este método podrá ser incorporado en las monografías de tipo farmacopeico y OMS de la especie.

6.8 La aplicación del método de RMN  $^1\text{H}$  tanto a una infusión como a una decocción de la planta permitió detectar y cuantificar el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo (**24**) y el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (**30**), entre otros constituyentes. Sin embargo, cuando el método se aplicó al preparado Estomacure<sup>®</sup> (varios lotes) no fue posible detectar ninguno de los constituyentes presentes en la esencia o en el extracto íntegro. Este resultado se corroboró al analizar el preparado por cromatografía en capa delgada y CG-EM. En ningún caso se detectó ninguno de los constituyentes aislados de la planta. Aunque el marbete del Estomacure<sup>®</sup> especifica que contiene *B. veronicaefolia*, además de manzanilla y hoja de guayaba (rica también en  $\beta$ -cariofileno), los resultados generados en esta

investigación demuestran que el pexto no está presente. Estas evidencias permiten corroborar, una vez más, la necesidad de establecer los lineamientos para el control de calidad de los distintos productos herbolarios que se consumen en el país.

6.9 La información científica generada en el presente trabajo permitió integrar la primera monografía de tipo OMS que se realiza en México. Esta monografía definitivamente servirá para regular la calidad de la droga cruda derivada de la especie *B. veronicaefolia* y/o sus preparados (Apéndice II).

## VII. PERSPECTIVAS GENERALES DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

- 7.1 Determinar el potencial anti-inflamatorio del extracto y metabolitos de la planta.
- 7.2 Establecer los principios responsables del efecto analgésico del extracto íntegro de la planta.
- 7.3 Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar los principios activos y/o marcadores presentes en el extracto íntegro.
- 7.4 Realizar los estudios clínicos conducentes al establecimiento de la eficacia terapéutica de la especie, efectos adversos y contraindicaciones.
- 7.5 Estudiar con detalle el mecanismo de acción mediante el cual los benzoatos de bencilo ejercen su efecto espasmolítico.
- 7.6 Diseñar mediante métodos computacionales y de síntesis análogos más eficaces de los benzoatos de bencilo descubiertos en el presente estudio.
- 7.7 Proponer a la SAGARPA la realización de los estudios conducentes al cultivo, cosecha y manejo de *B. veronicaefolia* a fin de garantizar el suministro eficiente y la conservación de esta importante especie medicinal.
- 7.8 Realizar el estudio integral (aspectos históricos, botánicos, químicos, farmacológicos y clínicos, entre otros), de la especie relacionada *B. canavallensi* (*syn: B. squarrosa*), ampliamente utilizada en la medicina popular de México para curar desórdenes gastrointestinales e inflamatorios como *B. veronicaefolia*. La similitud morfológica de ambas especies hace factible que las especies se utilicen de manera indistinta.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ángeles, G. y Castañeda, G. (2006). Evaluación de la toxicidad y efecto antinociceptivo de especies medicinales selectas de México. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Andrade, C. H. S., Filho, R. B. y Gottlieb, O. R. (1991). Neolignans from *Aniba ferrea*. *Phytochemistry*, **19**, 1191-1194.
- Argueta, A. V., Cano, L. M. y Rodarte, M. E. (1994). Peisto o Peistón. En: Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Vol. 2. Instituto Nacional Indigenista, México, pp 1135-1136.
- Barnes, J. (2003a). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I: Regulation and quality. *Journal of Clinical Pharmacology*, **55**, 226-233.
- Barnes, J. (2003b). Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part II: Efficacy and safety. *Journal of Clinical Pharmacology*, **55**, 331-340.
- Bartelli, D. J. y Crabtree, J. H. (1968). Naturally occurring fulvene hydrocarbons. *Tetrahedron*, **24**, 2079-2089.
- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Lazari, D. y Vincieri, F. F. (2002). Characterization of commercial kava-kava herbal drug and herbal drug preparations by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5016-5025.
- Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Mazzi, G. y Vincieri, F. F. (2002). Analysis of plant complex matrices by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy: St. John's Wort extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2115-2124.
- Bitar, K. N. (2003). Function of gastrointestinal smooth muscle: from signaling to contractile proteins. *The American Journal of Medicine*, **115**, 15S-23S.
- Bohlmann, F., Chen, Z. L. y Schuster, A. (1981). Aromatic esters from *Solidago decurrens*. *Phytochemistry*, **20**, 2601-2602.
- Bohlmann, F., Jakupovic, J. y Lonitz, M. (1976). Inhaltsstoffe der Eupatorium-Gruppe. *Chem. Ber.*, **110**, 301-314.
- Bone, K. (2001). Standardized extracts: Neither poison nor panacea. *HerbalGram*, **53**, 50-55.

- 
- Calderón, J. S., Quijano, L., Cristia, M., Gomez, F. y Rios, T. (1983). Labdane diterpenes from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytochemistry*, **22**, 1783-1785.
  - Choi, Y. H., Choi, H. K., Hazekamp, A., Bermejo, P., Schilder, Y., Erkelens, C. y Verpoorte, R. (2003). Quantitative analysis of bilobalide and ginkgolides from *Ginkgo biloba* leaves and ginkgo products using  $^1\text{H-NMR}$ . *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 158-161.
  - De Smet, P. (2002). Herbal Remedies. *The New England Journal of Medicine*, **347**, 2046-2057.
  - De Smet, P. (1997). The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, **54**, 801-840.
  - Engel, L. W. y Straus, S. (2002). Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. *Nature Reviews*, **1**, 229-237.
  - Flaster, T. y Lassiter, J. (2004). Quality control herbal preparations: using botanical references standards for proper identification. *HerbalGram*, **63**, 32-37.
  - Flores-Tavizon, E., Alarcon-Herrera, M. T., Gonzalez-Elizondo, S. y Olguin, E. (2003). Arsenic tolerating plants from mine sites and hot springs in the semi-arid region of Chihuahua, Mexico. *Acta Biotecnologica*, **23**, 113-119.
  - Frédérich, M., Choi, Y. H. y Verpoorte, R. (2003). Quantitative analysis of strychnine and brucine in *Strychnos nux-vomica* using  $^1\text{H-NMR}$ . *Planta Medica*, **69**, 1169-1171.
  - Fujita, T. y Nakayama, M. (1992). Perilloside A, a monoterpene glucoside from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*, **31**, 3265-3267.
  - Ghisalberti, E. (1993). Detection and isolation of bioactive natural products. En: *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*. Eds. Colegate, S. y Molyneux, R. Edit. CRC Press, pp 10-49.
  - Hamburger, K. y Hostettman, M. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
  - Harmat, V., Böcskei, Z., Náray-Szabó, G., Bata, I., Csutor, A. S., Hermeicz, I., Arányi, P., Szabó, B., Liliom, K., Vértessy, B. G. y Ovádi, J. (2000). A new potent calmodulin antagonist with arylalkylamine structure: crystallographic, spectroscopic and functional studies. *J. Mol. Biol.* **297**, 747-755.

- 
- Hegemann, L., Van Rooijen, L., Traber, J. y Schmidt, B. (1991). Polymyxin B is a selective and potent antagonist of calmodulin. *European Journal of Pharmacology*, **207**, 17-22.
  - Hernández, J., Rojas, J. I., Castillo, R., Rojas, A. y Mata, R. (2004). Spasmolytic effects, mode of action, and structure-activity relationships of stilbenoids from *Nidema boothii*. *Journal of Natural Products*. **67**, 160-167.
  - Hersh, P. (1996). En destino común: los recolectores y su flora medicinal. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.
  - ICH Harmonized Tripartita Guideline, ICH Q2V, Text on Validation on Analytical Procedures: Methodology, 1997.
  - Ichimura, M., Eiki, R., Osawa, K., Nakanishi, S. y Kase, H. (1996). KS-505a, an isoform-selective inhibitor of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. J.*, **316**, 311-316.
  - Inuma, M., Roberts, M., Matlin, S. A., Stacey, V. E., Timmermann, B. N., Mabry, T. J. y Brown, R. (1985). Synthesis and revised structure of the flavone brickellin. *Phytochemistry*, **24**, 1367-1368.
  - Kinghorn, A. D. (1995). Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *International Journal of Pharmacognosy*, **33**, 48-58.
  - Kodpinid, M., Sadavongvivad, C., Thebtaranonth, C. y Thebtaranonth, Y. (1984). Benzyl Benzoates from the root of *Uvaria purpurea*. *Phytochemistry*, **23**, 199-200.
  - Lee, G. J., Lee, C. G., Kwang, J. J., Buglass, A. J. y Lee, G. H. (2005). Determination of optimum conditions for the analysis of volatile components in pine needles by double-shot pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1089**, 227-234.
  - Leung, P. C., Taylor, W. A., Wang, J. H. y Tipton, C. L. (1984). Ophiobolin A. A natural product inhibitor of calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*. **258**, 2742-2747.
  - Liang, Y. Z., Xie, P. y Chan, K. (2004). Quality control of herbal medicine. *Journal of Chromatography B*, **812**, 53-70.
  - Lorke, D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, **54**, 275-287.

- 
- Lozoya, X. (1993). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. En: La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Edición conmemorativa, Secretaría de Salud, México, 255-270.
  - Lu, T., Vargas, D. y Fisher, N. H. (1993). Sesquiterpenes from *Brintonia discoidea*. *Phytochemistry*, **34**, 737-742.
  - Makhlof, G. M. y Murthy, K. S. (1997). Signal Transduction in Gastrointestinal Smooth Muscle. *Cell. Signal.* **9**, 269-276.
  - Maniara, G., Rajamoorthu, K., Rajan, S. y Stockton, G. W. (1998). Method performance and validation for quantitative analysis by  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{31}\text{P-NMR}$  spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals. *Analytical Chemistry*, **23**, 4921-4928.
  - Maron, D. M. y Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **113**, 173-215.
  - Mitscher, L. A., Pillai, S. y Shankel, D. (2000). Some thoughts on the regulatory need for standardization of herbal medical products. *Journal of Food and Drug Analysis*, **8**, 229-234.
  - Nakanishi, S., Kuroda, K., Osaka, K. y Kase, H. (1990). Calmodulin antagonistic action of KS-504a, a novel metabolite of the fungus *Mollisia ventosa*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2697-2702.
  - Organización Mundial de la Salud (2000). Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
  - Organización Mundial de la Salud (2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
  - Palazzino, G., Galeffi, C., Federici, E., Monache, F. D., Cometa, M. F. y Palmery, M. (2000). Benzylbenzoate and norlignan glucosides from *Curculigo pilosa*: structural analysis and in vitro vascular activity. *Phytochemistry*, **55**, 411-417.
  - Pauli, G. (2001). qNMR-A versatile concept for the validation of natural product reference compounds. *Phytochemical Analysis*, **12**, 28-42.
  - Pauli, G. F., Jaki, B. U. y Lankin, D. C. (2005). Quantitative  $^1\text{H-NMR}$ : Development and potential of a method for natural products analysis. *Journal of Natural Products*, **68**, 133-149.

