



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la genotoxicidad de *Ligusticum porteri*  
en células somáticas de *Drosophila melanogaster*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

ROCIO JIMENA JIMÉNEZ VALDÉS



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. AMÉRICA NITXIN CASTAÑEDA SORTIBRÁN

MÉXICO, D.F. 2010.



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.

**Datos de la alumna:**

Jiménez

Valdés

Rocio Jimena

0457223394786

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

No. De Cuenta: 40609462-7

**Datos del asesor:**

Castañeda

Sortibrán

América Nitxin

**Datos de la tesis**

Evaluación de la genotoxicidad de *Ligusticum porteri* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*

86 p.

2010

## Hoja de Datos del Jurado

### Datos de la alumna:

Jiménez  
Valdés  
Rocio Jimena  
0457223394786  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
No. De Cuenta: 40609462-7

### Datos del tutor:

Doctora  
Castañeda  
Sortibrán  
América Nitxin

### Datos del sinodal 1

Doctora  
Rodríguez  
Arnaiz  
Rosario

### Datos del sinodal 2

Doctor  
Delgado  
Lamas  
Guillermo

### Datos del sinodal 3

Q. en A.  
Muñoz  
Ocotero  
Verónica

### Datos del sinodal 4

M. en C.  
Castañeda  
Partida  
Laura

### Datos de la tesis

Evaluación de la genotoxicidad de *Ligusticum porteri* en células somáticas de *Drosophila melanogaster*  
86 p.  
2010

## DEDICATORIAS

A mis padres:

Josefina Valdés Mejía

Y

Cesáreo Jiménez Garcés

Gracias por estar conmigo en todo momento. Su presencia ha sido indispensable en mi vida.  
Su lucha día a día me impulsa a seguir adelante. Los amo.

A mi hermana:

Nubia Nurit Jiménez Valdés

Gracias por estar siempre a mi lado. TQM

A mis amigos:

Para todos aquellos que han compartido conmigo su amistad y cariño. Cada uno de ustedes tiene un lugar especial en mis pensamientos. Gracias por haberme permitido entrar en sus vidas. Los quiero!!!

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a los miembros del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias por su apoyo durante la elaboración de mi tesis. En especial agradezco a la Dra. Rosario Rodríguez Arnaiz, jefa del laboratorio, por haber contribuido en mi formación académica. Así como a la Dra. América Nitxin Castañeda Sorbitrán por haberme tomado bajo su tutela, además de brindarme su amistad y cariño. También agradezco a la M. en C. Guadalupe Ordaz Téllez por su aprecio y apoyo.

Gracias a la Q. en A. Verónica Muñoz Ocotero, perteneciente al grupo de Fitoquímica en el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias, por haberme guiado en las pruebas fitoquímicas. Le agradezco su paciencia, ayuda y amistad.

Gracias a Sergio que se dio tiempo para realizar los dibujos que se presentan en el trabajo. Y también gracias a Ricardo por su ayuda constante.

Finalmente agradezco a mi familia que es el sustento de mis logros personales.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Antecedentes</b>	2
Toxicología	2
Toxicología genética	2
<i>Drosophila melanogaster</i>	8
<b>Ensayo de mutación y recombinación somáticas (SMART)</b>	10
<b>Plantas medicinales</b>	18
<b><i>Ligusticum porteri</i> Coulter &amp; Rose</b>	19
Clasificación taxonómica	19
Distribución geográfica	20
Conservación y protección legal	20
Descripción botánica	22
Reproducción	22
Usos más frecuentes	23
Fitoquímica	24
<b>Principales grupos de metabolitos secundarios reportados en</b>	
<b><i>Ligusticum porteri</i></b>	24
Fenoles	24
Terpenos	25
Alcaloides	26
Ftálidas	27

<b>Manejo de las plantas medicinales para análisis fitoquímicos</b>	29
<b>Justificación</b>	30
<b>Hipótesis</b>	30
<b>Objetivos</b>	30
General	30
Particulares	30
<b>Materiales y métodos</b>	31
Cruza	31
Prueba de toxicidad	32
Ensayo SMART	34
Análisis estadístico	34
Obtención de extractos	37
Cromatografía en placa fina	39
<b>Resultados</b>	42
Toxicidad	42
Genotoxicidad	43
Fitoquímica	50
Cromatografía en placa fina	51
<b>Discusión</b>	58
<b>Conclusiones</b>	64
<b>Bibliografía</b>	65
<b>Referencias electrónicas</b>	79



<b>Anexos</b>	80
Extracción	80
Cromatografía en placa fina	80
Popularidad de <i>Ligusticum porteri</i>	86

## RESUMEN

Una de las estrategias utilizadas para evaluar la genotoxicidad de un compuesto o de una mezcla compleja, es el ensayo SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, el cual se basa en la pérdida de la heterocigosis de marcadores recesivos (pelos múltiples: *mwh* y flama: *flr<sup>3</sup>*), que se expresan como manchas en las alas de las moscas adultas. En México, las plantas medicinales han sido empleadas por pueblos milenarios para aliviar diversas enfermedades. *Ligusticum porteri* es una planta medicinal que se ingiere en forma de infusiones de la raíz o se usa en forma de extractos alcohólicos como remedio de diversos males del tracto digestivo, respiratorio, circulatorio, además de la prevención de infecciones y diabetes. Los objetivos de este proyecto fueron realizar pruebas de toxicidad para la infusión y decocción de la raíz de *Ligusticum porteri*; determinando el índice de sobrevivencia y la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) para ambos extractos. Así como evaluar la genotoxicidad de ambos tratamientos mediante el ensayo SMART. También se realizaron cromatografías en placa fina para observar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en extractos de la raíz de *L. porteri*. Finalmente se buscó Z-ligustílida en la muestra de la raíz utilizada en este proyecto. Para las pruebas de toxicidad y genotoxicidad se probaron dos tipos de extractos mediante tratamientos crónicos a larvas de 72±3 horas. El primer extracto se obtuvo como una infusión de la planta y el segundo se obtuvo después de un cocimiento de la planta de 20 minutos/Litro. De cada extracto se probaron cinco concentraciones para determinar la LD<sub>50</sub>: 0.1%, 0.5%, 1%, 5% y 10%, corriéndose el testigo concurrente en cada uno de ellos. La dosis letal media obtenida tanto de la infusión como de la decocción fue del 5%. Considerando los resultados del índice de sobrevivencia para cada extracto, en la prueba de genotoxicidad se decidió probar las concentraciones del 0.5%, 1%, y 5% para la infusión y del 0.5%, 1%, 2% y 4% para la decocción; cada uno corriéndose con su grupo testigo. En el análisis estadístico ninguna de las concentraciones resultó ser genotóxica. Las cromatografías en placa fina revelaron la presencia de flavonoides, fenoles, alcaloides y mayoritariamente terpenos. La actividad tóxica de los tratamientos se atribuye esencialmente a los compuestos ftálicos en la raíz de la planta, principalmente Z-ligustílida, cuya presencia se comprobó mediante cromatografía en placa fina.

## **ANTECEDENTES**

### **Toxicología**

La toxicología es la disciplina científica encargada del estudio de los efectos nocivos de las sustancias químicas en los sistemas vivos (Timbrell, 1991).

La interacción de los compuestos químicos externos (xenobióticos) con un sistema biológico se establece de dos formas: una es la respuesta del organismo frente al compuesto y la segunda es el efecto del compuesto en el organismo. La primera incluye la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los xenobióticos; todos estos factores son de gran importancia en el proceso tóxico y poseen bases bioquímicas. El modo de acción de los compuestos tóxicos en la interacción con los componentes celulares y, a nivel molecular con las proteínas estructurales y otras macromoléculas, enzimas y receptores y los tipos de respuestas tóxicas producidas se encuentran incluidas en la segunda categoría de interacción (Timbrell, 1991).

### **Toxicología genética**

H. J. Muller (1927) descubrió que los rayos-X podían causar mutaciones en *Drosophila*, produciendo rearrreglos en el orden lineal de los genes, así como mutaciones letales recesivas. Este descubrimiento fue uno de los primeros pasos en la historia de la mutagénesis. En 1944 Charlotte Auerbach descubre la acción del gas mostaza en la mosca de la fruta, hecho que da inicio a las investigaciones sobre los efectos genéticos de los compuestos químicos ambientales. A raíz de ello y durante varias décadas hubo un gran avance en el conocimiento de nuevos agentes mutagénicos y métodos a través de los cuáles se han probado y postulado nuevas teorías en el campo de la toxicología genética (Brusick, 1987).

La toxicología genética fue reconocida como una disciplina en 1969 cuando la Sociedad de Mutágenos Ambientales fue fundada bajo el liderazgo del Dr. Alexander Hollaender y muchos otros genetistas consternados por el potencial impacto genético asociado con la proliferación de los compuestos químicos, fabricados por el hombre, en el ambiente (Brusick, 1987).

La toxicología genética como un campo especializado de la toxicología, identifica y analiza la acción de agentes capaces de interactuar con el material genético de los seres vivos. Algunos tóxicos dañan el complejo genético en concentraciones que también producen citotoxicidad no específica aguda y muerte. Aunque muchos agentes son capaces de producir daño genético indirectamente en concentraciones de exposición muy altas por medio de la alteración de la homeostasis celular, el principal objetivo de la toxicología genética es el de detectar y analizar el potencial peligro de estos agentes que son altamente específicos en sus interacciones con los ácidos nucleicos y que son capaces de producir daño genético en concentraciones subtóxicas. Dichos agentes son clasificados como genotóxicos (Brusick, 1987; Brusick *et al.*, 2008). El papel de la toxicología genética es entender la dinámica e importancia de los procesos de daño y reparación del DNA en el contexto de anticipar la exposición humana a los genotóxicos, así como la cinética involucrada en la transformación de lesiones del DNA en mutaciones estables heredables (Brusick, 1987).

El término genotóxico es utilizado para distinguir a los compuestos químicos que tienen una afinidad intrínseca al DNA de aquellos que no la tienen. Las sustancias genotóxicas tienen muchas propiedades físicas o químicas en común, que facilitan su interacción con los ácidos nucleicos (Brusick *et al.*, 2008). De hecho, la universalidad de la molécula blanco es la clave de la toxicología genética (Brusick, 1987). Las sustancias genotóxicas se caracterizan por su habilidad para inducir clases específicas de cambios estables en (1) la secuencia de nucleótidos de los genes, (2) la estructura cromosómica, o (3) el número cromosómico. Los cambios en la secuencia de nucleótidos son descritas como mutaciones; el daño cromosómico es referido como clastogenicidad y, los cambios en el número cromosómico son llamados aneuploidias. Estas grandes clases de daño genético son responsables de una gran proporción de las enfermedades genéticas humanas y contribuyen significativamente a la producción de malformaciones congénitas (Brusick *et al.*, 2008).

Una vez que los agentes mutagénicos son identificados, se puede determinar el nivel de riesgo que representaría para los seres humanos la exposición e idear

medios para manejar el riesgo mediante la eliminación de los agentes del ambiente o reduciendo la exposición a ellos (Brusick, 1987).

Las exposiciones de los compuestos para estudios de toxicología genética van de las agudas a las crónicas; cayendo dentro de tres subdivisiones temporales: agudas, subcrónicas y crónicas (Clayson *et al.*, 1990; Brusick, 1987). En la tabla 1 se mencionan los efectos de cada una de estas subdivisiones.

**Tabla 1.** Efectos tóxicos o signos observados en las subdivisiones temporales de la toxicología animal (Brusick, 1987):

Exposición Aguda	Exposición Subcrónica <sup>a</sup>	Exposición Crónica <sup>b</sup>
Letalidad	Cambios en la capacidad reproductiva	Degeneración del tejido no-reversible
Irritación	Efectos teratogénicos	Carcinogénesis
Necrosis	Degeneración reversible de tejido	Cambios en la esperanza de vida
Cambios en los parámetros homeostáticos normales	Deficiencias en la dieta	
Efectos neurológicos	Cambios conductuales	

<sup>a</sup> Los efectos subcrónicos también pueden incluir los efectos listados en la exposición aguda.

<sup>b</sup> Los efectos crónicos también pueden incluir los efectos listados en las exposiciones aguda y subcrónica.

En las pruebas de exposición aguda se lleva a cabo una sola exposición a concentraciones muy elevadas, la cual es muy importante como una primera aproximación para la toxicidad. El requerimiento básico para la única dosis de toxicidad aguda es obtener la dosis letal aproximada, los síntomas clínicos y si es posible, observar los sistemas u órganos afectados y el tipo de efecto inducido (Clayson *et al.*, 1990).

Los estudios de toxicidad subcrónica se realizan en animales de laboratorios que se encuentran en fase de crecimiento y que al final del experimento alcanzan su

madurez. De esta forma se espera que la prueba posea un alto grado de sensibilidad. Estos ensayos en general se pueden considerar como una buena fuente de información acerca de la toxicidad de los compuestos y pueden llegar a ser una base efectiva para una evaluación segura, especialmente cuando se dispone de información adicional sobre su biotransformación y cinética (Clayson *et al.*, 1990).

Las pruebas de toxicidad crónica se realizan en compuestos que debido a su uso, puede considerarse que existe una exposición continua o una exposición por periodos relativamente largos de tiempo (Clayson *et al.*, 1990). La medición de la toxicidad crónica en comparación con la de la toxicidad aguda, puede revelar la acumulación del compuesto *in vivo*, y por lo tanto puede darnos una aproximación de la vida media del compuesto en el organismo entero (Timbrell, 1991).

En 1992 el Programa Ambiental de las Naciones Unidas revisó el estatus y métodos disponibles para la evaluación del riesgo genético (UNEP-ICPEMC, 1992). Un esquema de clasificación más reciente fue propuesto por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos. El sistema está constituido por un esquema de pruebas de cuatro niveles, que comienza con métodos *in vitro* y progresa a través de ensayos somáticos *in vivo* en el nivel 2 y en ensayos en células germinales en los niveles 3 y 4 (tabla 2). Basados en los resultados, los compuestos químicos se encontrarán en una de las clases mostradas en la tabla 3 (Dearfield *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Requerimientos de ensayos generalizados para los compuestos químicos ambientales.

Nivel	Tipos de ensayos	Función de la evaluación
1	<p>Mutación reversa en bacterias (Ames).</p> <p>Mutación genética <i>in vitro</i> en células de mamíferos (ej., linfoma en ratón)</p> <p>Cromosoma <i>in vitro</i> o micronúcleos.</p>	<p>Investigación amplia y rápida para la actividad genotóxica. Para compuestos químicos con baja exposición humana, las pruebas pueden ser reducidas a los ensayos cromosómicos <i>in vitro</i> y al ensayo Ames. Los resultados negativos uniformes en estas pruebas serán suficientes para muchos compuestos químicos.</p>
2	<p>Uno o más ensayos <i>in vivo</i> en células somáticas (ej., micronúcleos en médula ósea, ensayo cometa, unión al DNA, ratones transgénicos, ensayo de la síntesis de DNA no programada (UDS)).</p>	<p>Los resultados de los niveles 1 y 2 constituyen la identificación de riesgo; los resultados de los ensayos del nivel 2 serán adicionales a aquellos del nivel 1 para compuestos químicos con alto potencial de exposición humana. Los resultados negativos en los niveles 1 y 2 serán pruebas suficientes para los compuestos químicos con un potencial de alta exposición. Se requiere el nivel 2 de prueba para clarificar los resultados positivos de un ensayo de nivel 1.</p>
3	<p>Ensayos <i>in vivo</i> en células gonadales (ej., letal dominante, micronúcleos, unión al DNA, UDS).</p>	<p>Este nivel se usa para evaluar la habilidad de acceso de los compuestos químicos a las células germinales; no es una medida directa del daño hereditario, pero incrementa el nivel de preocupación por el riesgo humano.</p>
4	<p>Ensayos <i>in vivo</i> que proveen datos de riesgo cuantitativo</p>	<p>Este nivel mide el daño de mutaciones hereditarias y, estos ensayos pueden ser usados para estimar el riesgo</p>

para células gonadales (ej., ensayos de locus específico, visible o bioquímico; ensayos de translocación hereditaria en ratones).	para la inducción de nuevas mutaciones en el pool genético humano.
---	--

**Tabla 3.** Categorías de Clasificación propuestas a partir de los resultados de los Ensayos Genéticos.

Clasificación	Células Somáticas	Células Germinales
Posible mutágeno humano	Respuesta positiva en uno de los ensayos de nivel 1 o 2.	Resultados positivos de uno o más ensayos del nivel 1 o 2 con evidencia de interacción con células germinales de un ensayo de nivel 3.
Probable mutágeno humano	Resultados positivos <i>in vivo</i> con apoyo de resultados positivos en ensayos del nivel 1.	Evidencia suficiente de interacción germinal apoyada por resultados positivos válidos en eventos hereditarios (nivel 4) en células germinales animales.
Mutágeno humano	Descubrimientos positivos en células somáticas humanas después de una exposición <i>in vivo</i> .	Descubrimientos positivos en células germinales humanas después de una exposición <i>in vivo</i> .
No mutagénico	Resultados negativos uniformes en suficientes ensayos de los niveles 1 y 2.	
Evidencia equívoca	Resultados de ensayos aceptables del nivel 1 y, si se requiere del nivel 2, que no pueden ser citados negativos o positivos convincentemente.	

La toxicología genética ha jugado un papel dual en los programas de evaluación de seguridad. Una de sus funciones es la implementación de pruebas y métodos de evaluación de riesgo para definir el impacto de agentes genotóxicos



encontrados en el ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad de la poza genética de los seres humanos. Su segunda función es la aplicación de metodologías genéticas a la detección y comprensión mecanística de los compuestos químicos carcinogénicos. A este respecto, la toxicología genética ha sido aplicada como una línea de investigación para carcinógenos potenciales. La toxicología genética ha continuado creciendo como un área específica de la toxicología, con gran influencia en la evaluación de la seguridad de los productos químicos (Brusick, 1987).

### ***Drosophila melanogaster***

Los modelos animales son usados generalmente como sustitutos humanos en evaluaciones toxicológicas. Los modelos animales son bioensayos que involucran el uso de especies que se piensa que exhiben una respuesta a los agentes tóxicos similar a la de los seres humanos en condiciones similares (Brusick, 1987).

Uno de los organismos usados como modelo biológico para experimentos genéticos es la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, pues cumple con diversas ventajas, como el ser un organismo eucariote que presenta dimorfismo sexual, un ciclo biológico corto, fácil mantención y, en espacios reducidos tiene un gran número de descendientes por generación. Tiene cuatro cromosomas bien mapeados y más de quince mil mutantes diferentes con marcadores genéticos adecuados que permiten detectar *in vivo* diversos tipos de mutaciones génicas y cromosómicas en células germinales, así como mutaciones y recombinación mitótica en células somáticas. Además presenta un versátil metabolismo de xenobióticos (Hällström, 1987) siendo capaz de activar enzimáticamente promutágenos y procarcinógenos (Graf *et al.*, 1995) Por lo anterior, se pueden obtener respuestas a todo tipo de cambios genéticos inducidos desde mutaciones letales dominantes, mutaciones letales recesivas ligadas al sexo, translocaciones, no-disyunción, pérdida total o parcial (clastogenia) de cromosomas y recombinación somática (Rodríguez-Arnaiz y Ramos- Morales, 1992).

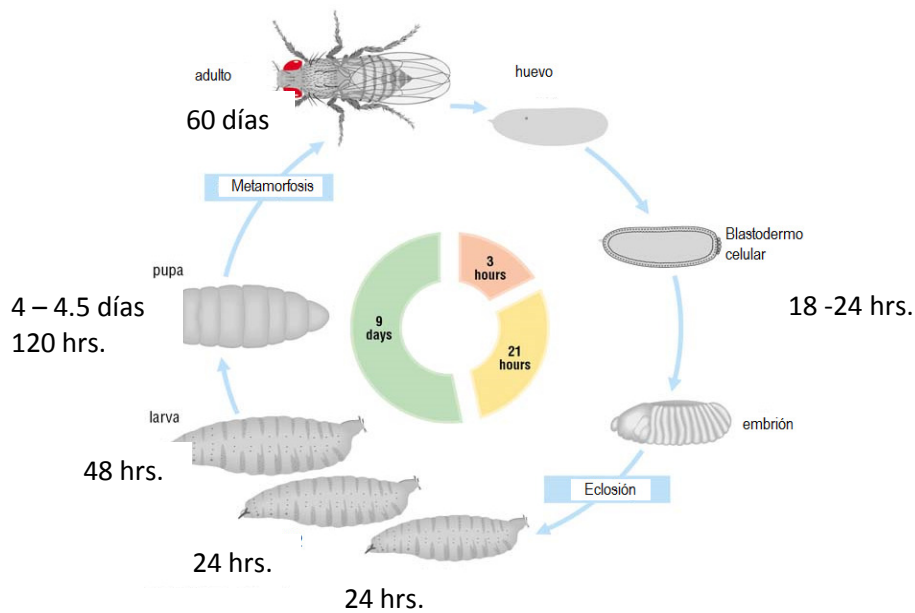
La secuenciación del genoma de *Drosophila* llevada a cabo por el “Proyecto del Genoma de *Drosophila*”, ha revelado que la mitad de las secuencias de proteínas identificadas muestran similitud con proteínas de mamíferos. Es más, la mosca presenta una ortología de 61% con los genes de enfermedades humanas y 68% con los genes que controlan los diferentes tipos de cáncer (Adams *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000). *Drosophila* puede realizar *in vivo* la mayoría de las funciones enzimáticas que se efectúan en los microsomas del hígado humano, lugar donde se activan gran cantidad de los carcinógenos y de los mutágenos indirectos. El retículo endoplásmico aislable como fracción microsómica es considerado el responsable del metabolismo de drogas y pesticidas en insectos; las enzimas involucradas tienen acción de oxidasas y se caracterizan por carecer de especificidad al sustrato, tal como ocurre con el hígado de mamíferos (Baars *et al.*, 1980). Mollet y Würigler (1974) fueron los primeros en sugerir el uso de células somáticas de *Drosophila* para pruebas de mutagénesis.

Este insecto holometábolo presenta un ciclo de huevo a adulto de 10 días en medio nutritivo a 25°C (figura 1). Los huevos fertilizados usualmente son puestos inmediatamente después del apareamiento. Si la oviposición es prevenida debido a la falta de lugar apropiado o debido a bajas temperaturas, entonces los embriones deben comenzar su desarrollo en el útero de la hembra. Las larvas generalmente salen del huevo de 18 a 24 horas después de que son puestos e inmediatamente comienzan a alimentarse. La larva presenta tres etapas de alrededor de 4 días. La primera etapa: L1, dura aproximadamente 24 horas, se alimentan en la superficie del medio y solo comienzan a cavar hasta la segunda etapa larvaria o L2, la cual también tiene una duración de 24 horas; durante esta etapa y la mayor parte de la siguiente, la larva se encuentra dentro del medio, sólo dejando expuestos sus espiráculos posteriores. La tercera etapa o L3 es de 48 horas (Ashburner, 1989; Prasad y Joshi, 2003).

El medio presenta un cambio considerable en el pH y en la microflora conforme la larva crece. La alimentación normalmente continúa hasta las 110 horas posteriores a la oviposición, aunque el periodo crítico para la pupación en ausencia de más alimento es de alrededor de 70 h. Después de dejar de comer, la

larva entra a una etapa de paseo, en busca de un lugar adecuado para el sitio de pupación. Ésta ocurre 120 horas después de la oviposición. El periodo de pupación a la emergencia es de aproximadamente 4-4.5 días. Las moscas adultas emergen con las alas sin expandir, con cuerpos alargados, delgados y despigmentados. La expansión de las alas ocurre durante la primera hora después de la emergencia y la pigmentación completa ocurre de 2 a 3 horas después de ésta. Machos y hembras pueden comenzar a aparearse de 8 a 10 horas después de salir del pupario, aunque el tiempo promedio para el primer apareamiento se da usualmente entre las 12 y 20 horas post-emergencia. Las hembras pueden empezar a poner huevos después de las 24 a 48 horas posteriores a la emergencia (Ashburner, 1989; Prasad y Joshi, 2003).

Una hembra puede poner 3000 huevos durante su vida, aunque el un número más frecuente es de 700 a 1000 huevos. Un macho durante su vida puede dejar una progenie de 10 000 a 14 000 moscas. Una mosca adulta vive alrededor de 60 días en condiciones adecuadas (Ashburner, 1989; Prasad y Joshi, 2003).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

## ENSAYO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICAS (SMART)

La recombinación genética es un fenómeno universal de importancia para todos los sistemas biológicos. Los procesos de recombinación contribuyen a la variabilidad genética, por lo cual tiene implicaciones evolutivas. En 1936 Curt Stern demostró que en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, la recombinación genética ocurre no sólo en células meióticas, sino que también ocurre en células somáticas durante la división celular mitótica. Más recientemente se ha demostrado que los fenómenos de recombinación son importantes para otras funciones celulares, como la reparación del DNA y la variación en las inmunoglobulinas de los mamíferos (Spanó *et al.*, 2001).

En la toxicología genética se ha dado mayor énfasis en la investigación de alteraciones genéticas clásicas como mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas y aneuploidias. Muchos agentes que causan daño al DNA también tienen actividad recombinogénica, por lo que dicha actividad ha sido considerada como una medida indirecta del daño general al DNA. También ha sido reconocido

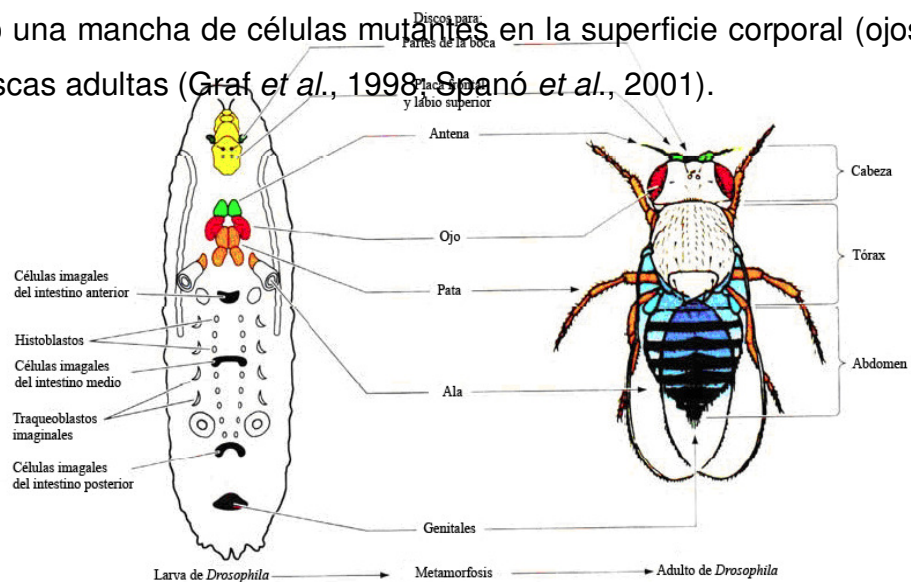
que la recombinación puede ser responsable de la pérdida de heterocigosis tanto en células de la línea germinal como en células somáticas. La pérdida de heterocigosis puede promover la manifestación de enfermedades hereditarias recesivas o puede estar involucrada en la progresión de neoplasias. Este mecanismo se ha observado en el caso de varios oncogenes y genes supresores de tumores. Dada la importancia de la actividad recombinogénica, se han desarrollado sistemas experimentales capaces de cuantificar la recombinación mitótica. Una de estas pruebas es la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART, por sus siglas en inglés) en *Drosophila melanogaster* (Spanó *et al.*, 2001). La prueba consiste en la exposición a un mutágeno, poblaciones de células que están destinadas a multiplicarse en configuraciones relativamente arregladas de manera que una mutación inducida en una de las células expuestas dará lugar a un clon detectable (Graf *et al.*, 1984).

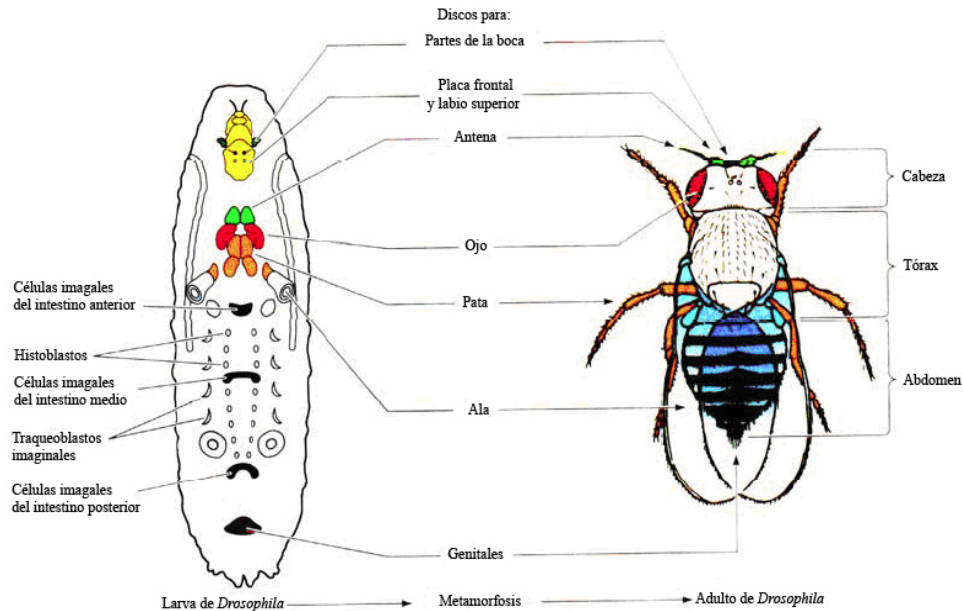
La prueba en *Drosophila melanogaster* presenta ventajas indiscutibles: es una prueba rápida en comparación con pruebas en procariontes o sistemas *in vitro* unicelulares, agregando el hecho de que posee un valor predictivo por ser una prueba *in vivo* en organismos eucariontes (Spanó *et al.*, 2001). En *Drosophila* alrededor del 85% de los carcinógenos probados son mutagénicos en las células germinales. Las larvas poseen actividades metabólicas que les permiten activar una gran variedad de xenobióticos (Graf *et al.*, 1984).

Comparando las sensibilidades de diferentes ensayos somáticos en *Drosophila*, es claro que el sistema SMART es el más potente con respecto al espectro de agentes genotóxicos que es capaz de detectar, pues se ha validado con un gran número de agentes químicos, productos naturales y mezclas complejas (más de 400); además, es sensible a un amplia variedad tanto de mutágenos de acción directa como de aquellos que requieren de bioactivación. Está bien documentado que hay una relación entre la actividad recombinogénica de los compuestos químicos y su carcinogenicidad (Cairns, 1981; Magnusson y Ramel, 1990; Frei *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 1992; Marec y Gelbic, 1994; Guzmán-Rincón y Graf, 1995;

Frei y Würgler, 1996; Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1996; Spanó *et al.*, 2001; Vogel *et al.* 1999).

La prueba SMART ha sido ampliamente usada en dos versiones, una basada en el marcador del color de ojos y la otra basada en dos marcadores celulares de las alas. En ambos casos, la pérdida de la heterocigosis induce la expresión de los genes marcadores recesivos en las células de los discos imaginales larvarios. Los discos imaginales (figura 2), son tejidos que crecen continuamente por división mitótica durante el periodo completo del desarrollo larvario. Los discos imaginales del ala consisten aproximadamente de 50 a 100 células cuando la larva de primer estadio sale del huevo y, cuando alcanza la etapa de pupa y la diferenciación del ala comienza, la continua proliferación celular durante el desarrollo de la larva conduce a un incremento en el número de células presentes en un disco imaginal: alrededor de 30 000 células por ala. La continua proliferación celular durante el desarrollo de la larva conduce a un incremento en el número de células blanco presentes en un disco imaginal (Graf, 1995). Si ocurre una alteración genética en una de las células de los discos imaginales, esta alteración se presentará en todas las células descendientes y formará un clon de células mutantes. Si la alteración causa un cambio visible en el fenotipo, el clon celular mutante puede ser detectado como una mancha de células mutantes en la superficie corporal (ojos o alas) de las moscas adultas (Graf *et al.*, 1998; Spanó *et al.*, 2001).





**Figura 2.** Morfología, localización y estructuras del adulto a las que darán lugar los discos imaginales de *Drosophila* (Gilbert, 2003).

Para asegurar que el clon sea identificable en la superficie de la mosca adulta, para la prueba SMART en alas, se escogen marcadores expresados de manera autónoma en las células de este tejido (Graf *et al.*, 1984). En este ensayo, las células expuestas de los discos imaginales larvarios del ala son transheterocigotas para dos marcadores recesivos localizados en el brazo izquierdo del cromosoma 3, los cuales son: pelos múltiples del ala (*mwh*), localizado en la posición 3-0.3 y flama (*flr*) en la posición 3-38.8, mientras que el centrómero está localizado en la posición 47.7 (Lindsley y Zimm, 1992).

El sistema de prueba que usa el tejido de alas posee la ventaja de que se pueden realizar preparaciones permanentes, por lo cual siempre es posible realizar verificaciones y reconsideraciones con base al material original. Una segunda ventaja comparada con el sistema de prueba en los ojos, es la posibilidad de almacenar las moscas tratadas en etanol al 70% para el montaje de las alas tiempo después. Una tercera ventaja es que en cada disco imaginal expuesto, literalmente miles de células blanco (24 400) se encuentran en riesgo potencial (Graf *et al.*, 1984).