- Pérez, R. M., Cervantes, H., Zavala, M. A., Sánchez, J., Pérez, S. y Pérez, C. (2000). Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*, **7**, 25-29.
- Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A. y Pérez-Gutiérrez, Salud. (1998). Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Pública de México*, **40**, 354-58.
- Pérez, R. M., Cervantes, H., Zavala, M. A., Sánchez, J., Pérez, S. y Pérez, C. (2004). Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*, **7**, 25-29.
- Philp, R. B. Herbal Remedies: The good, the bad and the ugly. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, **1**, 1-10.
- Ragasa, C. Y., Hofileña, J. G. y Rideout, J. A. (2002). New furanoid diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Natural Products*, **65**, 1107-1110.
- Reif, K., Sievers, H. y Steffen, J. P. (2004). The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials- A European perspective. *HerbalGram*, **63**, 38-43.
- Reyes-López, M., Villa-Treviño, S., Arriaga-Alba, M., Alemán-Lazarini, L., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Fattel-Fazenda, S. y De la Garza, M. (2004). The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in Vitro*, **19**, 91-97.
- Reynolds, W. F. y Sawyer, J. F. (1984). Total assignment of the  $^{13}\text{C}$  spectrum of taraxasteryl acetate by  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  connectivity experiments and determination of the stereochemistry of taraxasterol by X-ray diffraction. *Can, J. Chem.*, **63**, 1048-1054.
- Rizzo, V. y Pinciroli, V. (2005). Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **38**, 851-857.
- Roberts, M. F., Timmermann, B. N. y Mabry, T. J. (1980). 6-Methoxyflavonols from *Brickellia veronicaefolia* (Compositae). *Phytochemistry*, **19**, 127-129.
- Roberts, M. F., Timmermann, B. N., Mabry, T. J., Brown, R. y Matlin, S. A. (1984). Brickellin, a novel flavone from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. *Phytochemistry*, **23**, 163-165.

- 
- Schwab, W., Scheller, G. y Schreier, P. (1990). Glycosidically bound aroma components from Sour cherry. *Phytochemistry*, **29**, 607-612.
  - Sharma, R. K. y Wang, J. K. (1979). Preparation and assay of the Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator protein. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, **10**, 187-198.
  - Sharma, R. K., Wang, J. H. y Wu, Z. (1997). Mechanisms of inhibition of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase by dihydropyridine calcium antagonists. *Journal of Neurochemistry*, **69**, 845-850.
  - Sharpless, K. E., Sander, L., Wise, S., NguyenPho, A., Lyon, R., Ziobro, G. y Betz, J. (2004). Development of standard reference materials for the analysis of dietary supplements. *HerbalGram*, **63**, 44-47.
  - Stévigny, C., Wautier, M. C., Jiwan, J. L. H., Chiap, P., Hubert, P. y Quetin-Leclercq, J. (2004). Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassythia filiformis*. *Planta Medica*, **70**, 764-770.
  - Sugimura, M., Sato, T., Nakayama, W., Morishima, Y., Fukunaga, K., Omitsu, M., Miyamoto, E. y Shirasaky, Y. (1997). DY-9760e, a novel calmodulin antagonist with cytoprotective action. *European Journal of Pharmacology*, **336**, 99-106.
  - Tamayo-Castillo, G., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Rojas, A., Castro, V. y King, M. (1988). Germacranolides and other constituents from *Ageratina* species. *Phytochemistry*, **27**, 2893-2897.
  - Vasta, V. y Beavo, J. (2004). Functions and Pharmacological Inhibitors of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. *Celltransmissions*, **20**, 3-7.
  - Webb, C. R. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, **27**, 201-206.
  - WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1 (1999). World Health Organization, Geneva.
  - Wichtl, M. (1994). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis. Norman Grainger Bisset, Editores CRC PRESS and Meadpharma, German.
  - Yueh-Hsiung, K., Ping-Hung, L. y Yung-Shun, W. (2002). Four new compounds from the seeds of *Cassia fistula*. *Journal of Natural Products*, **65**, 1165-1167.

## IX. APÉNDICE I

---

 Radix Angelicae Sinensis
**Definition**

Radix Angelicae Sinensis consists of the dried roots of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Apiaceae) (1).

**Synonyms**

Although *Angelica sinensis* has also been referred to as *Angelica polymorpha* Maxim. var. *sinensis* (the latter being a synonym for *A. polymorpha* Maxim. (2)), their synonymy has not yet been firmly established (J.C. Regalado, personal communication, 1999). Apiaceae are also known as Umbelliferae.

**Selected vernacular names**

Can qui, Chinese Angelica, dangdanggui, dang gui, dong quai, duong qui handanggui, hashyshat almalak, kara toki, langdu danggui, min-gui, tang-kuei, tangkuei tân qui (1, 3–6).

**Geographical distribution**

Indigenous to China (3, 4).

**Description**

A fragrant, perennial herb, 0.5–1.0 m high. Stem glabrous and purplish, with light, linear striations. Inferior leaves tripinnate; superior leaves often pinnate; segments oval, dentate-incised, teeth obtuse. Petiole 3–11 cm long, sheathed; bracts rudimentary, not prominent. Umbels 10–14, radiate on top of the plant, rays irregular, interior margin uneven; bracteoles, narrow-linear 2–4; pedicels slender; carpophore bipartite; each umbel multiflorous (12–36 flowers); umbel stem 0.3–1.5 cm long. Flowers white, 5 petals, glabrous, incurvate at the tips. Carpels dorsally compressed, square-elliptical, the base cordiform, the tip rounded or lightly notched; dorsal veins 5, closely placed, projecting; central vein barely winged, marginal veins with very large wings; ducts oleaginous, 1 in each sinus, 2 in the commissure (4).

*WHO monographs on selected medicinal plants*

### **Plant material of interest: dried roots**

#### ***General appearance***

Somewhat cylindrical, 3–5 or more branches at the lower part, 15–25 cm long. Externally yellowish-brown to brown, longitudinally wrinkled and transversely lenticellate. Root stocks 1.5–4 cm in diameter, annulated, apex obtuse, showing purple or yellowish-green remains of stems and leaf sheaths; main roots lumpy on the surface, branching roots 0.3–1.0 cm in diameter, upper portion thick and lower portion thin, mostly twisted, with a few rootlet scars. Texture flexible, fracture yellowish-white or yellowish-brown, thick epidermis, showing some clefts and numerous brown spotted secretory cavities; wood paler in colour than the bark, cambium ring yellowish-brown (1).

#### ***Organoleptic properties***

Odour: strongly aromatic; taste: sweet, pungent, slightly bitter (1).

#### ***Microscopic characteristics***

Cork cells in several layers. Cortex narrow, with a few scattered oil cavities. Phloem cleft, broad (25–160 µm in diameter), relatively large on outer side, gradually becoming smaller, surrounded by 6–9 secretory cells, oil cavities and oil tubes. Cambium in a ring. Xylem rays, 3–5 cells wide; vessels scattered singly or in groups of 2–3, arranged radially; parenchymatous cells contain starch grains (1).

#### ***Powdered plant material***

Yellowish-brown; parenchymatous cells in phloem are fusiform, with slightly thickened walls, very oblique criss-cross striations, thin transverse septa sometimes visible; scalariform and reticulate vessels frequent, up to 80 µm in diameter; fragments of oil cavities sometimes visible (1).

#### **General identity tests**

Macroscopic and microscopic examinations (1).

#### **Purity tests**

##### ***Microbiological***

Tests for specific microorganisms and microbial contamination limits are as described in the WHO guidelines on quality control methods for medicinal plants (7).

##### ***Foreign organic matter***

Free of foreign matter (1).

*Radix Angelicae Sinensis***Total ash**

Not more than 7.0% (4).

**Acid-insoluble ash**

Not more than 2.0% (4).

**Alcohol-soluble extractive**

Not less than 45% using 70% ethanol (4).

**Pesticide residues**

The recommended maximum limit of aldrin and dieldrin is not more than 0.05 mg/kg (8). For other pesticides, see the *European pharmacopoeia* (8), and the WHO guidelines on quality control methods for medicinal plants (7) and pesticide residues (9).

**Heavy metals**

For maximum limits and analysis of heavy metals, consult the WHO guidelines on quality control methods for medicinal plants (7).

**Radioactive residues**

Where applicable, consult the WHO guidelines on quality control methods for medicinal plants (7) for the analysis of radioactive isotopes.

**Other purity tests**

Chemical, water-soluble extractive and loss on drying tests to be established in accordance with national requirements.

**Chemical assays**

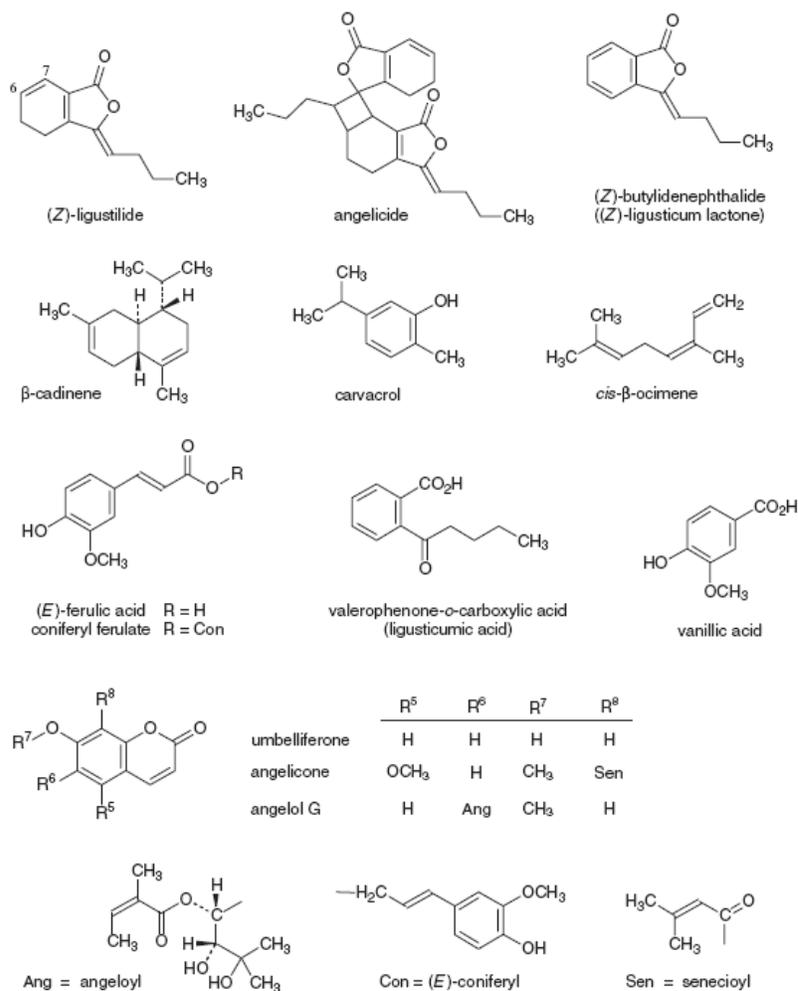
Methods for both qualitative and quantitative determination of the alkyl phthalide components by high-performance liquid chromatography have been developed (10, 11). National requirements for quantitative criteria should be established with respect to the concentration ranges reported for the essential oil (0.4–0.7%) (4) and ligustilide (0.5–5.0%) (10).