Clasificación de las manchas:

Debido a que las últimas 1-2 rondas de división celular ocurren en el estadio de pupa, cuando la alimentación ha finalizado, es útil distinguir las manchas inducidas en la pupa (manchas pequeñas) de las inducidas durante la alimentación larvaria (manchas grandes). No es posible hacer una delimitación exacta; sin embargo, se ha determinado que las manchas pequeñas consisten en una o dos células afectadas, y por consiguiente las manchas grandes consisten de 3 células afectadas en adelante (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würzler, 1988). Esta clasificación también es útil, ya que en los controles negativos (sin tratamiento) predominan las manchas pequeñas *mwh*. Esta diferenciación hace posible probar las frecuencias de las manchas sencillas grandes de las moscas tratadas en comparación con los bajos valores del control. De esta forma se optimiza el poder del análisis estadístico. Se pueden encontrar manchas sencillas *mwh* o manchas gemelas *mwh/flr* (Graf *et al.*, 1984).

Manchas *mwh*: se clasifican como *mwh* todos los casos en los que una célula del ala presenta tres o más tricomas en lugar de un solo tricoma por célula como en el tipo silvestre.

Manchas *flr*: El alelo *flr* usado en estos experimentos no se expresa completamente en clones más pequeños de cuatro células por clon. En manchas más grandes, *flr* exhibe una expresión bastante variable: desde tricomas engrosados, cortos y vistos como puntos, hasta extrusiones en forma de globo de material quitinoso melanótico (Graf *et al.*, 1984).

Las manchas gemelas presentan células con tricomas *flr* y otras con tricomas *mwh*. Este tipo de manchas se presentan rara vez en los controles negativos, por lo que no representan un problema en el análisis estadístico (Graf *et al.*, 1984).

Existen varios mecanismos que generan clones marcados genéticamente. Una posibilidad importante es un evento de recombinación mitótica entre dos cromátidas no hermanas. Se esperan manchas gemelas si la recombinación



ocurre entre *flr* y el centrómero y si a continuación se presenta una segregación X, de tal forma que cada célula hija reciba un cromosoma recombinado y uno no-recombinado. Un evento de recombinación entre *mwh* y *flr* puede dar como resultado una mancha sencilla *mwh*. Si ambos tipos de eventos de recombinación (uno entre *flr* y el centrómero y uno entre *mwh* y *flr*) ocurren en la misma célula, puede producirse una mancha sencilla *flr* (Graf *et al.*, 1984).

La selección en contra de las células del clon *flr* en una mancha gemela en crecimiento y la persistencia del clon *mwh* genera una mancha sencilla. Lo mismo puede resultar a partir del daño letal de uno de los linajes celulares en una mancha originalmente gemela. También puede aparecer una mancha sencilla *mwh* si en una pequeña mancha gemela, *flr* no se expresa fenotípicamente (Graf *et al.*, 1984).

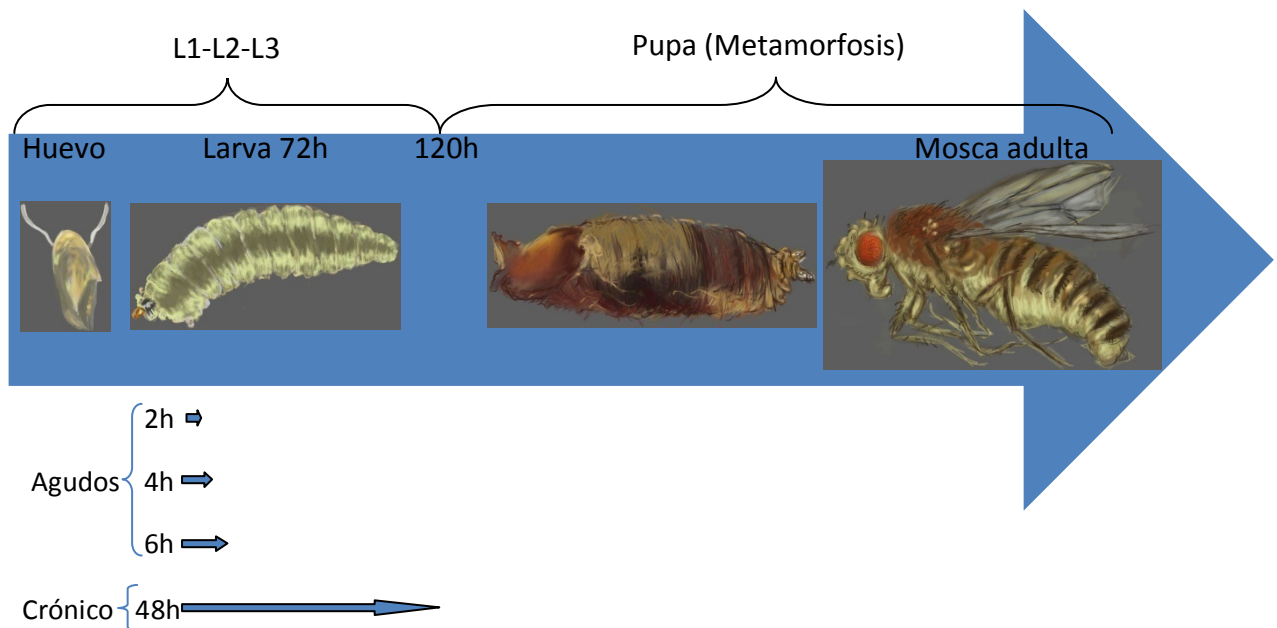
La aparición de una mancha sencilla puede, teóricamente, tener otras causas genéticas como: una mutación genética o conversión genética en el alelo silvestre, así como la delección (pequeña o grande) de un segmento cromosómico en el que se encuentre el alelo silvestre. Las fenocopias pueden imitar manchas genéticamente determinadas. La no-disyunción u otra pérdida del cromosoma representan otros mecanismos por los cuales pueden inducirse manchas sencillas (Graf *et al.*, 1984). En la figura 3 se observan los clones resultantes de los eventos genéticos que conducen a la pérdida de la heterocigosis y por tanto la expresión de los genes marcadores recesivos.

El tamaño de una mancha refleja el número de divisiones celulares que ocurrieron después de la inducción del cambio genético en el linaje celular. Siempre que todas las células en un clon se dividan en la misma tasa, el tamaño de la mancha podrá reflejar directamente el número de divisiones ( $n$ ) con un tamaño desde  $2^0$  a  $2^n$  células. Aunque esta relación usualmente no se conserva, el agrupamiento de los clones de acuerdo al número mínimo inferido de divisiones celulares brinda una información útil. Se clasifican las manchas de acuerdo a las siguientes clases: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32,... células, y se enumeran las clases en orden ascendente comenzando con 1 (Graf *et al.*, 1984).

Es claro que existe una correlación entre el tiempo de inducción y frecuencia, con el tamaño de las manchas sencillas. En las larvas juveniles sólo se inducen pocas manchas pero muy grandes, mientras que en larvas de mayor tiempo, las frecuencias incrementan considerablemente pero son más pequeñas. Las manchas gemelas muestran una relación diferente; éstas prácticamente no se encuentran en larvas muy jóvenes o muy viejas. Estos resultados han demostrado que en el ensayo de manchas en alas, la edad óptima de la larva para un tratamiento mutagénico es de 72 horas (Graf, 1995).

Existen dos posibilidades para el tratamiento de las larvas de 72hr (figura 4). El tratamiento de exposición aguda que puede ser de 2, 4 o 6 horas y el de exposición crónica de 48 horas (Graf *et al.*, 1984).

El periodo de tratamiento crónico cubre aproximadamente las últimas 5-6 rondas de división celular en el primordio del ala, las cuales suman más del 95% de todas las divisiones celulares mitóticas en el desarrollo del ala (Frei y Würgler, 1988).



**Figura 4.** Tiempo de exposición en los tratamientos agudos y crónicos. Modificado de Graf *et al.*, 1984. Dibujos por: Sergio Vargas Rodríguez.

Teóricamente se esperan diferentes espectros del tamaño de las manchas después de un tratamiento de alimentación crónica respecto al de alimentación aguda. Un tratamiento continuo o crónico durante 48hr da como resultado una distribución en la cual predominan las manchas pequeñas y las manchas grandes están representadas por frecuencias que decrecen de forma continua. La explicación de ello es que los discos imaginales se encuentran en crecimiento en el momento de la exposición, por lo cual aumenta el número de células expuestas incrementando el número de manchas iniciadas en un disco; sin embargo, el número de divisiones celulares después del evento de iniciación de las manchas comienza a decrecer conforme avanza el desarrollo. Esto consecuentemente conduce a manchas gradualmente más pequeñas. Para las manchas gemelas, los procedimientos de exposición crónica y aguda presentan diferencias principalmente cuantitativas, el tratamiento crónico genera mayores frecuencias de manchas (Graf *et al.*, 1984).

El espectro de compuestos cuya genotoxicidad puede ser detectada por este ensayo va desde fuertes agentes alquilantes de acción directa hasta promutágenos activados por diferentes vías de biotransformación enzimática. La versatilidad del ensayo hace posible probar compuestos tanto estables como inestables. También es posible probar no sólo compuestos químicos disueltos, sino también compuestos químicos gaseosos (Graf *et al.*, 1984).

## **PLANTAS MEDICINALES**

El uso de plantas medicinales es una tradición en diversos pueblos milenarios. En México se emplean para aliviar múltiples enfermedades. México es el segundo país del mundo en tipos de ecosistemas y el cuarto en riqueza de especies aunque sus 1 972 544km<sup>2</sup> colocan al país en el lugar 12 en cuanto a extensión del territorio ([www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)).

Para ejemplificar, existen en México unas 500 especies de importancia pesquera, casi 600 especies que se utilizan para la reforestación, unas 4,000 especies con propiedades medicinales registradas, cientos de especies exóticas, invasoras y decenas de miles con potencial biotecnológico. Casi 2,500 especies se encuentran protegidas por nuestra legislación y cientos de ellas se utilizan en artesanía o con fines cinegéticos u ornamentales ([www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)).

Además de la diversidad biológica, la diversidad cultural de México es alta, colocándolo en el tercer lugar en el Hemisferio Oeste después de Brasil y Colombia. México es reconocido como un punto geográfico importante para la interacción planta-ser humano. La riqueza de las plantas medicinales mexicanas puede ser estimada por el número de especies utilizadas (Bye *et al.*, 1995).

Una medida de la importancia de las plantas medicinales es su utilización directa por las personas. El consenso del uso repetitivo de los remedios por un grupo de personas, ha sido considerado una medida importante de consistencia en el estudio de las dinámicas culturales y en la búsqueda de plantas medicinales eficaces y biológicamente activas. La efectividad terapéutica también es una medida de importancia. Los bioensayos de igual forma proporcionan un indicador de la probable efectividad de las plantas medicinales y son útiles en el fraccionamiento de los extractos para la búsqueda de los principios activos (Linares y Bye, 1986).

El estudio de plantas medicinales selectas a través del país, revela la existencia de complejos de plantas medicinales, en los cuáles plantas taxonómicamente distintas comparten un nombre, uso tradicional y, ciertas propiedades químicas y morfológicas. Tal es el caso del “chuchupate”, un complejo medicinal representado por *Ligusticum porteri* en la familia Apiaceae y *Myroxylon balsamum* en la familia Fabaceae (Linares y Bye, 1986).

### ***Ligusticum porteri* COULTER & ROSE**

#### **Clasificación taxonómica**



Reino: Plantae  
Subreino: Tracheobionta  
Superdivisión: Spermatophyta  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Rosidae  
Orden: Apiales  
Familia: Apiace/Umbelliferae  
Subfamilia: Apioideae  
Tribu: Apieae  
Género: *Ligusticum* L.  
Especie: *Ligusticum porteri* Coulter & Rose  
(Figura 5) (Cronquist *et al.*, 1997)



**Figura 5.** *Ligusticum porteri* Coulter & Rose en Chihuahua, México (Goldhaber, 2008)

*Ligusticum porteri* tiene diversos nombres coloquiales como:

“Chuchupate”, “chuchupaste” (y variantes) (Sp.): Chihuahua, Distrito Federal; “ha-chi-de”, ha-chi-di” (Mescalero Apache): Nuevo México; “kwimi dechi” (Zuni): Nuevo México; “osha” (Sp.): Colorado, Nuevo México; “pah-net-snap” (Paiute): Utah; “raíz angélica” (Sp.): Texas; “raíz de cochino “ (Sp.): Durango; “wadda-e-gopa” (Paiute): Nevada; “wasia” (tarahumara): Chihuahua; “yerba de cochino” (Sp.): Chihuahua, Durango (Linares y Bye, 1986) .

### **Distribución geográfica**

Esta hierba perenne crece en el norte de México en los estados de Chihuahua, Durango y Sonora en el norte de la Sierra Madre Occidental y en el suroeste de Estados Unidos en los estados de Colorado, Wyoming, Idaho, Utah, Nuevo México, Nevada y Arizona en el sur y centro de las Montañas Rocallosas (figura 6). *L. porteri* a menudo crece en suelos ricos y húmedos en hábitats arbolados,

desde bosques de pino-encino hasta bosques de abetos; sin embargo, también se encuentra en laderas y en prados con suelos secos y rocosos de 1,500 a 3,505 metros (Linares y Bye, 1986; Cronquist et al., 1997; Welsh, 1993; Martin *et al.* 1998).



**Figura 6.** Distribución geográfica de *Ligusticum porteri*. Los puntos amarillos marcan la presencia de la especie en esa zona. Tomado de: <http://pick4.pick.uga.edu/mp/20m?r=.125&la=34.5&lo=-99&kind=Ligusticum+porteri>

### **Conservación y protección legal**

Ha habido gran preocupación por parte de algunos expertos debido a que *Ligusticum porteri* ha sido sobrecolectada (Robbins, 1999), principalmente en México, pues en el país el mercado de plantas medicinales no está regulado (Felger *et al.*, 1997; Felger y Wilson, 1995; Martin *et al.*, 1998; Stoleson *et al.*, 2005). Cuando se cosechan las raíces se extrae la planta entera. *L. porteri* es considerada de crecimiento lento y algunas estimaciones consideran que cuando las plantas son cosechadas éstas tienen más de diez años. La colección destructiva de la planta en poblaciones de lento crecimiento podría conducir a la explotación no sostenible (Wilson, 2007).

Durante 1999, por la alta demanda y lo que era considerado sobrecolecta en el suroeste de los Estados Unidos, las Regiones 1 y 4 del Servicio Forestal de los Estados Unidos emitió una moratoria de tres años en el uso/recolección personal y comercial de *Ligusticum*. La planta fue registrada como “rara” en la Lista Roja de Plantas Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza en 1997 (Walter y Gillet, 1998); sin embargo no ha sido referida subsecuentemente (Wilson, 2007). La especie no está formalmente protegida bajo leyes de especies en peligro o plantas nativas. Los Protectores de las Plantas Unidos (UpS, por sus siglas en inglés), son una organización de conservación que enfoca sus esfuerzos en poblaciones de plantas medicinales recolectadas del medio silvestre, e incluye a la especie en una lista de especies en “riesgo” (UpS, 2007). La planta fue propuesta en consideración por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, por sus siglas en inglés) en el 2000 (Anónimo, 2000), basado en gran medida en un informe elaborado por la Universidad del Programa Maryland en Desarrollo Sustentable y Biología de la Conservación (1999). Sin embargo, *L. porteri* no figura actualmente en los Apéndices de la CITES I, II o III.

Aunque algunas poblaciones de la planta son consideradas amplias y seguras, hay poca información disponible para otras poblaciones. Si son necesarias las acciones de conservación, éstas se ven obstaculizadas por la falta de datos. No hay programas de gestión integral para encargarse de las poblaciones de *L. porteri*. Ninguno de los estados del oeste de los Estados Unidos con poblaciones de *L. porteri* prohíbe la recolecta de plantas en las tierras del Estado. El pastoreo, el desarrollo comercial y residencial, actividades recreativas, los vehículos todo terreno, la tala y la recolección para uso medicinal han sido citados como factores en la disminución de las poblaciones de *L. porteri* (Universidad del Programa Maryland en Desarrollo Sostenible y Biología de la Conservación, 1999).



## **Descripción botánica**

Hierba monoica, perenne. Tallo firme, caulescente, ramificado libremente, de 5 a 10dm de altura, glabro a través de la inflorescencia puberulenta. Raíz axonomórfica, perenne, con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronada sobre la raíz principal.

Hojas ovaladas en el contorno general, excluyendo los peciolas 15-28cm de largo, 12-20cm de ancho, 1-3 ternadas-pinnadas, foliolos ovados, mayormente distintos, sésiles a peciolados, 2.5-5cm de largo, 1-3cm de ancho, regularmente incididos, los lóbulos obtusos o agudos, completamente o dentados; peciolas 1-3dm de largo; hojas caulinas como las basales, con divisiones poco lobadas; pedúnculos firmes, alternados y algunas veces verticilados, 6-30cm de largo, ligeramente hinchados en el ápice; involucre ausente u ocasionalmente solitario en una bráctea decidua; involucelo ausente o en varias bracteetas lineales, 2-7mm de largo, igualmente o más cortos que las flores y frutos. Inflouescencia de umbelos compuestos, los rayos del umbelo principal generalmente 10 o 13-25, 11-24 rayos, ascendentes, desiguales, 2.5-6cm de largo; pedicelos ascendentes separados preferentemente estrictos, 5-12mm de largo (Goldhaber, 2008).. Flores blancas que aparecen al final del verano y, tienen aproximadamente de 2-5mm de diámetro con cinco pétalos (Wilson, 2007). Estambres 5. Ovarios 2. Frutos esquizocárpicos oblongos rojizos de 5-8mm de largo, 2-4mm de ancho, teretes, las costillas estrechamente aladas; 4-6 tubos aceitosos en los intervalos, 8-10 en la comisura. Semillas aplanadas dorsalmente en la sección transversal, acanaladas bajo los tubos. n=11 (Goldhaber, 2008).