**Major chemical constituents**

The characteristic components are the simple alkyl phthalides (ligustilide, (Z)-ligustilide, (Z)-6,7-epoxyligustilide, angelicide, (Z)-butylidenephthalide, butylphthalide, 2,4-dihydrophthalic anhydride), which are the major components of the essential oil fraction of the roots. Other characteristic components of the oil have been identified as terpenes ( $\beta$ -cadinene, carvacrol and *cis*- $\beta$ -ocimene). The non-volatile constituents reported are phenylpropanoids ((*E*)-ferulic acid,

## WHO monographs on selected medicinal plants

coniferyl ferulate); benzenoids (valerophenone-*o*-carboxylic acid and vanillic acid); and coumarins (angelol G, angelicone and umbelliferone) (3, 4, 10, 11). It has been shown by high-performance liquid chromatography that the major chemical constituent of the roots is ligustilide, which can account for over 5% (10). Polysaccharide fractions of low relative molecular mass have also been reported (12, 13). The structures of the characteristic constituents are presented below.



*Radix Angelicae Sinensis***Medicinal uses*****Uses supported by clinical data***

None. Although *Radix Angelicae Sinensis* has been alleged to be useful for the treatment of menopausal symptoms, a randomized, placebo-controlled clinical trial concluded that 4.5 g of the root daily for 24 weeks did not alleviate menopausal symptoms, such as hot flushes (14).

***Uses described in pharmacopoeias and in traditional systems of medicine***

Treatment of menstrual disorders such as irregular menstruation, amenorrhoea and dysmenorrhoea (1, 3, 15–19). As an analgesic for symptomatic treatment of rheumatic arthralgia, abdominal pain and in the management of post-operative pain (1, 20). Treatment of constipation (1), anaemia (1, 20), chronic hepatitis and cirrhosis of the liver (20).

***Uses described in folk medicine, not supported by experimental or clinical data***

Treatment of dehydration, lumbago, abnormal menstruation, menopausal symptoms (including hot flushes), hypertonia and nervous disorders (18, 21).

**Pharmacology*****Experimental pharmacology*****Smooth muscle contraction**

Hot aqueous extracts of *Radix Angelicae Sinensis* stimulated smooth muscle contractions of the bladder, intestine and uterus when administered intravenously to dogs (10 g/kg body weight) (22). Intravenous administration of an aqueous or 95% ethanol extract of the roots to cats, rats and rabbits increased the strength of the contractions and tone of uterine smooth muscles (4). In vitro assays demonstrated that a decoction of the roots stimulated the H<sub>1</sub> receptor of mouse uterus (23). The active constituent responsible for this activity is an aqueous- and alcohol-soluble, non-volatile component, the structure of which is unknown (4). Conversely, ligustilide, a constituent of the essential oil of the roots, inhibited contractions of isolated uteri from various animal models (20, 24). Intraperitoneal administration of ligustilide (0.14 ml/kg body weight) to guinea-pigs inhibited asthmatic reactions induced by acetylcholine and histamine (25). Ligustilide (32.5–130.0 µl/ml) inhibited smooth muscle contractions induced by barium sulfate, acetylcholine and histamine in isolated guinea-pig trachea (25).

**Antihepatotoxic activity**

Intraperitoneal administration of a decoction of the roots (11 ml/kg body weight) ameliorated galactosamine-induced hepatotoxicity in rats (26). Ferulic

*WHO monographs on selected medicinal plants*

acid, a constituent of the roots, protected rat liver mitochondria against damage induced by oxygen free radicals (27). Intra-gastric pretreatment of mice with sodium ferulate (100 mg/kg body weight) daily for 10 days alleviated liver toxicity induced by paracetamol (28) and prednisolone (29), and bromobenzene-induced liver injury (30).

**Cardiovascular activity**

Cardiac haemodynamic studies demonstrated that intravenous administration of an aqueous root extract (2 g/kg body weight) to anaesthetized dogs increased coronary blood flow from 88 ml before administration to 128 ml (per 100 g cardiac muscle/minute post-injection). Coronary vascular resistance and myocardial oxygen consumption also decreased, while the heart rate decreased or remained unchanged (31). An extract of the roots increased coronary blood flow in isolated guinea-pig hearts (32).

In animal models, both aqueous and ethanol extracts of the roots had an effect on arrhythmias induced by epinephrine, barium chloride and digitalis (32, 33). Intravenous administration of an ethanol extract of the roots (4 g/kg body weight) antagonized chloroform- and epinephrine-induced arrhythmias in cats (34). Ethanol extracts of the roots and ferulic acid restored normal sinus rhythm after ouabain-induced arrhythmia in isolated ventricular muscle from cats (20). Aqueous extracts of the roots reduced the action potential amplitude and maximal upstroke velocity of the Q phase, and prolonged the effective refractory period and the duration of the action potential in guinea-pig myocardium (35). Intravenous administration of an aqueous extract of the roots (50 mg/kg body weight) to rabbits with ligation of the left anterior descending coronary artery provided protection against ischaemia- and reperfusion-induced myocardial dysfunction and injury (36). An aqueous extract of the roots bound to nitrendipine and diltiazem receptors, thereby demonstrating calcium channel blocking activity (37). A ligustilide dimer, isolated from the roots, inhibited [<sup>3</sup>H]nitrendipine binding to dihydropyridine-sensitive calcium channels (inhibitory concentration of 50% [IC<sub>50</sub>] 0.4 μmol/l) (38). Since calcium channel blockers are known to have pronounced effects on the cardiovascular system, this activity may explain some of the reported effects of root extracts on the cardiovascular system.

**Antithrombotic activity**

In vitro and in vivo studies have shown that extracts of the roots inhibit platelet aggregation and have antithrombotic activity (20). Aqueous extracts of the roots (200 mg/ml) or ferulic acid (0.4 mg/ml) inhibited platelet aggregation induced by ADP or collagen in vitro (39). A hot aqueous extract of the roots (500 mg/ml) or ferulic acid (1 mg/ml) inhibited thrombin-induced platelet aggregation and release of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine from labelled platelets in vitro (39). An aqueous extract of the roots inhibited both ADP- and collagen-induced platelet aggregation when administered intravenously to rats (200 mg/ml) (20, 39). The mechanism of action appears to be via inhibition of cyclooxygenase and throm-

*Radix Angelicae Sinensis*

boxane A<sub>2</sub> synthase by ferulic acid, leading to decreased production of thromboxane A<sub>2</sub> (40). The antithrombotic activity of the drug is associated with inhibition of platelet aggregation, reduction in the concentration of plasma fibrinogen, changes in cell surface charge and a decrease in blood viscosity (20).

Intraperitoneal administration of polysaccharides isolated from the roots increased haematopoiesis in mouse bone marrow, as determined by an increase in colony-forming units in the marrow cells (12, 41). The polysaccharides promoted the proliferation and differentiation of haematopoietic progenitor cells in healthy and anaemic mice (13). Results of this study indicated that the polysaccharides may enhance haematopoiesis by stimulating macrophages, fibroblasts and lymphocytes in haematopoietic and muscle tissue to secrete haematopoietic growth factor (13).

**Clinical pharmacology****Menstrual disorders**

Although there are a number of case reports concerning the clinical use of *Radix Angelicae Sinensis* in the treatment of amenorrhoea and dysmenorrhoea, these studies were published between 1899 and 1910 (15–18). Randomized, controlled clinical trials are needed to confirm these observations. In these early case studies, female patients were treated with 5 ml of a fluidextract of the roots three times daily before meals for 1 week before menstruation. The treatment relieved premenstrual pain and induced menstrual flow in most cases. No abortifacient activity was observed in two pregnant women treated with the same fluidextract (15). In other studies, the fluidextract was used for the treatment of dysmenorrhoea in nulliparous women, and of severe bleeding in multiparous women. Administration of 5 ml of the fluidextract three times daily for 1 week before menstruation was effective in decreasing menstrual pain and chronic endometritis (16). Successful treatment of amenorrhoea and dysmenorrhoea in female patients was further reported after administration of the same fluidextract (5 ml, three times daily) (17, 18). In another report, 112 women with dysmenorrhoea were treated for 3–7 days with ligustilide dimer isolated from the roots. The efficacy rate was 77%. Minor side-effects were nausea and dizziness, which disappeared after the treatment stopped (42).

**Smooth muscle contraction**

Decoctions of the roots reportedly stimulated uterine smooth muscle in female patients, but the doses used and the conditions being treated were not stated (19). A decoction of the roots lowered whole blood viscosity after administration to six patients (11).

**Contraindications**

*Radix Angelicae Sinensis* should not be administered to children or patients with diarrhoea, haemorrhagic diseases or hypermenorrhoea, and should not be used during pregnancy or lactation (4).

*WHO monographs on selected medicinal plants*

### **Warnings**

No information available.

### **Precautions**

#### ***Drug interactions***

Decreased prothrombin times were reported in rabbits that received both a single subcutaneous dose of warfarin (2 mg/kg body weight) and a repeated oral dose of Radix Angelicae Sinensis (2 g/kg body weight twice daily for 3 days) (43). Therefore, patients receiving anticoagulant therapy should be advised against taking Radix Angelicae Sinensis without medical supervision.

#### ***Pregnancy: teratogenic effects***

See Contraindications.

#### ***Pregnancy: non-teratogenic effects***

See Contraindications.

#### ***Nursing mothers***

See Contraindications.

#### ***Paediatric use***

See Contraindications.

#### ***Other precautions***

No information available on general precautions or precautions concerning drug and laboratory test interactions; or carcinogenesis, mutagenesis and impairment of fertility.

### **Adverse reactions**

Oral administration of Radix Angelicae Sinensis is generally regarded as having few side-effects; however, headaches may occur in sensitive individuals (14, 19). No adverse reactions were reported in 40 people who received an aqueous root extract by intravenous administration (240 ml/person) for 30 days (19).

### **Dosage forms**

Powdered crude drug and fluidextracts (4). Store in an airtight container in a cool, dry place protected from moisture (1).

*Radix Angelicae Sinensis***Posology**

(Unless otherwise indicated)

Daily dosage: 4.5–9 g crude drug (†).

**References**

1. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Vol. I* (English ed.). Beijing, Chemical Industry Press, 1997.
2. Hiroe M. *Umbelliferae of Asia*. Kyoto, Eikodo, 1958.
3. Hsu HY. *Oriental materia medica, a concise guide*. Long Beach, CA, Oriental Healing Arts Institute, 1986.
4. Zhu DPO. Dong quai. *American Journal of Chinese Medicine*, 1987, 15:117–125.
5. Farnsworth NR, ed. *NAPRALERT database*. Chicago, University of Illinois at Chicago, IL, January 1, 1998 production (an online database available directly through the University of Illinois at Chicago or through the Scientific and Technical Network [STN] of Chemical Abstracts Services).
6. *Medicinal plants in Viet Nam*. Manila, World Health Organization, 1990 (WHO Regional Publications, Western Pacific Series, No. 3).
7. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, World Health Organization, 1998.
8. *European pharmacopoeia*, 3rd ed. Strasbourg, Council of Europe, 1996.
9. *Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues*, 2nd rev. ed. Geneva, World Health Organization, 1997 (document WHO/FSE/FOS/97.7).
10. Lin LZ et al. Liquid chromatographic–electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide. *Journal of Chromatography A*, 1998, 810:71–79.
11. Terasawa K et al. Chemical and clinical evaluation of crude drugs derived from *Angelica acutiloba* and *A. sinensis*. *Fitoterapia*, 1985, 56:201–208.
12. Ma LF et al. The effect of *Angelica sinensis* polysaccharides on mouse bone marrow hematopoiesis. *Zhonghua Xinxueguanbing Zazhi*, 1988, 9:148–149.
13. Wang Y, Zhu B. The effect of *Angelica* polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*, 1996, 76:363–366.
14. Hirata JD et al. Does dong quai have estrogenic effects in postmenopausal women? A double-blind, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, 1997, 68:981–986.
15. Mueller A. Versuche über die Wirkungsweise des Extrakts des chinesischen Emmenagogen Tang-kui (Man-mu) oder Eumenol-Merek. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1899, 46:796–798.
16. Langes H. Beobachtungen bei der Verwendung einiger neuer Medikamente. Eumenol, Dionin und Stypticin. *Therapeutische Monatshefte*, 1901, 7:363.
17. Palm R. Erfahrungen mit Eumenol. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1910, 1: 23–25.
18. Buck P. Un nouveau remède spécifique contre la dysmenorrhée: l'eumenol. *Belgique médicale*, 1899, 2:363–365.
19. Chang HM, But PPH, eds. *Pharmacology and applications of Chinese materia medica. Vol. 1*. Philadelphia, PA, World Scientific Publishing, 1986.
20. Mei QB, Tao JY, Cui B. Advances in the pharmacological studies of *Radix Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Chinese danggui). *Chinese Medical Journal*, 1991, 104:776–781.
21. Duke JA, Ayensu ES. *Medicinal plants of China. Vol. 1*. Algonac, MI, Reference Publications, 1985.
22. Schmidt CF et al. Experiments with Chinese drugs. 1. Tang-kuei. *Chinese Medical Journal*, 1924, 38:362.

## WHO monographs on selected medicinal plants

23. Shi M, Chang L, He G. Stimulating action of *Carthamus tinctorius* L., *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and *Leonurus sibiricus* L. on the uterus. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1995, 20:173–175.
24. Pi XP. Effects of *Angelica sinensis* on uterus. *National Medical Journal of China*, 1955, 40:967.
25. Tao JY et al. Studies on the antiasthmatic action of ligustilide of dang-gui, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 1984, 198:561–565.
26. Xiong X et al. The protective effect of Radix Angelicae Sinensis against acute liver damage by D-galactosamine in rats: a histochemical study. *Wu-han I Hsueh Yuan Hsueh Pao*, 1982, 11:68–72.
27. Lin YH et al. Protective effect of sodium ferulate on damage of the rat liver mitochondria induced by oxygen free radicals. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 1994, 29:171–175.
28. Wang H, Peng RX. Sodium ferulate alleviated paracetamol-induced liver toxicity in mice. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 1994, 15:81–83.
29. Wu DF et al. Sodium ferulate alleviates prednisolone-induced liver toxicity in mice. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1988, 30:801–805.
30. Wu DF, Peng RX. The effect of sodium ferulate on bromobenzene-induced liver injury in mice. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 1995, 30:597–599.
31. Chou YP. The effect of *Angelica sinensis* on hemodynamics and myocardial oxygen consumption in dogs. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1979, 14:156–160.
32. Pen RX. Pharmacological effects of danggui (*Angelica sinensis*) on cardiovascular system. *Chinese Traditional Herb Drugs*, 1981, 12:321.
33. Cha L. Effects of *Angelica sinensis* on experimental arrhythmias. *Chinese Pharmaceutical Bulletin*, 1981, 16:259.
34. Cha L, Chien CC, Lu FH. Antiarrhythmic effect of *Angelica sinensis* root, tetrandrine and *Sophora flavescens* root. *Chinese Pharmaceutical Bulletin*, 1981, 16:53–54.
35. Wei ZM et al. A study on the electrophysiology in antiarrhythmia effect of *Angelica sinensis*. *Journal of Beijing College of Traditional Chinese Medicine*, 1985, 8:40.
36. Chen SG et al. Protective effects of *Angelica sinensis* on myocardial ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Chung-kuo Chung His I Chieh Ho Tsa Chih*, 1995, 15:486–488.
37. Hon PM. A ligustilide dimer from *Angelica sinensis*. *Phytochemistry*, 1990, 29:1189–1191.
38. Han GQ. The screening of Chinese traditional drugs by biological assay and the isolation of some active components. *International Journal of Chinese Medicine*, 1991, 16:1–17.
39. Yin ZZ. The effect of danggui (*Angelica sinensis*) and its ingredient ferulic acid on rat platelet aggregation and release of 5-HT. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1980, 15:321.
40. Xu LN. Effect of sodium ferulate on arachidonic acid metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1990, 25:412.
41. Chen YC, Gao YQ. Research on the mechanism of blood-tonifying effect of dang-gui buxue decoction. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 1994, 19:43–45, 63.
42. *Compendium of materia medica*. Shanghai, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Science and Technical Press, 1996:1341–1355.
43. Lo A et al. Danggui (*Angelica sinensis*) affects the pharmacodynamics but not the pharmacokinetics of warfarin in rabbits. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1995, 20:55–60.



# MONOGRAFÍAS TIPO OMS DE PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO I

## *Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray. ASTERACEAE

### EFICACIA, SEGURIDAD Y MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD



2006

**AUTORES**

**Identificación botánica**

Dr. Robert Bye Büttler  
Instituto de Biología  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

**Identificación microscópica**

Dr. Robert Bye Büttler, M. en C. Esthela Sandoval  
Instituto de Biología  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

**Fitoquímica**

M. en C. Blanca Estela Rivero-Cruz, Dra. Rachel Mata Essayag  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

Dr. Carlos Cerda García Rojas  
Departamento de Química  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV, IPN)  
México DF, 07000, México

**Procedimientos analíticos**

M. en C. Blanca Rivero Cruz, M. en C. Isabel Rivero-Cruz, M. en C. Juan Manuel Rodríguez, Dra. Rachel Mata Essayag  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

Dr. Carlos Cerda García Rojas  
Departamento de Química  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV, IPN)  
México DF, 07000, México

**Farmacología y Toxicología**

M. en C. Blanca Estela Rivero-Cruz, Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres, M. en C. Isabel Rivero-Cruz, Dra. Myrna Déciga Campos, Dra. Rachel Mata Essayag.  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México

Dra. Alejandra Rojas Molina  
Facultad de Química  
Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)  
Centro Universitario 7610, Querétaro, México

Dra. Myriam Arriaga Alba  
Laboratorio de Microbiología, Hospital Juárez de Mexico

México DF.

**Historia**

Dr. Paul Hersch Martínez  
Programa Actores Sociales de la Flora Medicinal en México  
Matamoros No. 14 Col. Acapatzingo, Cuernavaca, Morelos  
Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH)

**Esta monografía se generó a partir de los resultados de la Tesis de Doctorado de la Maestra Blanca Rivero Cruz.**

## HISTORIA

*Brickellia veronicaefolia* es una planta originaria de México y se utiliza para tratar desórdenes gastrointestinales, tales como el dolor de estómago y los cólicos agudos, también se utiliza para curar el reumatismo, dolores de apéndice y contra las enfermedades biliares. El nombre de brickellia viene de la palabra “brickel”, que significa arbusto.

A través de la historia *B. veronicaefolia* se ha designado con distintos nombres, tanto científicos como comunes. Así, Leonardo Oliva en sus *Lecciones de Farmacología* de 1854 la designa como *Bulbostylis veronicaefolia* y gobernadora de Puebla, preconizándola para tratar dolores artríticos, en baños o fomentos, y “fortalecer los nervios” (Oliva, 1854). En la segunda edición de la Farmacopea Mexicana de 1876, aparece como *Eupatorium veronicaefolia*, y gobernadora de Puebla. En este documento la planta estaba indicada en baños o fomentos para curar los dolores artríticos (Río de la Loza *et al.*, 1874). Cabe mencionar que esa fue la primera vez que esta especie se mencionó en la Farmacopea Mexicana.

Felipe García Flores dedicó en 1887 su tesis de farmacia al “orégano de cerro”, conocida entonces como *Eupatorium pextum* y luego como *Brickellia veronicaefolia*. En dicho trabajo se señalan como usos populares de la planta, su decocción para dolores de estómago y falta de digestión, y combinada con menta, pétalos de rosa, tequesquite y semilla de aguacate, para “corregir deposiciones” (García-Flores, 1887; Ortiz, 2002).

En 1888, Villada describe en un artículo de la *Gaceta Médica de México* su empleo, “con excelentes resultados por el vulgo y aún por los médicos” en el tratamiento de la dispepsia atónica y la gastralgia (Villada, 1888).

*B. veronicaefolia* aparece también como gobernadora de Puebla en las ediciones de 1898 y 1904 de la Farmacopea Mexicana, en estos textos aparecen documentados los siguientes usos populares: la infusión para curar la gastralgia y la dispepsia atónica; y en baños y fomentos para calmar los dolores artríticos y las reumas (Herrera, 1896; Calderón *et al.*, 1904). Con idénticas indicaciones a las señaladas en la Farmacopea Mexicana, aparece en la *Historia de Drogas* de Juan Manuel Noriega (Noriega, 1902).

En el Instituto Médico Nacional, otra *Brickellia*, la *cavanillesii* o atanasia amarga, fue estudiada clínicamente en el Hospital de San Andrés por sus efectos contra la indigestión y la anorexia sin obtenerse resultados concluyentes (Guerra, 1950).