## **Reproducción**

Al igual que muchas plantas de la familia Apiaceae, las flores atraen a una gran variedad de insectos como moscas, escarabajos, abejas y avispa. Sin embargo, estudios de biología de la polinización entre plantas de ésta familia han encontrado que hay una distinción entre los visitantes y los polinizadores efectivos, siendo éstos últimos abejas andrenidas, coletidas y halictidas en

algunos casos (Lindsey, 1984). Las abejas halictidas han sido vistas visitando flores de osha en las montañas Chiricahua de Arizona (Wilson y Felger, observación Sep. 2, 2003).

### **Usos Más Frecuentes**

La planta ha sido usada medicinalmente por gente indígena por siglos y, subsecuentemente absorbida en las farmacopeas por otras personas. El género contiene muchas plantas que son usadas medicinalmente tanto en el viejo como en el nuevo mundo (Mabberley, 1997).

Una infusión popular hecha a partir de raíces frescas o secas se consume para aliviar dolores estomacales, cólicos, úlceras y diarrea; también ha sido recomendada para tratar diabetes (Andrade y Heinrich, 2005), problemas de circulación y resacas. Linares y Bye (1986) mencionan que la infusión también tiene efectos analgésicos y que funciona como un remedio para dolores de garganta, bronquitis, neumonía, tuberculosis, resfriados y tos. Las infusiones de la raíz también son usadas tópicamente para aliviar dolores del cuerpo y usadas en baños para tratar fiebres. Las raíces pulverizadas son aplicadas tópicamente en heridas y cortadas para prevenir infecciones. En el sur de Colorado y lugares adyacentes de Nuevo México, raspados de la raíz seca se mastican como un aperitivo y para mantener la juventud del cuerpo; algunas personas sugieren que esta planta es el equivalente mexicano del Ginseng. Se dice que un cataplasma de la raíz colocado en picaduras de insectos o escorpiones extrae el veneno. Los cataplasmas también son usados en heridas e infecciones de la piel; solos o mezclados con un montado de pino (*Pinus edulis* Engelm.) y hojas de “ponche mexicano” (*Nicotiana sp.*) se aplican en áreas del cuerpo con dolores reumáticos, calambres y huesos rotos. Las raíces son valoradas como un emético cuando son mezcladas con sal en agua caliente (Linares y Bye, 1986). Las raíces huecas han sido fumadas para terminar con el hábito de la nicotina (Curtin, 1976). Hojas y raíces pulverizadas son vendidas como condimento para carnes y frijoles. Las infusiones de *Ligusticum porteri* son empleadas en rituales de curación en

ceremonias de los Indios Tarahumaras y por los Indios Zuni (Linares y Bye, 1986). La raíz es usada como un talismán para alejar a las brujas y víboras venenosas, así como para atraer a la buena suerte. Para contrarrestar los efectos del “aire” (“aire” o “viento” malo que puede causar enfermedad), todo el cuerpo es frotado con una tintura alcohólica. Los Indios Tarahumaras usan la raíz como un pesticida (Linares y Bye, 1986).

### **Fitoquímica**

En la raíz de *L. porteri* se han identificado las ftálicas *Z*-ligustílida, *E*-ligustílida, (*Z*) 3- butilideneftálica (Delgado *et al.*, 1992; Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005), 6,7-*trans*-ligustidiol, senquiunólido 1), toquinólida B (Hernández-Vázquez, 1999), riligustílida, (*Z,Z'*)-*rel*-(6*R*, 7*R*)-6.6',7.3 *a'*-diligustílida y *Z*-8.6', 3.7'-digustílida (Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987), los terpenoides  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno (Delgado *et al.*, 1992),  $\alpha$ -tujeno, sabineno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\gamma$ -terpineno, *cis*-tujona, 1,2-epóxido de  $\alpha$ -felandreno, sabinol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -barbateno,  $\beta$ -funebreno, widreno, miristicina,  $\beta$ -barbateno,  $\alpha$ -chamigreno,  $\alpha$ -eudesmol, 1,3,8-mentatrieno, terpinen-4-ol, 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno, kesano, ligulóxido (Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005), los compuestos fenólicos isovainillina, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987), ácido ferúlico (Hernández-Vázquez, 1999), elemicina, *o*-metileugenol y, otros compuestos como pentilbenzeno, timil metiléter, carvacril metiléter, isotujil acetato, sabinil acetato, *trans*-pinocarveil acetato, bornil acetato, 4-terpinil acetato,  $\alpha$ -terpinil acetato (Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005),  $\beta$ -D-glucopiranósido de  $\beta$ -sitosterilo, acil glucosil esteroides (Hernández, 1996), falcarindiol y coniferil ferulato (Zschocke *et al.*, 1998).

### **PRINCIPALES GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS REPORTADOS EN *Ligusticum porteri***

## Fenoles

Los fenoles ocurren en una vasta matriz de productos naturales que tienen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (Harborne, 1984). Se extienden desde los alcaloides, a través de los lípidos, esteroides, glicósidos y, cannabinoides hasta otros grupos numerosos (Francis y Andersen, 2003). Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua, ya que ocurren frecuentemente combinadas con azúcares como glicósidos y se localizan usualmente en la vacuola de la célula. Los fenoles tienen la habilidad de formar complejos con proteínas por medio de enlaces hidrógeno. Cuando las membranas de las células vegetales son destruidas durante procedimientos de aislamiento, los fenoles rápidamente forman complejos con las proteínas y como resultado, frecuentemente hay una inhibición de la actividad enzimática en extractos crudos de la planta. Por otro lado, los fenoles son muy susceptibles a oxidación enzimática y se puede perder material fenólico durante los procedimientos de aislamiento debido a la acción de enzimas “fenolasas” específicas presentes en todas las plantas.

Entre los compuestos fenólicos naturales, los flavonoides constituyen el grupo más grande (Harborne, 1984). Éstos ocurren en una variedad de formas estructurales. Son compuestos con una estructura básica de:  $C_6-C_3-C_6$ . Se conocen 5000 flavonoides diferentes que se han dividido en alrededor de 12 clases de acuerdo al nivel de oxidación de la unidad  $C_3$  central. Los pigmentos flavonólicos son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de productos naturales. Se encuentran presentes universalmente en las plantas vasculares (Tyman, 2003). Además de su contribución al color de las plantas, los flavonoides tienen una amplia variedad de roles en el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Harborne y Baxter, 1999). Exhiben un amplio rango de propiedades biológicas, incluyendo actividades antimicrobianas, estrogénicas e insecticidas. Otros flavonoides le proveen a la planta resistencia antifúngica constitutiva. Hay mucha evidencia de que los flavonoides están involucrados en interacciones planta-animal y que pueden tener un papel de defensa en la planta (Harborne y Baxter, 1999). Los

flavonoides están presentes en muchas frutas y vegetales que conforman la dieta humana y, ha sido estimado que al menos un gramo de flavonoides es ingerido diariamente. Si es benéfico para la salud humana aún está en debate, pero hay evidencia de que presentan propiedades anticancerígenas y recolectoras de radicales. Los flavonoides también son componentes importantes de muchas plantas medicinales y, es posible que contribuyan a las propiedades curativas. Muchos flavonoides son farmacológicamente activos y, algunos tienen útiles propiedades antiinflamatorias o hepatoprotectoras (Harborne y Baxter, 1999).

## **Terpenos**

Un enorme rango de sustancias vegetales son llamadas con el nombre de: terpeno o terpenoide, éste término es usado para indicar que todas esas sustancias tienen un origen biosintético común, basados en la molécula de isopreno  $\text{CH}_2 = \text{C}(\text{CH}_3) - \text{CH} = \text{CH}_2$ . Las estructuras de carbono de los terpenoides están constituidas por la unión de dos o más de esas unidades  $\text{C}_5$ . Pueden tener dos ( $\text{C}_{10}$ ), tres ( $\text{C}_{15}$ ), cuatro ( $\text{C}_{20}$ ), seis ( $\text{C}_{30}$ ) u ocho ( $\text{C}_{40}$ ) unidades, y se clasifican de acuerdo al número de dichas unidades; van desde los componentes de aceites esenciales, mono- y sesquiterpenoides volátiles ( $\text{C}_{10}$  y  $\text{C}_{15}$ ), pasando por los diterpenos menos volátiles ( $\text{C}_{20}$ ), los triterpenoides y esteroides no volátiles ( $\text{C}_{30}$ ), hasta los pigmentos carotenoides ( $\text{C}_{40}$ ) (Harborne, 1984). Cada una de las clases de terpenoides son de significancia en el crecimiento de la planta, en su metabolismo o en su ecología (Harborne, 1984). Químicamente, los terpenoides son generalmente liposolubles y se localizan en el citoplasma de la célula vegetal. A veces los aceites esenciales se encuentran en células glandulares especiales en la superficie de la hoja, mientras que los carotenoides están especialmente asociados con los cloroplastos en la hoja y con los cromoplastos en el pétalo (Harborne, 1984). Los terpenoides vegetales tienen un gran número de funciones diferentes. Sus propiedades en la regulación del crecimiento están muy bien documentadas; dos de las mayores clases de reguladores del crecimiento son las abscisinas (sesquiterpenoides) y las giberelinas (basadas en diterpenoides). La contribución de los carotenoides al

color de las plantas es bien sabido, y estos terpenoides C<sub>40</sub>, también son pigmentos accesorios en la fotosíntesis. La importancia de los mono- y sesquiterpenos principalmente es proveer a las plantas de sus olores distintivos (Harborne, 1984).

### **Alcaloides**

El término alcaloide es aplicado a miembros de una clase de productos naturales de naturaleza básica y, se deriva del nombre “álcali vegetal”, primer nombre aplicado a estas sustancias. Se encuentran en hojas, semillas, raíces, y cortezas de las plantas (Bentley, 1957). Unas pocas docenas de alcaloides han sido aislados de animales y en ciertos casos el mismo compuesto ha sido encontrado tanto en plantas como en animales (Popl *et al.*, 1995). No hay una definición precisa del término alcaloide, sin embargo, recientemente se ha definido a un alcaloide como un compuesto orgánico cíclico que contiene nitrógeno en un estado de oxidación negativa que es de distribución limitada entre los organismos vivos. Esta definición puede ser suplementada por la aseveración de que casi todos los alcaloides son tóxicos y de que la gran mayoría de ellos han mostrado actividades fisiológicas y farmacológicas, por lo que han sido ampliamente usados en la medicina (Harborne, 1984; Popl *et al.*, 1995). Frecuentemente son sustancias ópticamente activas e incoloras; la mayoría son cristalinos pero algunos pocos son líquidos a temperatura ambiente. Los precursores más comunes de los alcaloides son los aminoácidos. Químicamente son un grupo muy heterogéneo, partiendo desde compuestos simples como la coniina, hasta la estructura pentacíclica de la estricnina (Harborne, 1984).

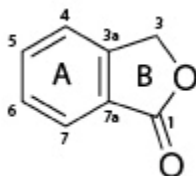
### **Ftálidas**

Las ftálidas son un grupo de acetogeninas naturales que pueden ser consideradas químicamente como lactonas derivadas del ácido ftálico y análogas estructurales del anhídrido ftálico, de ahí su nombre (Miyazawa *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005). Se han identificado más de 180 ftálidas de origen natural, de las cuales 137 han sido aisladas de 202 especies de plantas. Muchas de ellas son biológicamente activas

y tienen un amplio espectro de efectos farmacológicos, que incluyen actividad sobre el sistema nervioso central, anti-angina, prevención de la agregación plaquetaria, inhibición de la proliferación del músculo liso, prevención de trombosis, modulación de la función cardiaca, protección contra isquemia cerebral (Lin *et al.*, 2005), relajantes del músculo liso y sedantes (Rios, 1996; Hernández-Vázquez, 1999).

Desde tiempos antiguos, las plantas que contienen ftálicas han sido usadas alrededor del mundo como remedios herbolarios en la medicina tradicional, como suplementos alimenticios y como saborizantes (Lin *et al.*, 2005).

La estructura básica de una ftálica es 1(3H)-isobenzofuranona, la cual contiene un anillo de benceno (anillo A) fusionado con una  $\gamma$ -lactona (anillo B) entre los átomos de carbono 1 y 3 (figura 7). Las estructuras de los derivados de la 1(3H)-isobenzofuranona tienen la estructura básica sustituida con uno o más grupos en diferentes posiciones o contienen una forma reducida con uno, dos o sin dobles uniones en el anillo A y varias sustituciones en diferentes posiciones (Lin *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Estructura química de una ftálica (1(3H)-isobenzofuranona) (Lin *et al.*, 2005).

Muchas de las ftálicas naturales bioactivas identificadas, excepto el tipo de ftálica isoquinolina, se obtienen de dos géneros *Ligusticum* y *Angelica* en la familia Apiaceae (Umbelliferae) (Lin *et al.*, 2005). Del género de *Ligusticum*, más de 53 ftálicas han sido aisladas de 12 especies: *L. acuminatum*, *L. acutilobum*, *L. chuagxiong*, *L. jeholense*, *L. jeholense var. Tenuisectum*, *L. mutellina*, *L. officinale*, *L. porteri*, *L. sinense*, *L. sinense c. v. chaxiong*, *L. tenuissimum* y *L. wallichii* (Lin *et al.*, 2005).

Z-ligustílida es una ftálica de actividad biológica y farmacológica muy amplia; y se tienen los siguientes reportes: en ratas y ratones (Chordata) ha demostrado ser neuroprotector (Kuang *et al.*, 2006; 2007; Matsumoto *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2008), antioxidante y antiapoptótico (Kuang *et al.*, 2006), relajante muscular (Cao *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2006(a,b); Du *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 1984), antiesclerótico y antihipertensivo (Lu *et al.*, 2006), antiproliferativo (Liang y He, 2006; Kobayashi *et al.*, 1993); en conejos ha prevenido la agregación plaquetaria (Chordata) y la trombosis (Lin *et al.*, 2005). También inhibe el crecimiento en *Lemna paucicostata* (Magnoliophyta) y en *Selenastrum capricornutum* (Chlorophyta) (Meepagala *et al.*, 2005); es antiviral en Citomegalovirus y Rinovirus tipo II (Vira) (Heimbegner *et al.*, 2004); antibacterial en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus faecalis* y *Shigella sonnei* (Proteobacteria y Bacteria); antifúngico en *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Ascomycota) (Figuroa, 1997); tóxica en *Oscillatoria perornata* (Cyanophyta) (Meepagala *et al.*, 2005) y en *Artemia salina* (Arthropoda) (Delgado *et al.*, 1992; Figuroa, 1997; Heimbegner *et al.*, 2004); además ha demostrado ser insecticida en larvas de *Drosophila melanogaster* (Arthropoda) (Miyazawa *et al.*, 2004; Tsukamoto *et al.*, 2005).

También se han estudiado y probado otras ftálicas como riligustílida y toquinólida B, las cuales han mostrado ser relajantes del músculo liso (Lin *et al.*, 2005). La 3-butilideneftálica es anti-angina; previene la agregación plaquetaria y la trombosis; modula la función cardíaca; inhibe el daño en el aprendizaje y la memoria; inhibe la proliferación del músculo liso; es sedante y promotora del sueño y, además, también es relajante del músculo liso (Lin *et al.*, 2005). Ésta última, también ha demostrado ser insecticida contra larvas de *Drosophila melanogaster* (0.94  $\mu\text{mol/ml}$ ) con una  $\text{LD}_{50} = 0.84\mu\text{g/adulto}$ , lo cual la hace la ftálica más activa en comparación con Z-ligustílida (Miyazawa *et al.*, 2004).



## **MANEJO DE LAS PLANTAS MEDICINALES PARA ANÁLISIS FITOQUÍMICOS**

Idealmente, los tejidos de las plantas frescas deben ser usadas para los análisis fitoquímicos y el material debe ser sumergido en alcohol hirviendo algunos minutos después de su recolección; sin embargo en muchas ocasiones la planta no está a la mano y el material recolectado debe ser secado y almacenado. Es esencial que la operación de secado se lleve a cabo bajo condiciones controladas para evitar que ocurran muchos cambios químicos. La planta debe ser secada tan rápido como sea posible, sin usar altas temperaturas y preferentemente en un lugar aireado. Una vez totalmente secas, las plantas pueden ser almacenadas por largos periodos antes de ser analizadas. De hecho, los análisis para flavonoides, alcaloides, quinonas y terpenoides se han realizado con éxito en tejidos de plantas de herbario que datan de muchos años (Harborne, 1984).