La infusión de *B. veronicaefolia* aparece también señalada como eupéptica y antigastrálgica en la *Farmacología Nacional* del Instituto Médico Nacional (AAVV, 1913).

En 1939, Maximino Martínez consigna como usos de esta planta los ya referidos en la Farmacopea Mexicana y en la tesis de García Flores, sin mencionar los usos empíricos de fuente directa (Martínez, 1994).

Finalmente, en la *Farmacopea Mexicana* de la Sociedad Farmacéutica Mexicana (1952) se repite su indicación como eupéptica y antigastrálgica (Ugalde *et al.*, 1967).

**NOMBRE BOTÁNICO**

*Brickellia veronicifolia* (Kunth) A. Gray

**Syn:** *Brickellia veronicaefolia* (Kunth) Gray.

*Brickellia veronicaefolia* (HBK) Gray.

*Brickellia petrophila* Rob.

*Coleosanthus veronicifolius* Kunth.

*Coelusanthus veronicifolius* (HBK) Ktze.

*Coleosanthus veronicaefolia*.

*Eupatorium veronicaefolium* HBK.

*Eupatorium veronicaefolia* Kunt.

*Bulbostylis veronicaefolia* D.C.

*Eupatorium glechomofolium* FMI.

*Eupatorium veronicaefolium* K.

*Eupatorium pextum* (Oliva, 1854; Río de la Loza *et al.*, 1874; García-Flores, 1887; Villada, 1888; Noriega, 1902; Ramírez y Alcocer, 1902; Martínez, 1994; Calderón y Rzedowski, 2001)

**FAMILIA**

Asteraceae (Compositae).

**DEFINICIÓN**

Consiste en las partes aéreas frescas o secas de *Brickellia veronicifolia*.

**NOMBRES COMUNES**

Chilaco blanco, gobernadora de Puebla, gordolobo corriente, hierba del aíto, hierba del haito, hierba del jaito, hierba del perro, hierba dorada, mejorana, mejorana de campo, oreganillo, organito, orégano de campo, orégano de cerro, orégano de monte, peishtón o peistón, pestón, pexton, peisto, peistó chiquito, peiston, peixtón, pesto, pexto, pixto, señate, sayahuaxtle (Oliva, 1854; Villada, 1888; Ramírez y Alcocer, 1902; AAVV, 1913; Ugalde *et al.*, 1967;

Senties-Guraieb, 1984; Aguilar *et al.*, 1994; Argueta *et al.*, 1994; Santamaría, 2000)

**IDENTIFICACIÓN****Descripción botánica**

*Brickellia veronicifolia* es un arbusto pequeño cuyas medidas oscilan entre 40 cm y 1 m de altura. Presenta hojas pequeñas, opuestas, acorazonadas o reniformes de 4 a 15 cm de largo por unos 5 cm de ancho, borde crenado, pecíolos de 3 a 6 cm de largo; las flores en cabezuelas miden de 12 a 17 mm y son blancas o rosadas de un olor almizclado, de sabor amargo y picante a la vez (Villada, 1888; Argueta *et al.*, 1994).

**DISTRIBUCIÓN**

*Brickellia veronicaefolia* es originaria de México. La especie tiene por hábitat zonas con vegetación muy perturbada de matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña, de encino y de pino, a una altitud de 1750 a 2750 m sobre el nivel del mar en climas frío, semiseco y templado. Se le ubica principalmente en lomas y cerros (Argueta *et al.*, 1994).

La planta se distribuye en Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Guerrero (Taxco), Hidalgo (Pachuca), Jalisco, México (Toluca), Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla (Tehuacan y alrededores de la ciudad), Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Valle de México (cerro de Guadalupe), Veracruz y Zacatecas (Oliva, 1854; Río de la Loza *et al.*, 1874; Villada, 1888; Holway, 1901; Ugalde *et al.*, 1967; Martínez, 1979; Calderón y Rzedowski, 2001).



**Figura 1a.** *B. veronicaefolia*.



**Figura 1d.** Droga cruda.



**Figura 1b.** Hojas de *B. veronicaefolia*.



**Figura 1e.** Hojas frescas de *B. veronicaefolia*.



**Figura 1c.** Flores de *B. veronicaefolia*.



**Figura 1f.** *B. veronicaefolia*.

## PRUEBAS DE IDENTIDAD BOTANICAS

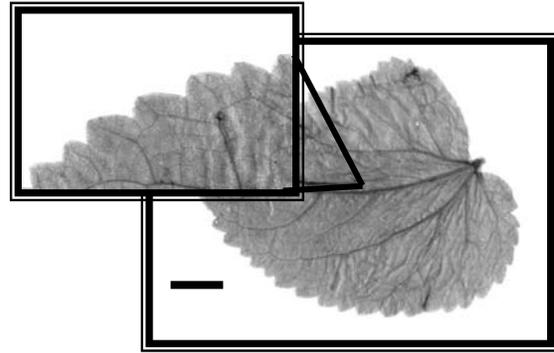
### Identificación microscópica

#### Anatomía microscópica de la hoja

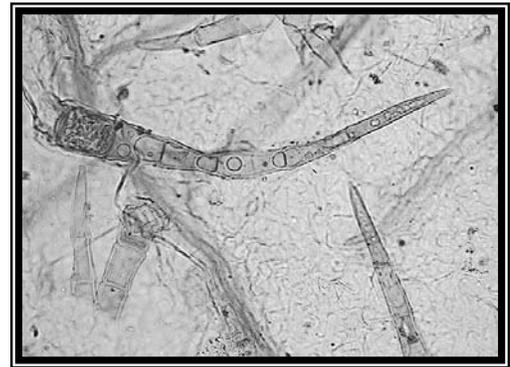
La **hoja** presenta lámina de tipo notófila, con forma ovada, asimétrica y ápice agudo. La base es de forma cordada con unión peciolar y un margen de tipo dentado. Los dientes son de forma convexo/convexo y el ápice del diente es simple y sin lóbulos. El patrón de venación es de tipo actinodromo basal. El arreglo de las venas secundarias es de tipo broquidodromo festonado con tres venas basales de primer orden y una de segundo; el espaciamiento de las venas es de segundo orden. Las venas intersecundarias son inconspicuas, en tanto que, las venas terciarias son percurrentes y alternas; las areolas son conspicuas y de forma poliédrica con escasas venas terminales no ramificadas.

La **Epidermis adaxial** (vista superficial) presenta abundantes tricomas glandulares de dos tipos. El primer tipo esta distribuido tanto en la región costal como en la intercostal; además es uniseriado y multicelular; la proyección del tricoma presenta de 6 a 9 células cuadradas o rectangulares cuyas paredes están engrosadas. Las células del pie presentan forma de cono truncado y las células terminales son alargadas y con el extremo libre ahusado. Se observan contenidos en forma de gotas, similares a lípidos. El segundo tipo de tricomas es menos abundante y está distribuido en la región intercostal, su forma es diferente y son visiblemente más cortos. Estos tricomas presentan dos tipos de células, uno es de forma cilíndrica y se encuentra

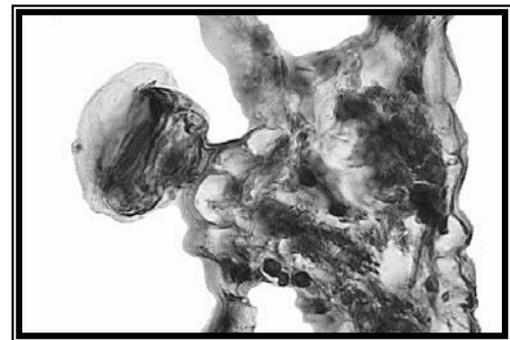
formando el tallo y el otro es globoso y forma la cabeza del mismo.



**Figura 2a.** Vista superficial de la hoja.



**Figura 2b.** Tricomas glandulares.



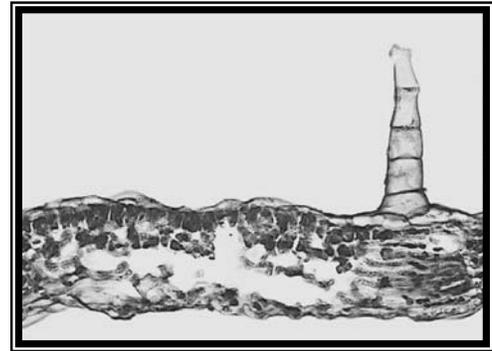
**Figura 2c.** Tricoma glandular globoso.

La epidermis adaxial presenta también células costales e intercostales. Las células costales son de forma rectangular, con paredes engrosadas y organizadas en hileras paralelas a las venas. Las células intercostales son de forma irregular con paredes anticlinales sinuosas y ligeramente engrosadas. No presenta estomas. En la sección transversal la epidermis es monoestratificada y su cutícula está ligeramente engrosada (2.5  $\mu\text{m}$ ); las células son de forma obloide y de tamaño variado.

En la **epidermis abaxial** (vista superficial) los tricomas son abundantes y de forma similar a los observados en la epidermis adaxial. La epidermis abaxial presenta células costales e intercostales. Las células costales son similares a las presentes en la epidermis adaxial. Las células intercostales también presentan similitud con las de la epidermis adaxial pero sus paredes son delgadas. Los estomas presentes son de tipo anomocítico. Las células epidérmicas adyacentes a las oclusivas presentan estriaciones. En la sección transversal la epidermis es monoestratificada y posee una cutícula ligeramente engrosada además las células son más pequeñas que las de la epidermis adaxial.

**Mesófilo** (sección transversal). En el extremo adaxial se observan de uno a dos estratos de células ligeramente sinuosas y alargadas en sentido perpendicular a la superficie. Los contenidos celulares son abundantes y similares a taninos. Los espacios aéreos son frecuentes entre ellas. Hacia el extremo medio abaxial se observa un parénquima con escasas células

lobuladas de forma irregular y con contenidos celulares similares.

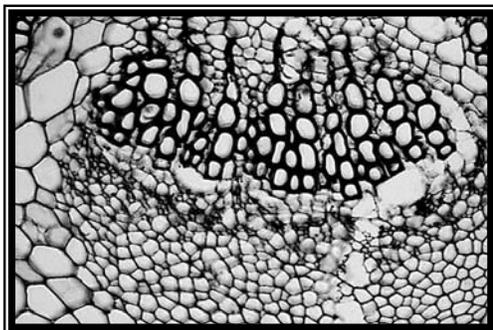


**Figura 2d.** Mesófilo con espacios aéreos.

**Vena media** (sección transversal). La epidermis adaxial es monoestratificada con células de forma obloide o isodiamétrica y sus paredes están tangenciales engrosadas. La epidermis abaxial es monoestratificada con células de diferentes tamaños y similares en forma a las de la epidermis adaxial. El tejido fundamental presenta colénquima de tipo laminar con dos o tres estratos en el extremo adaxial y uno en el extremo abaxial; el resto del tejido fundamental presenta células isodiamétricas de paredes delgadas y sin contenidos celulares. El tejido vascular presenta tres grandes haces vasculares colaterales distribuidos en forma de media luna con el xilema hacia el extremo adaxial y el floema hacia el extremo abaxial.