En análisis fitoquímico, la identificación botánica de las plantas estudiadas deben ser autenticadas por un especialista en taxonomía vegetal (Harborne, 1984).

## JUSTIFICACIÓN

*Ligusticum porteri* es una planta medicinal con múltiples usos y de gran importancia en el norte del país y en el suroeste de los Estados Unidos, así como en diversas partes del mundo. Su principal forma de consumo es a través de la preparación de infusiones de la raíz. Debido a lo mencionado anteriormente y, ya que no se tienen reportes de genotoxicidad para esta planta, es de suma importancia realizar este tipo de pruebas con las infusiones de la raíz para asegurar que los compuestos presentes en la raíz de la planta no provoquen efectos dañinos *in vivo* al genoma de un organismo eucarionte, como *Drosophila melanogaster*, que presenta similitudes con vías metabólicas del ser humano.

## HIPÓTESIS

Si los tratamientos con el extracto de *Ligusticum porteri* muestran diferencias significativas en las frecuencias de las manchas respecto al testigo, podemos decir que inducen daño genotóxico en las células somáticas de los discos imaginales de las alas de *Drosophila melanogaster* con la prueba SMART.

## OBJETIVOS

### General:

- \* Realizar pruebas de genotoxicidad para la infusión y decocción de la raíz de *Ligusticum porteri*.

### Particulares:

- \* Determinar la LD<sub>50</sub> de la infusión y del cocido.
- \* Determinar el índice de sobrevivencia para todas las concentraciones utilizadas en los tratamientos.

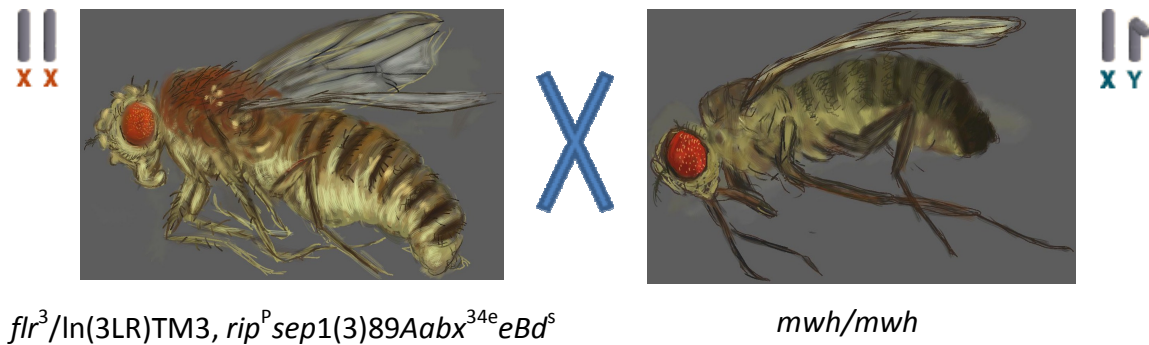
- \* Estudiar el probable efecto genotóxico de los tratamientos: infusión y decocción, mediante la prueba SMART en ala en *Drosophila melanogaster*.
- \* Definir cualitativamente los principales tipos de metabolitos secundarios que se encuentran en la raíz de *Ligusticum porteri* mediante cromatografía en placa fina.
- \* Observar la presencia de Z-ligustílida en el extracto hexánico de la raíz de *Ligusticum porteri* por medio de cromatografía en placa fina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

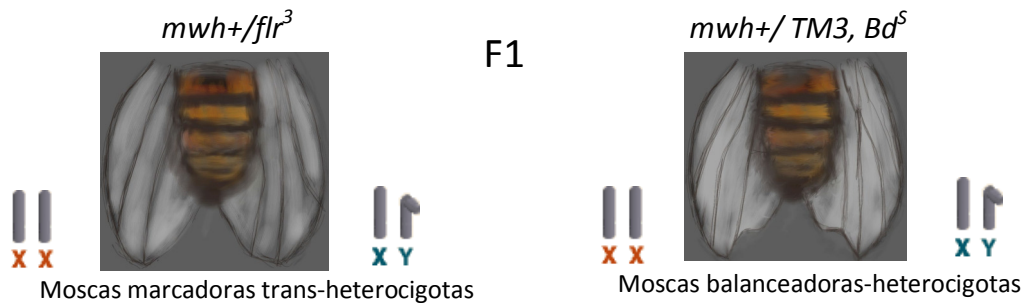
### Cruza

En la prueba SMART en ala se usan dos cruza diferentes para producir las poblaciones larvales experimentales: la cruza estándar (ST)(figura 8) y la cruza de alta bioactivación (HB). Ésta última se caracteriza por incrementar la sensibilidad a un gran número de promutágenos y procarcinógenos debido a los altos niveles de citocromos P450 que se expresan constitutivamente (Spanó *et al.*, 2001). Ambas cruza producen dos tipos de progenie:

- i. Moscas portadoras de los marcadores genéticos en condición trans-heterocigota, en las que las manchas de las alas pueden deberse a recombinación mitótica o a varios tipos de eventos mutacionales (Spanó *et al.*, 2001).
- ii. Moscas portadoras de un cromosoma balanceador, en las que sólo los eventos mutacionales inducen manchas en las alas, pues todos los eventos de recombinación son eliminados debido a las inversiones múltiples presentes en el cromosoma balanceador *TM3, Serratia* (Spanó *et al.*, 2001) (figura 9).



**Figura 8.** Cruza estándar. Dibujos por: Sergio Vargas Rodríguez.



**Figura 9.** Progenie de la cruza estándar. Alas silvestres de borde continuo en las moscas marcadoras trans-heterocigotas utilizadas para realizar las preparaciones que se van a examinar. Y alas serratia de borde aserrado en moscas balanceadoras heterocigotas. Dibujos por: Sergio Vargas Rodríguez.

### Prueba de toxicidad

Usualmente una serie experimental comienza con una prueba preliminar que involucra una gran cantidad de concentraciones; esto permite detectar los rangos de exposición tóxicos y no-tóxicos (Graf *et al.*, 1984). La cruza utilizada para este proyecto es la cruza estándar (ST), realizada a partir de hembras  $flr^3/ln(3LR)TM3, rip^P sep1(3)89Aabx^{34e} Bd^S$  s con machos  $mwh/mwh$ . Estas cepas expresan niveles basales de las enzimas que biotransforman compuestos xenobióticos. Se utiliza el alelo  $flr^3$  en lugar del alelo  $flr$ , debido a que se ha demostrado que  $flr^3$  es superior con respecto a su expresión en clones pequeños. Con la cruza  $mwh-flr^3$  las manchas de 2 o 3 células que muestran un fenotipo extremo de flama siguen siendo raras; sin embargo, se encuentran más frecuentemente en comparación con la cruza  $mwh-flr$  (Graf *et al.*, 1989). La cruza se sincroniza y se colectan huevos durante 6 horas en medio de cultivo con levadura, tres días después, se recuperan las larvas de tercer

estadio ( $72\pm 3h$ ) para realizar las pruebas de toxicidad. Debido a que no pueden distinguirse los dos tipos de alas durante los estadios larvarios, la progenie se trata en forma conjunta. Se probaron dos tipos de extractos mediante tratamientos crónicos a larvas de  $72\pm 3$  horas de edad. Para alimentar a las larvas se preparan viales con 1g de Medio Instantáneo para *Drosophila* (Suplemento Biológico Carolina Co. Burlington, NC, EUA) y 4ml de la solución respectiva de acuerdo al tratamiento. En cada vial se colocan 50 larvas por cada concentración probada y se realizan dos repeticiones.

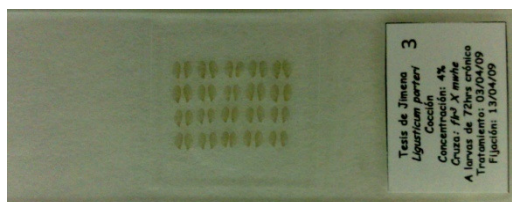
La raíz utilizada para los extractos se obtuvo de la localidad: México:Chihuahua: Municipio Chihuahua: Cd. Chihuahua: Mercado de Reforma el 21 de octubre de 2006. Y fue donada por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares del Instituto de Biología. Una muestra se encuentra en la Colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU).

El primer extracto se obtuvo como una infusión de la raíz y el segundo se obtuvo después de un cocimiento de la raíz durante 20 minutos/Lt. De cada extracto se probaron cinco concentraciones: 0.1%, 0.5%, 1%, 5% y 10%, corriéndose el testigo concurrente en cada uno de ellos. En el caso de la infusión, lo primero que se hizo fue moler la raíz seca de la planta con ayuda de un molino de café. Se pesaron 10g en una balanza granataria para obtener una concentración del 10%. En un vaso de precipitados de 500ml se hirvieron 100ml de agua comercial (Bonafont) y se agregaron los 10 g de la planta; se puso a calentar hasta echar el primer hervor, se retiró del fuego y se tapó. La infusión se dejó reposar 15 minutos para poder usarla y ponerla en los viales con medio Carolina. A partir de esta concentración se hicieron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones finales. Para la decocción se realiza el mismo procedimiento; la única diferencia es que el agua con la raíz se deja hervir por más tiempo para lograr la cocción. A partir de la concentración obtenida del 10%, se realizan las diluciones necesarias para obtener las concentraciones que se van a poner a prueba. Finalmente, para el testigo concurrente, se utilizó agua Bonafont hervida.

Siete días después de poner a las larvas de  $72\pm 3$  horas en tratamiento, se cuentan las moscas adultas que sobrevivieron en cada concentración de ambos extractos y se realiza un segundo experimento independiente. Los resultados de ambos experimentos se comparan y se promedian para obtener el índice de sobrevivencia. Las moscas son recolectadas de los viales y se almacenan en etanol al 70%.

## Ensayo SMART

Para el ensayo SMART se realiza el mismo proceso llevado a cabo para la prueba de toxicidad utilizando las concentraciones derivadas de las pruebas de LD<sub>50</sub>. Para obtener el número de alas requeridas se llevaron a cabo dos experimentos independientes. En esta ocasión, las alas de las moscas marcadoras trans-heterocigotas (tipo silvestre de borde continuo) son montadas en portaobjetos con solución de Fauré. En cada preparación se montan 10 pares de alas de hembras y 10 pares de alas de machos (figura 10); se realizan tres preparaciones para cada concentración y testigos concurrentes.



**Figura 10.** Preparaciones de las alas de las moscas marcadoras heterocigotas.

Ambas superficies de las alas son revisadas bajo un microscopio compuesto con un aumento de 400X para registrar la ocurrencia de las manchas. Se registran tres categorías de manchas por separado: (1) manchas sencillas *mwh*, (2) manchas sencillas *flr*<sup>3</sup> y, (3) manchas gemelas con áreas *mwh* y *flr*<sup>3</sup> adyacentes. Debido a que hay una correlación entre el tiempo de inducción de un cambio genético en las células somáticas y el tamaño de la mancha resultante, además de registrar la frecuencia de las manchas, también se registra su tamaño. Las técnicas se realizan de acuerdo a Graf et al. (1984, 1998).

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos son evaluados con el programa SMART (Würgler, no publicado), el cual se basa en la prueba no paramétrica de ji cuadrada para proporciones con un grado de libertad y un nivel de confianza de 0.95.

Debido a que el ensayo de genotoxicidad en *Drosophila* se basa en principio en manchas somáticas (clones mutantes) que son registrados en números variables en moscas individuales, las distribuciones esperadas son de tipo Poisson; sin embargo, debido a que los datos son obtenidos a partir de diferentes individuos, sexos y experimentos, éstos pueden

(pero no necesariamente) conducir a un sobredispersamiento, por lo que los datos pueden mostrar mayor variabilidad de la teóricamente esperada. Para un poder óptimo de la prueba estadística, es preferible usar los mismos números totales de moscas tanto en el control como en las series tratadas. Las pruebas estadísticas basadas en la distribución Poisson son demasiado liberales si hay una sobredispersión de los datos debido a una variabilidad excesiva entre los individuos. Es por ello que además de la evaluación con el programa SMART, se propone usar la prueba U de Mann-Whitney y Wilcoxon para ajustar el tamaño de muestra óptimo de acuerdo a (i) la sobredispersión observada en un control históricamente grande y (ii) la eficiencia relativa de la prueba U en comparación con la prueba de t y con pruebas paramétricas relacionadas. Esta prueba es muy sensible a diferencias entre las medianas, pero insensible a distribuciones no- normales de los datos (Frei y Würigler, 1995).

El procedimiento combina dos pruebas estadísticas: una prueba contra la hipótesis nula ( $H_0$ ), la cual asume que un tratamiento experimental no incrementa la frecuencia del daño genético sobre el control; y una segunda prueba contra la hipótesis alterna ( $H_A$ ), en la que se asume que un tratamiento dado multiplica la frecuencia del daño genético sobre la frecuencia del control (Frei y Würigler, 1988; 1995).

La formulación de estas dos hipótesis permite distinguir entre los cuatro posibles resultados de un experimento presentados en la tabla 4: positivo, débil positivo, no concluyente, o negativo (Frei y Würigler, 1988).

**Tabla 4.** Posibles resultados a partir de la aceptación o rechazo de las hipótesis nula y alterna (Frei y Würigler, 1988).

Hipótesis	$H_A$ aceptada	$H_A$ rechazada
$H_0$ aceptada	No-concluyente	Negativo
$H_0$ rechazada	Positivo	Débil positivo

En las pruebas estadísticas se tienen dos tipos de errores:

- Error tipo I: existe la probabilidad de que la hipótesis nula sea rechazada aunque ésta sea verdadera.

- Error tipo II: probabilidad de que la hipótesis nula sea aceptada aunque la hipótesis alterna sea verdadera (Frei y Würigler, 1995).

Para llevar a cabo la prueba es importante tener una alta probabilidad de rechazar la hipótesis nula probando que la hipótesis alterna realmente es verdadera. Esta probabilidad es llamada, la potencia de la prueba en contra de la hipótesis nula. Una potencia alta reduce la posibilidad de obtener resultados inconclusos (Frei y Würigler, 1995).

Un poder de 0.90, es decir que en 9 de 10 casos se obtenga un diagnóstico positivo o negativo, es frecuentemente considerado razonable (Frei y Würigler, 1995).

En el ensayo SMART en ala no sólo se evalúa la genotoxicidad por el número de manchas registradas, sino también distinguiendo el número de manchas gemelas del número de manchas sencillas, dado que las manchas gemelas se producen únicamente por recombinación mitótica, mientras que las manchas sencillas pueden ser producidas por varios mecanismos genéticos. Las manchas sencillas pequeñas (1-2 células) también son consideradas separadamente de las manchas sencillas grandes (3 células o más). Las manchas pequeñas son especiales porque éstas son inducidas tarde en el desarrollo en la pupa prematura cuando la ingesta de comida ha cesado o pueden deberse a clones aneuploides con una baja capacidad de proliferación (Frei y Würigler, 1995).

Para evaluar los resultados negativos, se escogen empíricamente factores de multiplicación para la prueba. Para el total de manchas y manchas sencillas pequeñas este factor es igual a 2 y para manchas sencillas grandes y manchas gemelas, el factor es igual a 5. De acuerdo a estos parámetros, Frei y Würigler (1995), calcularon un tamaño de muestra óptimo de 55 moscas para el control y para cada tratamiento, lo que hace posible detectar una frecuencia de manchas con un nivel de significancia del 5% en el 95% de los casos si el tratamiento verdaderamente duplica la frecuencia de manchas en comparación con la frecuencia del control.

Los datos se presentan por cada individuo, pues las manchas encontradas en el par de alas del individuo no representan necesariamente eventos completamente independientes (Frei y Würigler, 1995).

Para un diseño óptimo del experimento los requerimientos mínimos son: (i) que cada serie de tratamiento este acompañada por una serie control, (ii) que para cada experimento la tasa



entre el número de moscas tratadas y el número de moscas control examinadas sea el mismo, y (iii) que para los grupos del control y el tratamiento en cada experimento la tasa entre hembras y machos examinados sea el mismo (Frei y Würgler, 1995).

### **Obtención de extractos**

Se realizaron maceraciones de la raíz de *Liguticum porteri* con tres disolventes: hexano, acetato de etilo y metanol, para obtener extractos de diferentes polaridades y poder determinar los grupos principales de metabolitos secundarios presentes en la raíz por medio de cromatografía en capa fina.

Lo primero que se realizó fue moler 100g de la raíz hasta que se obtuvieron partículas muy finas, las cuales se colocaron en una botella de vidrio color ámbar de 1lt. Conviene que las partículas sean lo más pequeñas posibles para que de esta forma el disolvente tenga el mayor contacto posible con la raíz y poder obtener la mayor cantidad de extracto posible. Posteriormente se agregó hexano, cubriendo completamente la raíz e incluso un poco más. La botella se conservó a temperatura ambiente y se movía constantemente durante el día. Para comenzar a obtener el extracto y recuperar el disolvente, es necesario filtrar y destilar (figura 11).