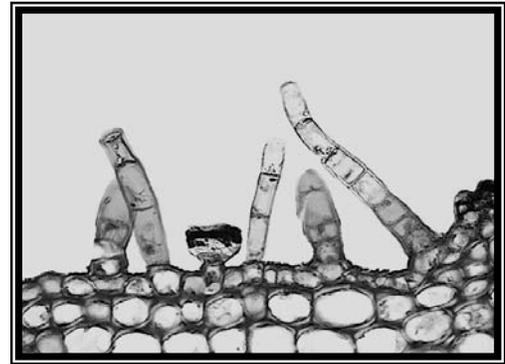
**Pecíolo.** El tejido dérmico presenta tricomas glandulares de dos tipos. El primer tipo de tricomas es uniseriado y multicelular. Las células de la proyección son rectangulares; las células del pie son más cortas que las restantes y

con estriaciones similares a las observadas en las células epidérmicas. Todas ellas poseen paredes celulares engrosadas con contenidos celulares similares a cristales. El segundo tipo de tricomas es pequeño, escaso y con tres células. Las células basales presentan forma de cono truncado y su pared celular está engrosada; las células intermedias semiglobosas presentan paredes celulares menos engrosadas y las células terminales globosas también poseen pared celular poco engrosada. En todas ellas se observa abundante contenido celular. La cutícula es estriada de 5  $\mu\text{m}$  de grosor; la epidermis es monoestratificada; sus células son isodiamétricas, oblongas y cuadradas y sus paredes están tangenciales engrosadas. El tejido fundamental incluye dos regiones. La región externa presenta dos o tres estratos de colénquima tipo laminar y en el centro presenta células isodiamétricas de paredes delgadas y de mayor tamaño que las colenquimatosas. El tejido vascular está formado por 6 ó 7 haces colaterales de diferente tamaño distribuidos en forma de media luna, el xilema está en posición adaxial y floema en posición abaxial.



**Figura 2e.** Haz vascular de la vena media.

**Xilema.** Presenta abundantes vasos como elementos de conducción, éstos están organizados en hileras radiales inmersos en el parénquima, los diámetros tangenciales son variados.



**Figura 2f.** Tricomas glandulares.

**Floema.** Está organizado como un sólo paquete, presenta células cribosas y acompañantes. El parénquima es más abundante en el extremo distal del haz, en este nivel algunos haces contienen escasas fibras.

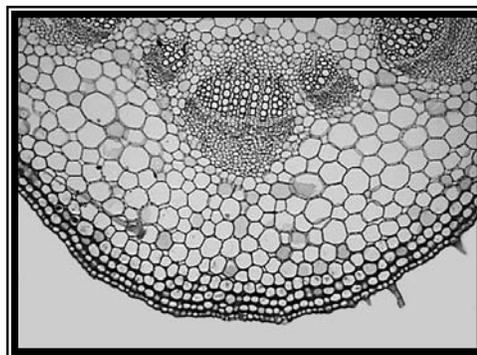
### *Anatomía microscópica del tallo*

**Tejido dérmico** (sección transversal). El tejido dérmico presenta tricomas evidentes pero no determinados; la epidermis es monoestratificada y sus células son de forma obloide o rectangular. En algunas zonas la epidermis se observa obliterada.

**Tejido fundamental** (sección transversal). El córtex posee dos regiones, la periférica y la central. La región periférica incluye un colénquima de tipo laminar con tres o cuatro estratos celulares; las células son rectangulares, de mayor tamaño que las células

epidérmicas y con un eje longitudinal perpendicular a la superficie del tallo. La región central ocupa dos tercios del córtex y las células parenquimatosas, de paredes delgadas, están tangencialmente alargadas. La médula está formada por tejido parenquimático con células de forma isodiamétricas, grandes y de paredes delgadas. No se observan espacios aéreos y los contenidos celulares son conspicuos no determinados.

**Tejido vascular** (sección transversal). El tejido vascular presenta un floema exarca y un xilema endarca y, está formado por un anillo continuo alrededor del tallo. El xilema posee vasos como elementos principales de conducción y están distribuidos en cadenas radiales, alternadas con bandas de fibras. Los vasos más grandes tienen 35  $\mu\text{m}$  de diámetro tangencial y son de tres tipos. El primer tipo presenta engrosamientos helicoidales y placas terminales simples casi horizontales; el segundo tipo de vasos posee engrosamientos escalariformes con placa terminal simple y ángulo de inclinación de 45°. El tercero, y último tipo de vasos tiene ornamentaciones en sus paredes laterales, similares a puntos bordeados, alternos de vaso a vaso y de vaso a radio. La placa terminal es simple y el ángulo de inclinación es de 90°. Las fibras son de tipo libriforme, algunas de ellas son septadas y con restos de contenido celular. De manera general las fibras son más cortas y angostas, sin septos ni contenidos celulares evidentes. El floema presenta células cribosas y acompañantes hacia el extremo distal con un casquete de fibras fuertemente lignificadas.



**Figura 2g.** Córtex y tejido vascular.

## PRINCIPALES CONSTITUYENTES

### *Benzoatos de bencilo*

*B. veronicaefolia* contiene los siguientes benzoatos de bencilo: el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo, el 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxi-bencilo, el 2-hidroxi-6-metoxi-benzoato de bencilo, el 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo, el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxi-bencilo y el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo (Rivero *et al.*, 2005).

### *Flavonoides*

Los diferentes estudios fitoquímicos de *B. veronicaefolia* han permitido el aislamiento de trece flavonoides. Los compuestos se caracterizaron como: la artemetina, la casticina, la eupatina, la eupatolitina, la 3,6,7-trimetoxiquercetagina, la brickellina, la centaureidina, el digalactósido de la

veronicafolina, el galactósido de la eupatolítina y los sulfatos de la eupatina, eupatolítina, patuletina y veronicafolina. (Roberts *et al.*, 1980 y 1984; Pérez *et al.*, 2000).

### *Sesquiterpenoides*

El germacrano D, el camazuleno, el biciclogermacrano, el  $\beta$ -eudesmol y el  $\beta$ -cariofileno fueron aislados a partir del aceite esencial de la especie (Rivero *et al.*, 2005).

### *Compuestos aromáticos*

El ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico, el ácido 2-metoxibenzoico y el  $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-*O*-(2-metoxibenzoilo) fueron aislados a partir de un extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (Rivero *et al.*, 2005).

### *Otros constituyentes*

Otros metabolitos secundarios aislados de esta planta son: el  $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo, el acetato de taraxasterilo, el taraxasterol y los ácidos diterpénicos 2 $\alpha$ -hidroxi-3 $\alpha$ -(2-hidroxi-2-metil-butiriloxi) catívico y 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroxicatívico (Calderón *et al.*, 1983; Rivero *et al.*, 2005).

## **PROCEDIMIENTOS ANALITICOS DE IDENTIDAD Y COMPOSICIÓN**

### *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)*

#### 1) Análisis del aceite esencial

Preparación de la esencia: colocar 30 g de material vegetal fresco en un matraz pera de 500 mL, adicionar 250 mL de

agua destilada y extraer la esencia mediante un proceso de hidrodestilación. Separar el aceite esencial del destilado mediante un proceso de partición con diclorometano. Extraer tres veces. Combinar las fases orgánicas resultantes y concentrar a presión reducida. El residuo obtenido es de color azul intenso.

### *Condiciones cromatográficas*

Columna:

HP 5 % metil silicón, 30 m x 0.32 mm de diámetro.

Temperatura de la columna:

La temperatura de la columna se programa de 70-250 °C con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min.

Gas acarreador:

Emplear helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min.

Detección:

El voltaje para el registro de los espectros de masas a utilizar es de 70 eV.

Volumen de inyección:

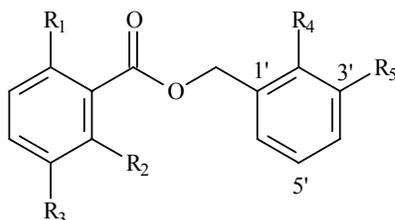
10  $\mu$ L.

Interpretación:

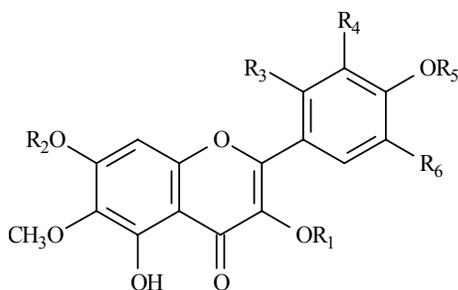
El cromatograma de gases resultante debe indicar la presencia de siete componentes mayoritarios.

#### Identificación de picos:

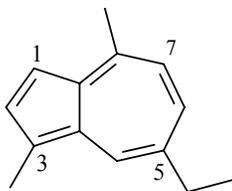
	Compuesto	t <sub>R</sub> Relativo
1	$\beta$ -cariofileno	5.5
2	germacrano D	5.9
3	biciclogermacrano	6.0
4	$\beta$ -eudesmol	6.9
5	camazuleno	7.5
6	2,6-dimetoxibenzoato de bencilo	10.4
7	2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo.	10.7

**BENZOATOS DE BENCILO**

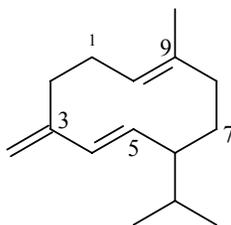
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
2,6 dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo	OMe	OMe	H	H	OH
3'-β-D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo	OMe	OMe	H	H	β-D-glucosiloxi
2 hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo	OH	H	H	OMe	H
2,6 dimetoxibenzoato de bencilo	OMe	OMe	H	H	H
2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo	OH	OMe	H	H	OMe
2-hidroxi-6-metoxibenzoato de bencilo	OH	OMe	H	H	H
2,3,6-trimetoxibenzoato de bencilo	OMe	OMe	OMe	H	H
2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo	OH	OMe	OMe	H	H
2,6 dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo	OMe	OMe	H	H	OMe

**FLAVONOIDES**

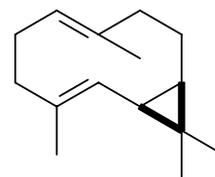
Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
Artemetina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Casticina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
Eupatina	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
Eupatolitina	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
3,6,7-trimetoxiquercetina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
Digalactósido de la veronicafolina	Gal-gal	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
Galactósido de eupatolitina	Gal	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
Sulfato de eupatina	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
Sulfato de eupatolitina	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
Sulfato de patuletina	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	H	H	H
Sulfato de veronicafolina	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H
Brickellina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Centaureidina	CH <sub>3</sub>	OH	H	OH	CH <sub>3</sub>	H