**Figura 11.** Filtración del disolvente.

El proceso de destilación simple a presión reducida se utilizó en este trabajo. Para ello se uso un rotaevaporador Büchi, el cual consiste en un motor eléctrico que produce el giro de un tubo con un ajuste esmerilado al que se acopla un matraz de fondo redondo que contiene

la disolución. Dicho matraz se sumerge parcialmente en un baño de agua, manteniendo el giro. Acoplado al sistema, se encuentra un refrigerante por el que circula un líquido, por lo general agua, que produce la condensación del disolvente que se recoge en un colector. El conjunto constituye un sistema cerrado conectado a un circuito de vacío (figura 12).



**Figura 12.** Rotaevaporador.

El hexano fue el primer disolvente con el que se realizaron maceraciones, (48hX5) a temperatura ambiente, debido a que es el disolvente de menor polaridad. La recuperación del disolvente entre cada extracción se efectuó en un rotaevaporador Büchi a 60 rpm con una temperatura 10°C menor al punto de ebullición del disolvente utilizado (p.e. hexano: 69°C, p.e. acetato de etilo: 77°C, p.e. metanol: 65°C), esto es debido a que la presión del sistema es menor, por lo que baja la temperatura de ebullición. Una vez que se terminan las maceraciones con cada disolvente, la planta se seca para comenzar con el siguiente disolvente.

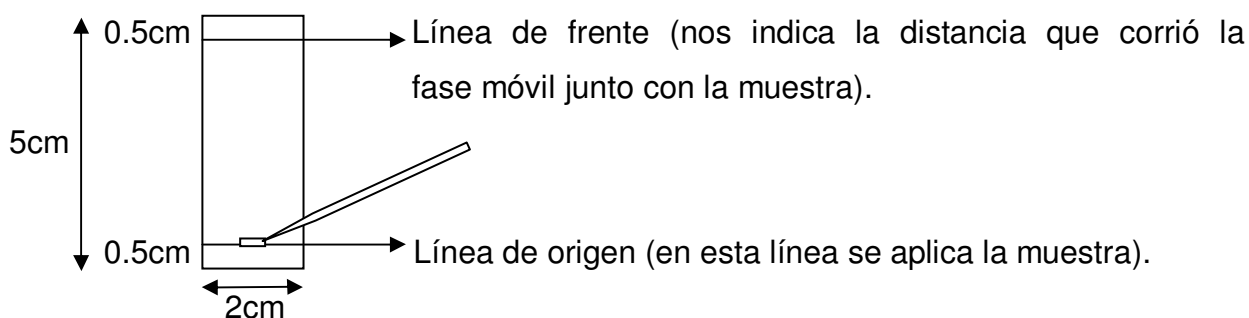
Posteriormente se realizaron extracciones (48hX6) con acetato de etilo utilizando el mismo procedimiento que con el disolvente anterior. El último disolvente utilizado y el más polar fue el metanol (48hX6).

Una vez obtenidos todos los extractos se prosiguió a realizar las cromatografías en placa fina.

## Cromatografía en placa fina

Para las cromatografías en placa fina se realizaron pruebas preliminares en las que se buscó la fase móvil adecuada para la separación de los componentes presentes en cada extracto; dichas cromatografías preliminares se llevaron a cabo en cámaras de desarrollo vertical ascendente; sin embargo, para los cromatogramas finales se utilizó una cámara para cromatografías de desarrollo horizontal. Las placas utilizadas fueron de sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub>.

En las cromatografías preliminares, la muestra de cada extracto fue disuelta en una pequeña cantidad del disolvente antes de la aplicación a la placa. Se cortaron placas cromatográficas de sílica gel de 2cm de ancho por 5cm de largo. Se marcaron dos líneas ubicadas a 0.5cm de cada extremo de la placa y, la muestra se aplicó en el centro de la línea de origen del corrimiento con un tubo capilar de punta alargada por calentamiento (figura 13). Es necesario tener cuidado de no maltratar la capa delgada del adsorbente durante la aplicación de la muestra.



**Figura 13.** Placa utilizada para las pruebas preliminares.

Debe tenerse cuidado de no sobrecargar la mancha, pues de lo contrario se presentará el rayado (escurrimiento), de igual forma debe de tenerse en cuenta que aplicar una cantidad pequeña de muestra presentará baja visualización de bandas, por lo que también se realizaron pruebas para obtener la cantidad de muestra que se debía aplicar en las cromatografías finales. La disolución del extracto fue de 100mg X 1000 $\mu$ l del disolvente. En las cromatografías finales de los extractos de hexano y acetato de etilo se aplicaron 5 $\mu$ l de sus respectivas disoluciones, mientras que para el extracto de metanol se utilizaron 7 $\mu$ l de su disolución.

Una vez que se aplica la muestra, la placa se deja secar y posteriormente se coloca dentro de una cámara cerrada saturada con los vapores del eluyente, acelerando de esta forma la cromatografía e incrementando su resolución (Domínguez, 1975). El extremo de la placa más cercano al origen se pone en contacto con la fase móvil y las manchas se mueven en línea recta. Si la mezcla no corrió en el eluyente de menor polaridad, entonces se prueban otras fases móviles con mayor polaridad. Después del desarrollo se sacan las placas de la cámara y se secan. Las bandas resueltas se localizan inspeccionando la placa bajo luz ultravioleta a 254 nm. Como la sílica gel tenía un compuesto fluorescente, a esta longitud de onda, las bandas se veían oscuras en un fondo verde fluorescente. Algunas sustancias orgánicas requieren de un revelador químico para poder ser visualizadas y, dependiendo del revelador, en ocasiones es necesario calentar la placa para que se efectúe la reacción que permita la observación de las bandas en las que se presentan dichas sustancias. La inspección de las bandas puede ser en luz visible o en luz ultravioleta a 365 nm. Sobre el cromatograma terminado se punteó el contorno de las manchas con un lápiz y posteriormente se reveló con sulfato cérico, la placa se calentó a 95 °C y se observó en luz ultravioleta de onda larga (365 nm) para tener la certeza de observar todas las manchas, incluso aquellas que no se habían detectado antes de la aplicación del revelador.

Con estas pruebas preliminares se obtuvo que para el extracto con hexano, la fase móvil adecuada era de hexano-acetato de etilo 9:1. Para el extracto de acetato de etilo, la fase móvil de mejor corrimiento fue la mezcla hexano-acetato de etilo 5:5. Y finalmente para el extracto de metanol la fase móvil apropiada fue la mezcla propanol-etanol-agua 7:1:1.

Para los cromatogramas finales se usaron placas de sílica-gel 60F<sub>254</sub> de 10X10 cm. Para cada extracto se realizó una placa. Éstas se dividieron en siete carriles de 0.5 cm cada uno, con una separación de 0.8 cm entre ellos. La línea de origen se marcó a los 0.5 cm de la placa y, una vez que se aplicaron las siete muestras, la placa se colocó en la cámara de desarrollo horizontal, y el eluyente se dejó correr hasta el final de la placa. El cromatograma se dejó secar y se aplicaron los diferentes reactivos para poder detectar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de la raíz. El orden en el que se aplicaron los reveladores se puede observar en la tabla 5.

**Tabla 5.** Orden de aplicación de los reveladores usados en cada carril del cromatograma para detectar los grupos de metabolitos secundarios.

Carril 1	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7
Control Sin revelar	Flavonoides $AlCl_3$	Fenoles $FeCl_3$	Compuestos insaturados $KMnO_4$	Alcaloides Draggendorf	Terpenos Liebermann Burchard	Control Sulfato cérico
	No calentar	No calentar	No calentar	No calentar	Calentar a 100 °C	Calentar a 100 °C
	Observar en luz UV de 365 nm	Observar en luz visible	Observar en luz visible	Observar en luz visible	Observar en luz visible y en luz UV de 365 nm	Observar en luz UV de 365 nm
	Presencia: se observan bandas de amarillas a incoloras.	Presencia: se observan bandas azules, rojas o verdes.	Presencia: se observan bandas amarillas.	Presencia: se observan bandas naranjas.	Presencia: se observan bandas rosas y verdes.	

Z-ligustílida se ha reportado como el metabolito secundario más abundante de la raíz de *Ligusticum porteri* (Lin *et al.*, 1998; Crowden *et al.*, 1969). Su estructura tiene una parte lipofílica y otra soluble en agua; por lo anterior Z-ligustílida es soluble en diferentes disolventes, y por ello se tiene la hipótesis de que esta ftálida monomérica podría estar presente en los extractos acuosos probados. Para confirmar la presencia de Z-ligustílida en la muestra de la raíz con la cual se realizó todo el trabajo experimental se realizó una cromatografía en placa fina utilizando como fase estacionaria sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub> y como fase móvil tolueno- acetato de etilo- ácido acético glacial (90:10:1). Se corrieron tres carriles en los que se aplicó 0.6mg del extracto. Se realizó una detección directa en luz UV-254 nm y en UV-365 nm. El primer carril es un control con sulfato cérico como revelador. El segundo carril se corrió con revelador de anisaldehído/ácido sulfúrico: anisaldehído (0.5 ml) - ácido acético glacial (10 ml) - metanol (85 ml) - ácido sulfúrico (5 ml), mezclado en ese orden y una

vez aplicado es calentado a 100°C por 5 a 10 minutos. Sirve para la detección de muchos compuestos, especialmente terpenos, azúcares, fenoles y esteroides (Gibbons y Gray, 1998). Finalmente el tercer carril también fue un control pero en esta ocasión no se aplicó ningún revelador.

Sobre los cromatogramas terminados se puntea el contorno de las manchas con lápiz, se marcan los centros y se mide su distancia a la línea de origen. El cociente entre las distancias (mancha-origen) y (frente-origen) da el valor  $R_f$ .

Las bases teóricas para realizar tanto las extracciones como las cromatografías en placa fina se encuentran en los anexos.

## RESULTADOS

### Toxicidad

En las pruebas de toxicidad llevadas a cabo para la infusión y la decocción, se obtuvo una dosis letal media en la concentración del 5%, para la infusión la mortalidad fue del 58%, mientras que para la decocción la mortalidad fue del 54% (tablas 6 y 7). En dichas tablas también se puede notar que la concentración del 10% presenta un bajo índice de sobrevivencia para ambos tipos de extractos, sin embargo, el de la decocción es mucho más bajo. También se puede observar que las concentraciones 0.1% y 0.5% presentan el mismo índice de sobrevivencia tanto para el caso de la infusión como para el de la decocción.

Dados los resultados anteriores, se resolvió no utilizar las concentraciones de 0.1% y 10% para las pruebas de genotoxicidad. Al ser el índice de sobrevivencia de la decocción tan bajo (0.02% de sobrevivencia), se decidió bajar las concentraciones de este extracto para el ensayo SMART, probando las siguientes concentraciones: 0.5%, 1%, 2% y 4%, así como el control negativo concurrente (agua).

**Tabla 6.** Índice de sobrevivencia de las concentraciones de la Infusión

	Testigo	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
Índice de sobrevivencia	1	0.97	0.97	0.94	0.42	0.12

**Tabla 7.** Índice de sobrevivencia de las concentraciones de la Decocción.

	Testigo	0.1%	0.5%	1%	5%	10%
Índice de sobrevivencia	0.94	0.93	0.93	0.86	0.46	0.02

### Genotoxicidad



Con el ensayo SMART solamente se obtuvieron manchas tipo *mwh*, ninguna mancha *flr<sup>3</sup>* ni tampoco manchas gemelas (tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados SMART de las frecuencias de tipos de manchas de tratamientos crónicos (48h) de extractos acuosos de *Ligusticum porteri*.

Extracto (%)	Sexo	Número de alas (Individuos)	Tipos de manchas			Total
			<i>mwh</i>	<i>flr<sup>3</sup></i>	Gemelas	
<b>Infusión</b>						
<b>Control</b>	Hembras	60 (30)	14 (0.23)	0 (0.00)	0 (0.00)	14 (0.23)
	Machos	60 (30)	26 (0.43)	0 (0.00)	0 (0.00)	26 (0.43)
	Hembras+Machos	120 (60)	40 (0.33)	0 (0.00)	0 (0.00)	40 (0.33)
<b>0.50%</b>						
<b>0.50%</b>	Hembras	58 (29)	23 (0.40)	0 (0.00)	0 (0.00)	23 (0.40)
	Machos	60 (30)	18 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (0.30)
	Hembras+Machos	118 (59)	41 (0.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	41 (0.35)
<b>1%</b>						
<b>1%</b>	Hembras	60 (30)	18 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (0.30)
	Machos	60 (30)	34 (0.57)	0 (0.00)	0 (0.00)	34 (0.57)
	Hembras+Machos	120 (60)	52 (0.43)	0 (0.00)	0 (0.00)	52 (0.43)
<b>5%</b>						
<b>5%</b>	Hembras	60 (30)	23 (0.38)	0 (0.00)	0 (0.00)	23 (0.38)
	Machos	60 (30)	21 (0.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	21 (0.35)
	Hembras+Machos	120 (60)	44 (0.37)	0 (0.00)	0 (0.00)	44 (0.37)
<b>Decocción</b>						
<b>Control</b>	Hembras	60 (30)	13 (0.22)	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (0.22)
	Machos	60 (30)	22 (0.37)	0 (0.00)	0 (0.00)	22 (0.37)
	Hembras+Machos	120 (60)	35 (0.29)	0 (0.00)	0 (0.00)	35 (0.29)
<b>0.50%</b>						
<b>0.50%</b>	Hembras	60 (30)	19 (0.32)	0 (0.00)	0 (0.00)	19 (0.32)

	Machos	58 (29)	27 (0.47)	0 (0.00)	0 (0.00)	27 (0.47)
	Hembras+Machos	118 (59)	46 (0.39)	0 (0.00)	0 (0.00)	46 (0.39)
<b>1%</b>						
	Hembras	60 (30)	30 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	30 (0.50)
	Machos	60 (30)	30 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	30 (0.50)
	Hembras+Machos	120 (60)	60 (0.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	60 (0.50)
<b>2%</b>						
	Hembras	58 (29)	14 (0.24)	0 (0.00)	0 (0.00)	14 (0.24)
	Machos	58 (29)	17 (0.29)	0 (0.00)	0 (0.00)	17 (0.29)
	Hembras+Machos	116 (58)	31 (0.27)	0 (0.00)	0 (0.00)	31 (0.27)
<b>4%</b>						
	Hembras	60 (30)	18 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	18 (0.30)
	Machos	60 (30)	26 (0.43)	0 (0.00)	0 (0.00)	26 (0.43)
	Hembras+Machos	120 (60)	44 (0.37)	0 (0.00)	0 (0.00)	44 (0.37)

En la tabla 9 y en las gráficas 2 y 3 se observa que el mayor número de manchas se encuentra entre las primeras tres clases de tamaño, lo cual significa que el tamaño del clon va de 1 a 4 células ( $2^n$ ). En el caso de la infusión, en la concentración del 1% se observa un incremento en las clases 4 (5-8 células) y 5 (9-16 células), pero en general, las concentraciones restantes presentan un patrón similar.

En el caso de la decocción, la concentración más alta sólo indujo manchas menores a 4 células; sin embargo, las concentraciones menores sí presentan manchas en las clases mayores.