**SESQUITERPENOIDES**

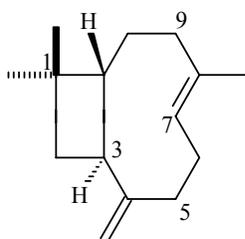
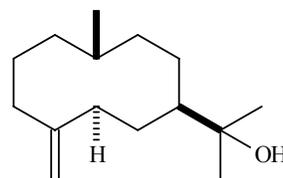
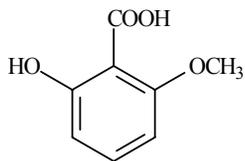
Camazuleno



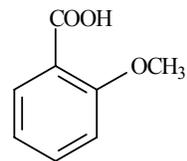
Germacrano D



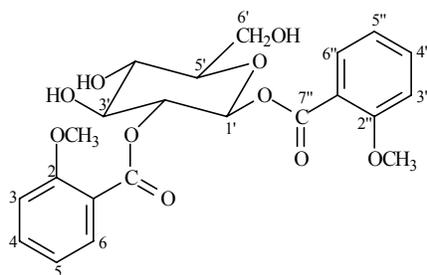
Biclogermacrano

 $\beta$ -cariofileno $\beta$ -eudesmol**COMPUESTOS AROMÁTICOS**

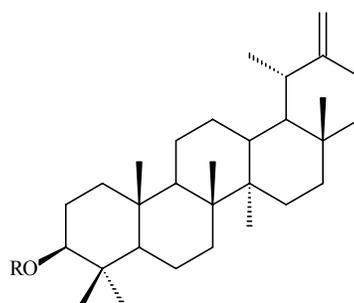
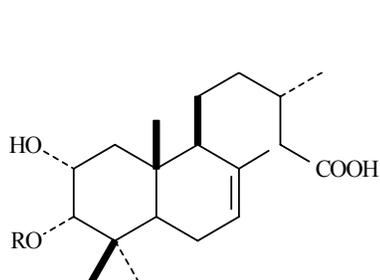
ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico



ácido 2-metoxibenzoico

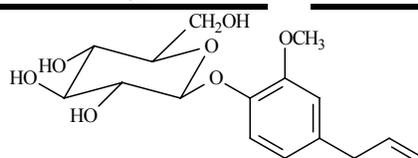
 $\beta$ -D-glucopiranosido del 1,2 bis-O-(2- metoxibenzoilo)

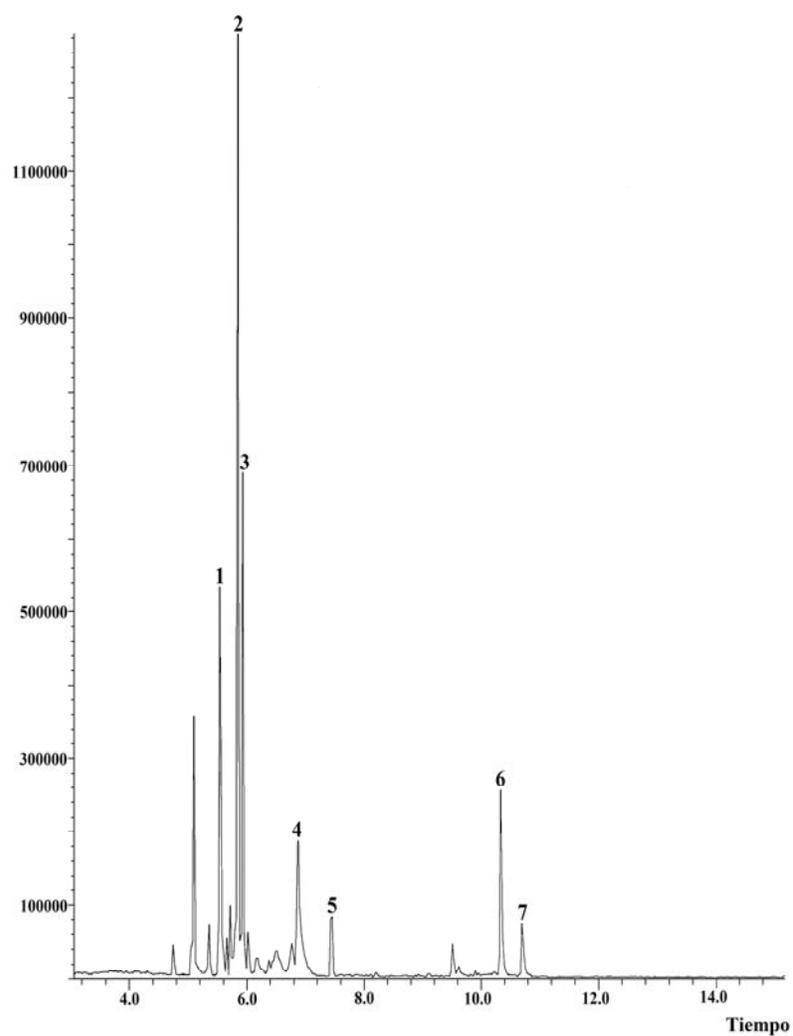
## OTROS CONSTITUYENTES



Compuesto	R <sub>1</sub>
Ácido 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihidroxicatívico	H
Ácido 2 $\alpha$ -hidroxi-3 $\alpha$ -(2-hidroxi-2-metil-butiriloxi) catívico	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  -\text{CO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\    \\  \text{OH}  \end{array}  $

Compuesto	R <sub>1</sub>
Taraxasterol	H
Acetato de taraxasterilo	COCH <sub>3</sub>

 $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxi-fenilo



**Figura 3.** Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. veronicaefolia*. Asignación de picos: (1)  $\beta$ -cariofileno, (2) germacrano D, (3) bicilogermacrano, (4)  $\beta$ -eudesmol, (5) camazuleno, (6) 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo y (7) 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo.

### **Resonancia magnética nuclear protónica (RMN $^1\text{H}$ )**

Reactivos:

Cloroformo deuterado: grado RA

1,4-dimetoxibenceno: 99.9%

Tetrametilsilano: 99.9%

Preparación de la muestra:

50.0 mg de la esencia y 1.0 mg de 1,4-dimetoxibenceno se colocan en un tubo de resonancia que contiene exactamente 0.8 mL de  $\text{CDCl}_3$ .

Condiciones de análisis:

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) se registran utilizando tetrametilsilano como referencia interna.

Secuencia de pulsos:

Los espectros se adquieren utilizando una secuencia de pulsos estándar (*s2pul*) a 45 deg (9.0  $\mu\text{s}$ ). El tiempo de relajación es de 1 s y el tiempo de adquisición es de 3.636 s en 64K puntos. Para cada muestra deben recorrerse 256 scans. El tiempo total de análisis es de 21 min. Durante el análisis la resolución digital debe mantenerse por debajo de 0.4 Hz.

Cálculos:

Para determinar el valor de cada integral utilizar el programa Mestre-C. El ajuste de la fase y la corrección de la línea base se realiza en el intervalo de 7.10-4.20 donde aparecen las señales diagnósticas para los siete compuestos analizados.

La cantidad en miligramos de cada compuesto se calcula por medio de la fracción mol. La fracción mol de cada componente es el cociente del área de cada señal entre el área total del espectro.

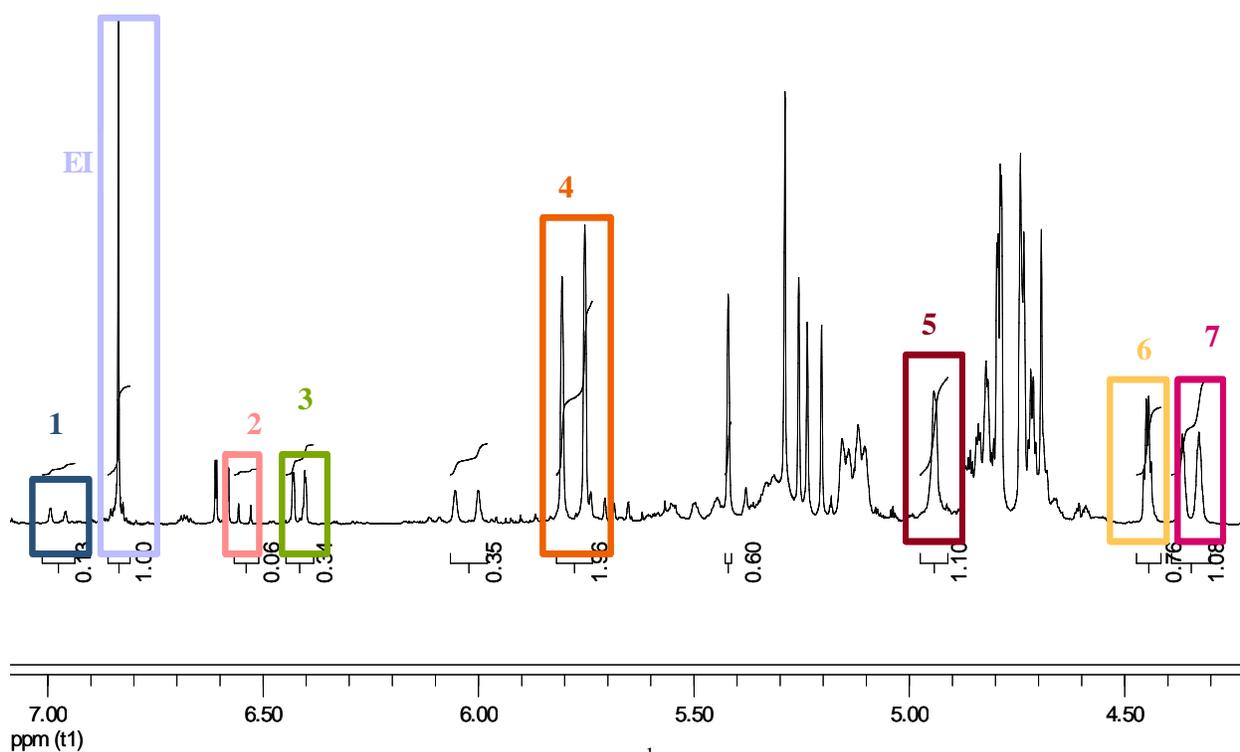
Interpretación:

En el intervalo comprendido entre  $\delta_{\text{H}}$  7.10-6.20 se observan las señales para el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo y el camazuleno. Por analogía con los desplazamientos químicos observados en los espectros de los compuestos puros, las señales en  $\delta_{\text{H}}$  6.54 (d,  $J = 8.8$  Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  6.42 (d,  $J = 8.4$  Hz) corresponden a los protones H-3/H-5 y H-3 de los productos 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo y 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo, respectivamente. En tanto que la absorción en  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (d,  $J = 10.8$  Hz) pertenece al protón H-5 del camazuleno. En la región comprendida entre  $\delta_{\text{H}}$  5.90-4.30 se observan las absorciones correspondientes a los hidrógenos vinílicos del germacrano D ( $\delta_{\text{H}}$  5.78, d,  $J = 15.9$  Hz, H-5), el  $\beta$ -eudesmol ( $\delta_{\text{H}}$  4.48, m, H-14), el  $\beta$ -cariofileno ( $\delta_{\text{H}}$  4.95, sa, H-15) y el biciclogermacrano ( $\delta_{\text{H}}$  4.33, d,  $J = 11.5$  Hz, H-5). Finalmente, en  $\delta_{\text{H}}$  6.84 se observa la señal para el 1,4-dimetoxibenceno. Este compuesto es utilizado como estándar interno debido a que su señal no interfiere con las distintas señales de los compuestos a analizar.

### **PRUEBAS DE PUREZA**

#### **Límites microbianos:**

Ausencia de microorganismos objetables de acuerdo con los límites establecidos en la guía de procedimientos para el control de calidad de plantas medicinales publicados por la OMS (WHO, 1998).



**Figura 4.** Vista parcial del espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz en  $\text{CDCl}_3$ ) del aceite esencial de *Brickellia veronicaefolia*. Asignación de señales: ■ camazuleno, ■ estándar interno, ■ 2,6-dimetoxi-benzoato de bencilo, ■ 2-hidroxi benzoato de 2'-metoxi bencilo, ■ germacrano D, ■  $\beta$ -cariofileno, ■  $\beta$ -eudesmol, ■ biciclogermacrano.

#### **Materia extraña:**

No más del 2% (WHO, 1998).

#### **Residuo de pesticidas:**

Consultar los límites establecidos en la guía de procedimientos para el control de calidad de plantas medicinales publicada por la OMS (WHO, 1998).

#### **Metales pesados:**

Consultar los límites establecidos en la guía de procedimientos para el control de calidad de plantas medicinales publicada por la OMS (WHO, 1998).

### **ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS QUE SUSTENTAN LAS PROPIEDADES MEDICINALES ATRIBUIDAS A LA PLANTA**

#### **Relajación del músculo liso gastrointestinal**

El extracto íntegro de *B. veronicaefolia* y su aceite esencial provocan la relajación de las contracciones espontáneas del íleon aislado de cobayo de manera dependiente de la concentración. Los valores de  $\text{CI}_{50}$

calculados fueron de 39.22 y 0.27  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Los principios activos responsables de esta actividad fueron: el  $\beta$ -D-glucopiranosido de 4-alil-2-metoxifenilo, el ácido 2-hidroxi-6-metoxibenzoico, el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-hidroxibencilo, el 3'- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi de 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo, el 2-hidroxi-5,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2,6-dimetoxibenzoato de 3'-metoxibencilo, el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo el acetato de taraxasterilo y el camazuleno (Rivero *et al.*, 2005).

A nivel molecular el 2,6-dimetoxibenzoato de bencilo, el 2-hidroxi-6-metoxibenzoato de 3'-metoxibencilo, el 2-hidroxibenzoato de 2'-metoxibencilo y el camazuleno inhiben la actividad del complejo PDE1-CaM- $\text{Ca}^{2+}$ . Los valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados fueron de 12.02, 14.59, 10.61 y 18.24  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### **Actividad hipoglucemiante**

Un extracto hexánico presentó un efecto hipoglucemiante en ratones diabéticos ya que disminuyó los niveles de glucosa en un 72 % a la dosis de 300 mg/Kg en 24 h. (Pérez-Gutierrez, 1998; Pérez *et al.*, 2000). No se ha determinado el principio activo.

### **Actividad antimicrobiana**

Un extracto de las partes aéreas de la especie presentó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella lutea*, *Bacillus subtilis* y *Shigella disenteriae* (Argueta *et al.*, 1994).

### **Actividad antioxidante**

La flavona centaauridina aislada de la planta presentó actividad antioxidante *in vitro*. Este compuesto atrapa los radicales libres ABTS e inhibe la degradación de la 2-desoxi-2-ribose (Pérez *et al.*, 2004).

### **Actividad analgésica**

Un extracto íntegro de la especie preparado con una mezcla de metanol y diclorometano, a partes iguales, presentó un efecto analgésico significativo en ratones, en el modelo de la placa caliente. La administración oral del extracto a la dosis de 600 mg/Kg disminuyó de manera significativa la latencia en la respuesta de la placa caliente. El efecto fue dependiente de la dosis. El extracto también presentó actividad analgésica en ratones en un modelo de estiramiento abdominal. En este caso la administración oral de 150, 300 ó 600 mg/Kg del extracto inhiben significativamente el número de estiramientos provocados por una inyección *ip* de una solución de ácido acético al 0.6 % (Angeles y Castañeda, 2006).

## **ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS**

### **Toxicidad aguda**

La toxicidad aguda del extracto íntegro de la especie preparado con una mezcla de metanol y diclorometano, a partes iguales, se determinó en ratones de acuerdo al procedimiento de Lorke. La  $\text{DT}_{50}$  calculada fue de 2852 mg/Kg. Durante el desarrollo del experimento los animales no mostraron efectos tóxicos visibles ni disminución del peso corporal en relación a los grupos control.

Asimismo, el análisis macroscópico de los órganos y tejidos de los animales no revelaron anomalías o alteraciones.

***Prueba de Ames***

El ensayo de Ames permitió comprobar que el extracto íntegro de la especie preparado con una mezcla de metanol y diclorometano, a partes iguales, no provoca genotoxicidad.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. AAVV (1913). *Farmacología Nacional formada por el Instituto Médico Nacional de México*. México: Ed. Tipografía Económica.
2. Aguilar, A. J., Camacho, R., Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información etnobotánica*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
3. Angeles, G. y Castañeda, G. (2006). Evaluación de la toxicidad y efecto antinociceptivo de especies medicinales selectas de México. Tesis en Química, Facultad de Química, UNAM.
4. Argueta, A. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. Tomo II, México: Instituto Nacional Indigenista, pp 1135-1136.
5. Arthur, J. C. (1905). Rusts on Compositae from Mexico. *Botanical Gazette*, **40**, 196-208.
6. Calderón de Rzedowski, G. y Rzedowski, J. (2001). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. México: Instituto de Ecología y Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.
7. Calderón, J. B., Uribe, A., Noriega, J. M., Morales, J. D., Lozano y Castro, M., Bustillos, F., Solórzano, F. y Arriaga, F. (1904). *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México*. México: Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
8. Calderón, J. S., Quijano, L., Cristia, M., Gomez, F., y Rios, T. (1983). Labdane diterpenes from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytochemistry*, **22**, 1783-1785.
9. Deciga-Campos, M, González-Trujano, E, Navarrete, A. y Mata, R. (2005). "Antinociceptive effect of selected Mexican traditional medicinal species". *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, **48**, 70-72.
10. García-Flores, F. (1887). *Ligero estudio sobre el pexto u orégano del cerro*. Tesis de Farmacia. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
11. Guerra, F. (1950). *Bibliografía de la Materia Médica Mexicana*. México: La Prensa Médica Mexicana.
12. Herrera, A., Herrera, A. L., Uribe, A., Lasso de la Vega, J. M., De Jáuregui, M. F., Calderón, J. B. y Pérez, S. (1896). *Nueva Farmacopea de la Sociedad Farmacéutica de México*. México: Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
13. Holway, E. W. D. (1901). Mexican Fungi III. *Botanical Gazette*, **31**, 326-338.
14. Martínez, M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. México: Fondo de Cultura Económica.
15. Martínez, M. (1994). *Las plantas medicinales de México*. México: Ed. Botas.
16. Noriega, J. M. (1902). *Historia de Drogas*. México: Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
17. Oliva, L. (1854). *Lecciones de Farmacología*. Guadalajara: Tipografía de Dionisio Rodríguez.
18. Ortiz, M. (2002). *Las tesis de farmacia del siglo XIX mexicano*. México: Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.

19. Pérez, R. M., Cervantes, H., Zavala, M. A., Sánchez, J., Pérez, S. y Pérez, C. (2000). Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytomedicine*, **7**, 25-29.
20. Pérez, R. M., Vargas, S. R., Martínez, M. y Córdova, R. I. (2004). Antioxidant and free radical scavenging activities of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. *Phytotherapy Research*, **18**, 428-430.
21. Pérez-Gutiérrez, R. M., Pérez-González, C., Zavala-Sánchez, M. A. y Pérez-Gutiérrez, S. (1998). Actividad hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud Pública de México*, **40**, 354-358.
22. Ramírez, J. y Alcocer, G. (1902). *Sinonimia vulgar y científica de las plantas mexicanas*. México: Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento.
23. Río de la Loza, L., Herrera, J. M., Laso de la Vega, L., Hidalgo-Carpio, A., Andrade, F., González, L. y Jiménez, M. (1874). *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México*. México: Imp. de Ignacio Escalante.
24. Rivero-Cruz, B., Rojas, M. A., Rodríguez-Sotres, R., Cerda-García-Rojas, C. M. y Mata, R. (2005). Smooth muscle relaxant action of benzyl benzoates and salicylic acid derivatives from *Brickellia veronicaefolia* on isolated guinea-pig ileum. *Planta Medica*, **71**, 320-325.
25. Roberts, M. F., Timmermann, B. N. y Mabry, T. J. (1980). 6-Methoxyflavonols from *Brickellia veronicaefolia* (Compositae). *Phytochemistry*, **19**, 127-129.
26. Roberts, M. F., Timmermann, B. N., Mabry, T. J., Brown, R. y Matlin, S. A. (1984). Brickellin, a novel flavone from *Brickellia veronicaefolia* and *B. chlorolepis*. *Phytochemistry*, **23**, 163-165.
27. Santamaría, F. (2000). *Diccionario de Mejianismos*. México: Ed. Porrúa.
28. Senties-Guraieb, A. (1894). *Plantas medicinales y sistemas tradicionales de curación del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.
29. Ugalde, A., Reina, A., Aguilar, J. M., Sánchez-Mejorada, M., Lisci, F., López, G., Herrera, C. y Bezanilla, T. (1967). *Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica Mexicana*. Unión Nacional de Farmacéuticos Científico-Cooperativa. México: Ed. Botas.
30. Villada, M. M. (1888). Apuntes acerca de plantas indígenas de la familia de las compuestas, empleadas en la medicina. *Gaceta Médica de México*, **23**, 147-164.
31. World Health Organization, WHO (1998). *Quality Control methods for medicinal plants materials*. Geneva.