En ambas gráficas se puede notar a simple vista que la concentración del 1% es la que presenta el mayor número de manchas en ambos extractos

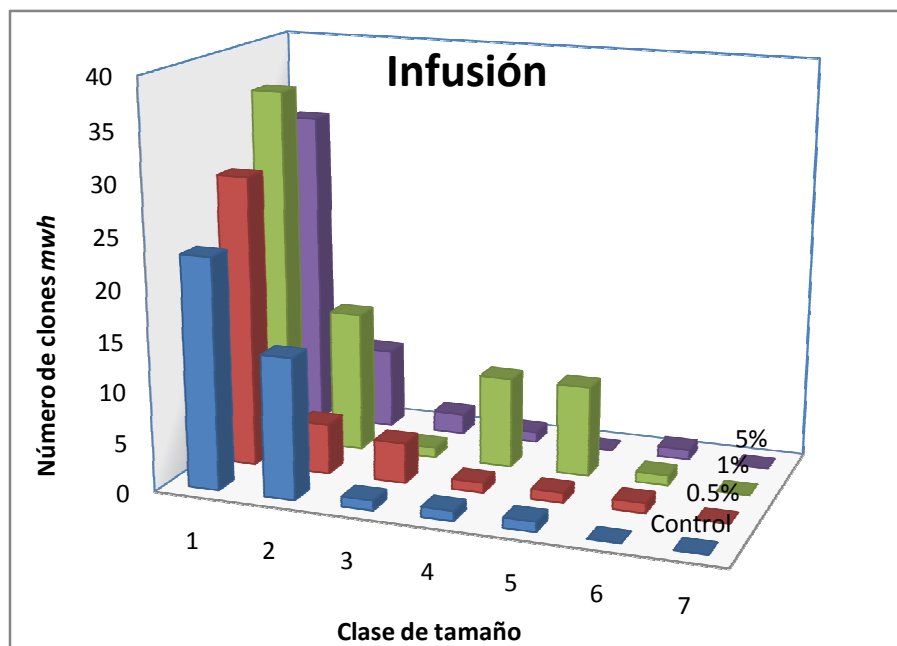
**Tabla 9.** Distribución de manchas de acuerdo al tamaño (2<sup>n</sup>) obtenidas en células del ala de *Drosophila melanogaster* con diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Ligusticum porteri* durante 48 horas

Distribución del tamaño del clon <i>mwh</i>						Total de clones <i>mwh</i>	Tamaño promedio del clon <i>mwh</i>
2	3	4	5	6	7		
2	3-4	5-8	9-16	17-32	>33		
<b>Infusión</b>							
14	1	1	1	0	0	40	1.58
5	4	1	1	1	0	41	1.61
14	1	0	0	1	0	52	1.40
8	2	1	0	1	0	44	1.45
7	0	0	0	0	1	35	1.37
11	2	1	2	0	1	46	1.70
10	3	1	2	0	0	60	1.45
6	2	0	0	1	0	31	1.48
12	2	0	0	0	0	44	1.36

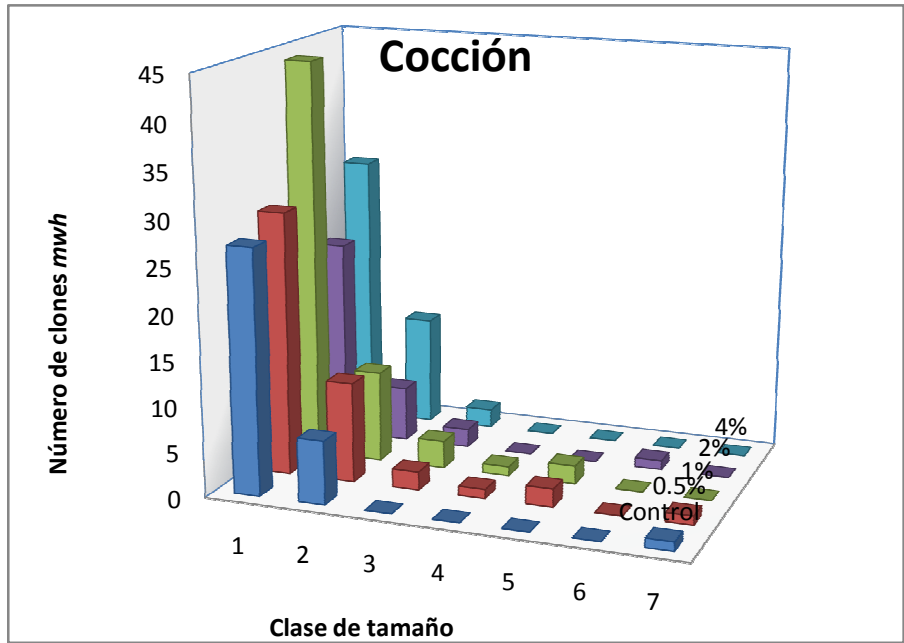
Concentración (%)	Número de moscas	Clase de tamaño:	
		1	Células (2 <sup>n</sup> ):
Control	60	23	27
0.50%	59	29	29
1%	60	36	44
5%	60	32	22

Cocción	
Control	60
0.50%	58
1%	60
2%	60
4%	60



**Gráfica 2.** Distribución del tamaño del clon *mwh* de acuerdo a la clase de tamaño obtenida en células del ala de *Drosophila melanogaster* con diferentes concentraciones de la infusión de *Ligusticum porteri* durante 48 horas.



**Gráfica 3.** Distribución del tamaño del clon *mwh* de acuerdo a la clase de tamaño obtenida en células del ala de *Drosophila melanogaster* con diferentes concentraciones de la decocción de *Ligusticum porteri* durante 48 horas.

El diagnóstico estadístico, mostró que las manchas pequeñas dieron un resultado negativo para todas las concentraciones de los extractos acuosos. Las manchas grandes presentan un resultado indeterminado y la concentración del 1% de la infusión presenta un resultado negativo. No se encontraron manchas gemelas. Al comparar el número total de manchas obtenido en los tratamientos con el control concurrente, los resultados fueron negativos en todos los casos (tabla 10).

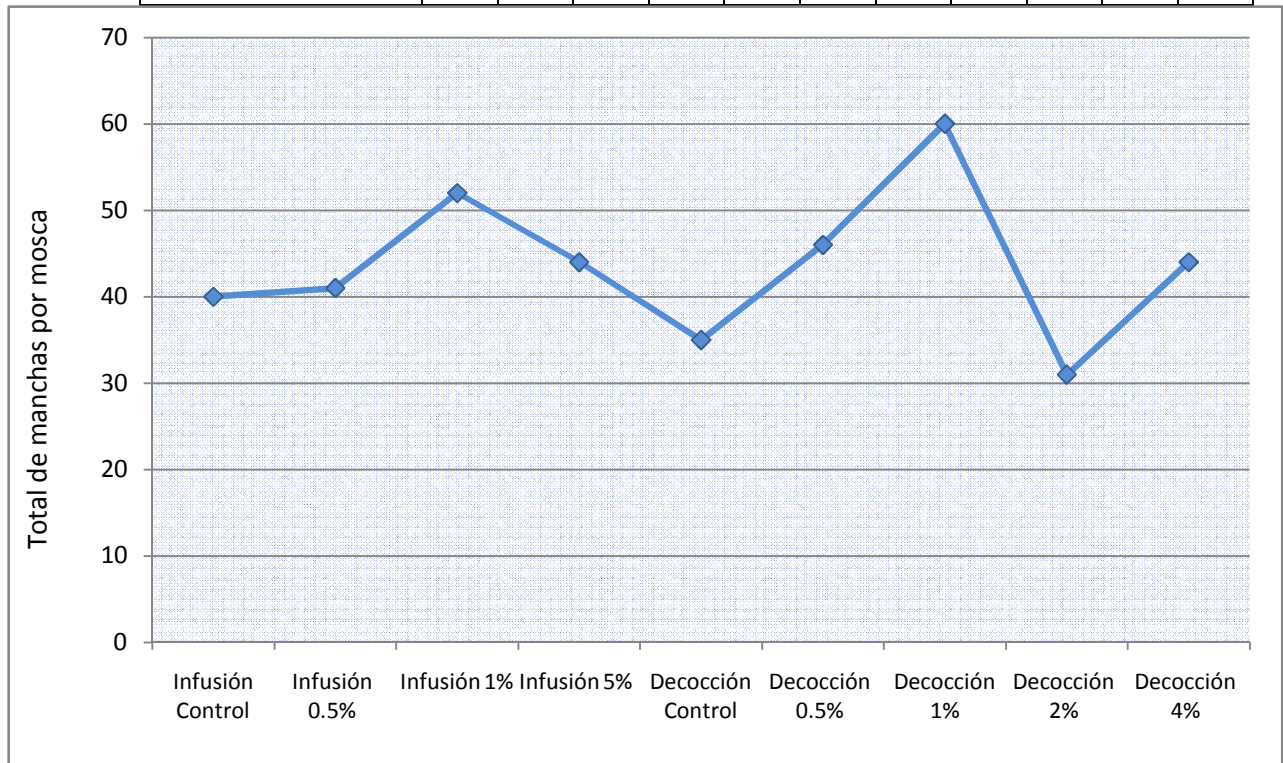
En la gráfica 4 se presenta el número de manchas totales por mosca, en la que puede notarse que en todas las concentraciones de la infusión se presentó un número mayor de manchas que en el control o grupo testigo. En el caso de la decocción, la concentración del 2% presenta un número menor de manchas que el grupo testigo, sin embargo las tres concentraciones restantes tuvieron un mayor número de manchas que el control. En ambos extractos, las concentraciones del 1% fueron las que registraron el mayor número de manchas, sobresaliendo la de la decocción con 60 manchas, casi el doble del número de manchas que presentó su grupo control.

**Tabla 10.** Frecuencia y número de manchas por moscas obtenidas al tratar de forma crónica larvas de  $72 \pm 3h$  de *Drosophila melanogaster* con la infusión y la decocción de *Ligusticum porteri* en diferentes concentraciones.

Frecuencia de manchas por mosca (número de manchas). Diagnóstico			Manchas con clon <i>mwh</i>	Tamaño promedio del clon	Frecuencia de la formación de clones x $10^{-5}$	
Manchas grandes (>2 células) <i>m=5.0</i>	Manchas gemelas <i>m=5.0</i>	Total de manchas <i>m=2.0</i>			Observada	Corregida
<b>Infusión</b>						
0.05 (3)	0.00 (0)	0.67 (40)	40	1.58	1.4	
0.12 (7)i	0.00 (0)i	0.69 (41)-	41	1.61	1.4	0.1
0.03 (2)-	0.00 (0)i	0.87 (52)-	52	1.40	1.8	0.4
0.07 (4)i	0.00 (0)i	0.73 (44)-	44	1.45	1.5	0.1
<b>Cocción</b>						
0.02 (1)	0.00 (0)	0.58 (35)	35	1.37	1.2	
0.10 (6)i	0.00 (0)i	0.78 (46)-	46	1.70	1.6	0.4
0.10 (6)i	0.00 (0)i	1.00 (60)-	60	1.45	2.1	0.9
0.05 (3)i	0.00 (0)i	0.53 (31)-	31	1.48	1.1	-0.1
0.03 (2)i	0.00 (0)i	0.73 (44)-	44	1.36	1.5	0.3

$\Omega$  Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988): (+) positivo, (-) negativo,

Extracto /Concentración (%)	Número de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m=2.0
0.50%	59	0.58 (34)-
1%	60	0.83 (50)-
5%	60	0.67 (40)-
Control	60	0.57 (34)
0.50%	58	0.68 (40)-
1%	60	0.90 (54)-
2%	60	0.48 (28)-
4%	60	0.70 (42)-



**Gráfica 4.** Número de manchas totales obtenidas al tratar de forma crónica larvas de  $72 \pm 3h$  de *Drosophila melanogaster* con las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *Ligusticum porteri*.

### Fitoquímica

En la elaboración de las maceraciones, a partir de los 100g que se utilizaron de la raíz de *Ligusticum porteri*, se obtuvieron las siguientes cantidades de extracto con cada disolvente (tabla 11):

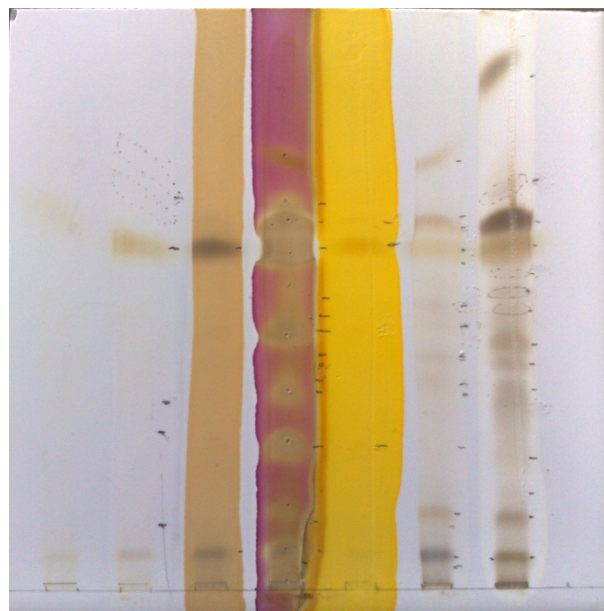
**Tabla 11.** Cantidad de extracto obtenido con cada uno de los disolventes utilizados para las maceraciones de la raíz de *Ligusticum porteri*.

Disolvente	Cantidad de extracto	Porcentaje de rendimiento (%)
Hexano	9.2246g	9.22
Acetato de etilo	6.9656g	6.97
Metanol	11.0914g	11.09

### Cromatografía en placa fina

Por medio de la cromatografía en placa fina se identificaron los grupos químicos de metabolitos secundarios que se encuentran en la raíz de *Ligusticum porteri*. Los  $R_{fs}$  obtenidos con los tres disolventes utilizados son los presentados en las tablas 12, 13 y 14 y se observan en las figuras 14, 15 y 16 muestran los cromatogramas de cada extracto.

Hexano



**Figura 14.** Cromatograma del extracto de hexano.

Fase estacionaria: sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub>

Fase móvil: hexano-acetato de etilo 9:1

Temperatura ambiente

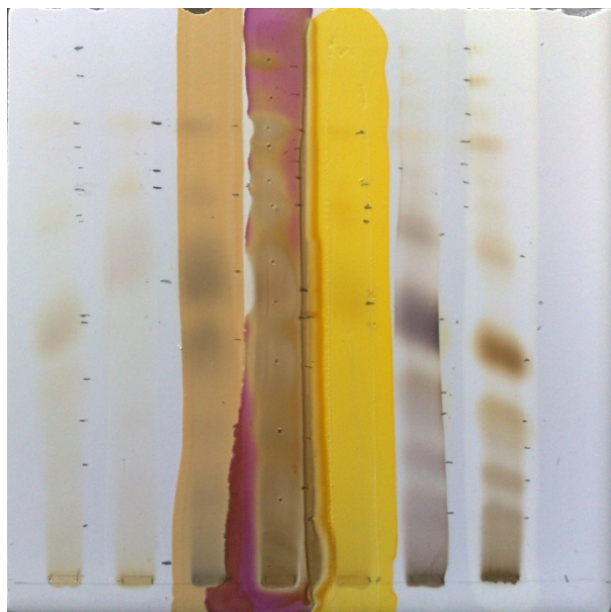
Presión ambiente



**Tabla 12.** R<sub>f</sub>'s derivados en los grupos químicos de metabolitos secundarios obtenidos en la cromatografía de placa fina con el extracto de hexano.

R <sub>f</sub>	Control UV 365 nm	Flavonoides	Fenoles	Carbonos insaturados	Alcaloides	Terpenos	Control
0.87							*
0.73				*		*	
0.69							*
0.66	*			*			
0.62	*	*		*	*	*	*
0.61						*	
0.58	*	*	*	*	*	*	*
0.55						*	
0.53							*
0.51				*			*
0.49	*						
0.47	*					*	*
0.44	*			*		*	
0.41							*
0.39	*					*	
0.38	*						*
0.34	*					*	
0.33	*	*		*		*	*
0.26		*					
0.24	*			*	*	*	
0.22							*
0.16							*
0.13				*		*	*
0.11	*	*				*	
0.06	*		*	*		*	*
0.04	*					*	
0.02				*			
0	*		*			*	*

## Acetato de Etilo



**Figura 15.** Cromatograma del extracto de acetato de etilo.

Fase estacionaria: sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub>

Fase móvil: hexano-acetato de etilo 5:5

Temperatura ambiente

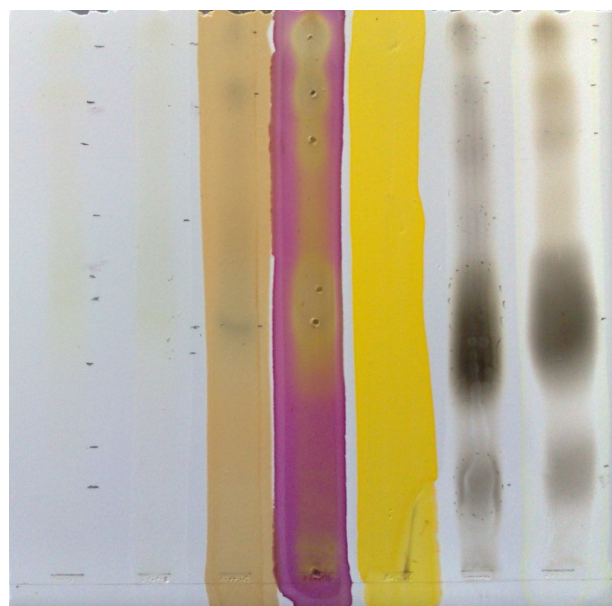
Presión ambiente

**Tabla 13.** R<sub>f</sub>'s derivados en los grupos químicos de metabolitos secundarios obtenidos en la cromatografía de placa fina con el extracto de acetato de etilo.

R <sub>f</sub>	Control UV 365 nm	Flavonoides	Fenoles	Carbonos insaturados	Alcaloides	Terpenos	Control
0.94							*
0.89	*			*			*
0.83	*			*			*
0.78	*	*	*	*	*		*
0.74	*			*		*	*
0.73	*						*
0.69	*	*		*	*		*
0.65	*	*	*	*	*	*	*
0.62					*		
0.55				*			
0.51	*	*	*			*	*
0.48				*	*		

0.45	*						
0.38			*	*			
0.37	*					*	*
0.34						*	*
0.26				*		*	
0.24	*		*				
0.16	*		*				*
0.14				*			
0.11	*					*	*
0.03		*					
0			*		*		

Metanol



**Figura 16.** Cromatograma del extracto de metanol.

Fase estacionaria: sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub>

Fase móvil: propanol-etanol-agua 7:1:1

Temperatura ambiente

Presión ambiente

**Tabla 14.** R<sub>f</sub>'s derivados en los grupos químicos de metabolitos secundarios obtenidos en la cromatografía de placa fina con el extracto de metanol.

R <sub>f</sub>	Control UV 365 nm	Flavonoides	Fenoles	Carbonos insaturados	Alcaloides	Terpenos	Control
0.95			*				*
0.93	*	*		*		*	*
0.84			*	*		*	*
0.82	*	*					
0.76	*			*		*	*
0.62	*	*				*	
0.5				*			
0.44	*	*	*	*		*	*
0.39	*	*					

0.36	*						
0.23	*						
0.17	*					*	*
0				*			

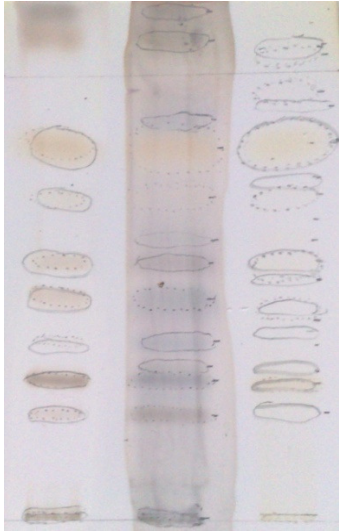
En la tabla 15 se observa que se extrajo el mismo número de flavonoides con los tres disolventes utilizados. En cuanto los fenoles, se extrajeron en mayor cantidad con acetato de etilo. El extracto de hexano presentó la mitad del número de alcaloides que presentó el extracto de acetato de etilo. Los terpenos se extrajeron principalmente con hexano. Éstos fueron el grupo químico que se presentó en mayor cantidad.

En general, de los tres extractos probados, el extracto con hexano fue con el que se extrajo la mayor diversidad de compuestos y el extracto con metanol fue el que tuvo mayor rendimiento.

**Tabla 15.** Número de bandas registradas para los diferentes grupos químicos de metabolitos secundarios en los extractos de la raíz de *Ligusticum porteri*.

Extracto obtenido con	GRUPOS QUIMICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS					
	Número de bandas					
	Flavonoides	Fenoles	Carbonos insaturados	Alcaloides	Terpenos	Total
Hexano	5	3	11	3	16	38
Acetato de etilo	5	7	11	6	7	36
Metanol	5	3	6	0	6	20
Total	15	13	28	9	29	94

Finalmente se realizó una cromatografía más con el extracto de hexano para comprobar la presencia de Z-ligustílida en la muestra de la raíz de *L. porteri* utilizada en la evaluación de toxicidad y genotoxicidad en *D. melanogaster* (tabla y figura 17).



**Figura 17.** Cromatograma realizado con el extracto de hexano.

Fase estacionaria: sílica gel Sigma 60F<sub>254</sub>

Fase móvil: tolueno- acetato de etilo- ácido acético glacial 90:10:1

Temperatura ambiente

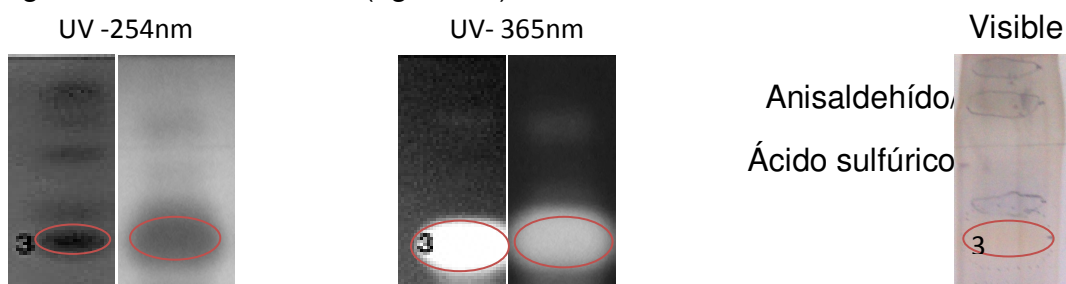
Presión ambiente

**Tabla 16.** R<sub>f</sub>'s obtenidos en la cromatografía de placa fina con el extracto hexánico.

R <sub>f</sub>	Control (Sulfato cérico)	Anisaldehído/ Ác. Sulfúrico	Control UV 365 nm
1.00	*	*	
0.95	*		
0.93		*	*
0.90			*
0.82			*
0.80			*
0.77		*	
0.72	*	*	*
0.64			*
0.60	*	*	*
0.53		*	
0.48	*	*	*
0.44			*
0.41	*	*	
0.39			*
0.35			*
0.33		*	
0.31	*		
0.28		*	*
0.26	*	*	
0.25			*
0.20	*	*	*

0.01	*	*	*
------	---	---	---

El cromatograma obtenido se comparó con los resultados del estudio de Zschocke, *et. al.* (1998), los cuales mostraron por medio de cromatografía en placa fina que los extractos de hexano se caracterizan por la presencia de *Z*-ligustílida. Zschocke, *et. al.* (1998) obtuvieron que *Z*-ligustílida se encuentra en un  $R_f=0.73$  y en la cromatografía que se realizó para confirmar la presencia de la ftálida se obtuvo un  $R_f=0.72$ ; sin embargo, ésta banda muestra todas las características mencionadas en el trabajo previo, es decir, *Z*-ligustílida se observa como una zona oscura azul en luz UV-245 nm, y como una zona dominante brillante fluorescente bajo luz UV-365 nm. Con la cromatografía también se comprobó la presencia de ácidos grasos insaturados (principalmente ácido linoleico), observados como una zona violeta con anisaldehído: ácido sulfúrico. Esta zona tiene un  $R_f= 0.26$ , y Zschocke, *et. al.* (1998), mencionan que la zona violácea puede encontrarse en el rango de  $R_f$  entre  $0.25\pm 0.4$  (figura 18).



**Figura 18.** Cromatogramas de placa fina del extracto hexánico de *Ligusticum porteri*. Los carriles A son los cromatogramas realizados por Zschocke, *et. al.* (1998); los carriles B son los cromatogramas realizados para confirmar la presencia de Z-ligustílida (número 3) y ácidos grasos insaturados (número 2). El número 1 representa coniferil ferulato, un compuesto que no se presentó en el cromatograma realizado en este trabajo.

## DISCUSIÓN

Una gran proporción de enfermedades humanas está asociada directa o indirectamente con un daño genético (Brusick *et al.*, 2008). El ser humano está expuesto a una gran variedad de sustancias que pueden ser tóxicas, genotóxicas o carcinógenas; por ello es preciso realizar pruebas de los múltiples y muy variados compuestos químicos y mezclas a los cuales está expuesto diariamente. En México, el uso y consumo de plantas sigue siendo un elemento importante de la medicina tradicional que ha sido empleada desde hace mucho tiempo por pueblos milenarios, razón por la cual existe un interés creciente tanto en los compuestos que las constituyen, y los cuales les confieren las propiedades atribuidas, como en los efectos reales que puedan tener sobre la salud humana. Algunos de los efectos adversos que pueden tener son la toxicidad y la genotoxicidad.

*Ligusticum porteri*, siendo una planta de gran importancia, no sólo en la medicina tradicional mexicana, sino también en Estados Unidos, y en otros lugares del mundo ha sido objeto de diversos trabajos de investigación. Hasta el 2004 no se habían reportado efectos secundarios ni contraindicaciones o precauciones al consumir la planta (Native American Botanic, 2004); sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que los extractos acuosos, forma en la que la mayoría de las personas consumen la planta, son tóxicos, pues se obtuvo una dosis letal media en la concentración del 5%, tanto para la infusión como para la decocción. Para la infusión se registró una mortalidad del 58% y para la decocción del 54% en larvas de tercer estadio ( $72 \pm 3h$ ) de la cruce ST de la Prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*. Estos resultados concuerdan con investigaciones anteriores, en las que también se ha registrado toxicidad en ratones y en *Artemia salina*. En el caso de los ratones se obtuvo una  $LD_{50}$  de 1085 mg/kg para los extractos de la raíz de *Ligusticum porteri*, por lo que la ubicaron dentro del grupo de las plantas tóxicas. En la prueba de letalidad con el ensayo de *Artemia salina*, los extractos fueron probados a 10, 100 y 1000  $\mu g/mL$  y, se obtuvo



que los valores de 436 a 778  $\mu\text{g/mL}$  tienen actividad citotóxica, exhibiendo una toxicidad débil (Déciga-Campos *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta la serie de ventajas que ofrece la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como sistema de prueba eucariótico de genotoxicidad y, considerando que SMART es un ensayo rápido, sensible, barato, de una sola generación y utiliza marcadores recesivos que se expresan en la superficie de las alas de las moscas adultas, parece ser el método de elección para la investigación inicial *in vivo* de compuestos químicos con actividad genotóxica y recombinogénica.

Un punto importante a considerar es que hay un alto nivel de conservación entre *Drosophila* y los humanos en muchos aspectos, no solo en dominios individuales y proteínas, sino también en complejos enteros y vías de múltiples pasos (St John y Xu, 1997), de forma que las pruebas de genotoxicidad en la mosca de la fruta son valiosas.

En el presente estudio se llevó a cabo un tratamiento de tipo crónico debido a que un tratamiento agudo sólo es efectivo con compuestos altamente mutagénicos. Los compuestos con actividad genotóxica débil pueden dar resultados falso-negativos si son probados sólo con una alimentación de tipo aguda (Graf *et al.*, 1989). En el caso de compuestos químicos y mezclas complejas de las que se desconoce su actividad genotóxica, es mejor recurrir a una alimentación de tipo crónica de 48 horas para que la prueba sea aún más sensible; tal es el caso de la infusión y decocción de *Ligusticum porteri*.

La genotoxicidad de infusiones herbales en diferentes sistemas de prueba, se encuentra bien documentada y, varios compuestos o grupos de compuestos pueden ser responsables de esta actividad (IARC, 1991). Estudios previos usando el ensayo de mutación y recombinación somáticas en ala de *Drosophila*, han demostrado que la actividad genotóxica de infusiones herbales puede ser detectada con este ensayo (van Schaik *et al.*, 1984); dados dichos antecedentes, se procedió a probar la genotoxicidad de los extractos acuosos de *L. porteri*

mediante el ensayo SMART. Los datos obtenidos sólo mostraron la presencia de manchas sencillas tipo *mwh*, las cuales pueden deberse a un evento de recombinación entre *mwh* y *flr<sup>3</sup>*, deficiencias, mutaciones puntuales y eventos de no-disyunción (Graf *et al.*, 1984). No se observó ninguna mancha gemela ni manchas sencillas *flr<sup>3</sup>* tanto en los tratamientos como en los testigos concurrentes, por ello, el programa SMART arrojó un resultado indeterminado.

Generalmente las manchas pequeñas son inducidas durante las últimas 1-2 rondas de división celular, las cuales ocurren en el estadio de pupa, cuando la alimentación ha finalizado; sin embargo, no es posible hacer una delimitación exacta (Graf *et al.*, 1984; Frei y Würigler, 1988). En los controles negativos (sin tratamiento) predominan las manchas pequeñas *mwh* y, ya que en las diferentes concentraciones utilizadas tanto para la infusión como para la decocción no se obtuvieron diferencias significativas respecto a los testigos negativos, como se puede apreciar en la gráfica 4, en la que ninguna concentración alcanza si quiera el doble de manchas que presentan los grupos testigo; se puede decir que los extractos acuosos no resultaron ser genotóxicos. La ausencia de manchas sencillas *flr<sup>3</sup>* y manchas gemelas puede relacionarse con estos resultados. Además, el alelo *flr<sup>3</sup>* usado en estos experimentos no se expresa completamente en clones más pequeños de cuatro células por clon (Graf *et al.*, 1984) y, el mayor número de manchas se encontró dentro de las tres primeras clases de tamaño.

No se puede hablar de que haya una correlación entre la dosis y el número de manchas que se presentan; sin embargo, es notable que la concentración del 1% es la que tuvo la mayor frecuencia de manchas en ambos tipos de extractos acuosos, pero paradójicamente es la concentración con el menor tamaño promedio del clon; esto se puede deber a que en concentraciones mayores, hay un incremento en la letalidad, como lo indican los resultados de las pruebas de toxicidad. En el caso de la concentración del 4% de la decocción se aprecia un incremento en el número de manchas con respecto a la concentración del 2%; sin embargo, ésta última presenta un tamaño promedio del clon mayor al de la concentración del 4%.

En las cromatografías de placa fina, se obtuvieron resultados positivos para la presencia de flavonoides, fenoles, alcaloides y terpenoides; casi todos los carbonos insaturados pueden pertenecer a alguno de estos grupos de metabolitos secundarios. En los casos en los que se presentan bandas con el mismo  $R_f$  en dos o más carriles, puede decirse que en esas bandas hay mezclas de compuestos que no lograron separarse.

Dos áreas de investigación en la ecología de las plantas, en las que los componentes secundarios de las plantas son importantes, son las interacciones planta-animal y planta-planta. Los problemas analíticos en ambos casos son difíciles debido a las limitadas cantidades de material biológico disponibles para el análisis fitoquímico (Harborne, 1984).

Numerosos factores físicos, químicos y biológicos, externos e internos, pueden afectar la producción de los metabolitos secundarios, tanto en calidad como en cantidad. Entre los factores más importantes se encuentran los siguientes:

1. Radiación
  - a) Cantidad de la luz: radiación ionizante, ultravioleta, roja y roja lejana
  - b) Intensidad de la luz
  - c) Fotoperiodo
2. Edad, estado fenológico y órgano de la planta.
3. Deficiencias minerales: nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, boro, calcio.
4. Temperatura
5. Estrés hídrico
6. Compuestos orgánicos diversos presentes en el medio
7. Factores genéticos
8. Interacciones bióticas intra e interespecíficas
9. Contaminantes sintéticos (Anaya–Lang, 2003).

Las presiones que estos factores ejercen sobre las plantas, se modifican en el tiempo y en el espacio creando condiciones complejas y heterogéneas y ocasionando que las plantas pongan en juego diversos mecanismos de

adaptación en la lucha por la sobrevivencia. Las adaptaciones bioquímicas de los organismos a los distintos factores ambientales están estrechamente relacionadas con las adaptaciones fisiológicas, y sin duda, es difícil distinguir entre unas y otras. Cualquier factor ambiental puede ser limitante o determinante de la síntesis de uno o varios metabolitos secundarios en una planta, ya que como organismos y como parte integral de un ecosistema, se ven sometidos a las acciones del conjunto de factores, bióticos y abióticos, y a su vez, ejercen sobre su entorno una acción determinada. Esto constituye una ley en ecología, la de las interrelaciones del organismo con su medio, del que depende directamente, así como las interacciones biológicas con otros organismos que comparten un ambiente determinado.

La estacionalidad también induce cambios en el metabolismo secundario, y existe en todo tipo de condiciones climáticas. La variación del tiempo puede afectar la capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis (temperatura, duración del día, nubosidad) y la disponibilidad de nutrimentos (lluvia y temperatura del suelo). Como los procesos de crecimiento vegetal se realizan en consonancia con la estacionalidad, es difícil separar la influencia de los procesos normales de desarrollo, del efecto de la variación climática sobre la biosíntesis del metabolismo secundario (Anaya–Lang, 2003); por ello, además de los factores antes indicados, también es importante mencionar que el contenido de compuestos químicos presentes en las plantas colectadas también depende de buenas prácticas de cosecha, así como tener presente cuál es el mejor momento para la realización de la misma y finalmente realizar una buena operación de secado y almacenaje.

El conjunto de todas las condiciones antes mencionadas explica que en muchos estudios fitoquímicos, los investigadores se encuentran con el caso de una inexplicable variación en el contenido de metabolitos secundarios de muestras de la misma especie.

Los grupos de metabolitos secundarios se pueden extraer con diversos disolventes de acuerdo tanto a las propiedades de éste, como a las propiedades de los metabolitos secundarios. Los disolventes polares, como el agua y el

metanol, son buenos para solvatar iones, pero los disolventes no polares, como el hexano y el acetato de etilo, son malos en su solvatación. La polaridad del disolvente se expresa en función de la polarización dieléctrica (constante dieléctrica) ( $P$ ), que mide la capacidad de un disolvente para funcionar como aislante de cargas eléctricas (McMurry, 2004).

Con el extracto hexánico fue con el que se extrajo la mayor diversidad de metabolitos secundarios, ya que se extrajeron terpenos en gran cantidad, así como tres alcaloides. Al incrementar la polarización dieléctrica, del hexano con una  $P=1.9$  al acetato de etilo con  $P=6$ , se redujo considerablemente el número de terpenos extraídos, sin embargo se extrajeron más compuestos fenólicos y se duplicó el número de alcaloides a seis. Con el metanol, el disolvente polar utilizado, con una  $P=33$ , el número de metabolitos secundarios se redujo en todos los grupos químicos, excepto en los flavonoides, en el que el número de compuestos se mantuvo constante en todas las extracciones.

En los extractos de metanol, se buscaba la presencia de alcaloides, ya que éstos se pueden extraer con alcoholes; sin embargo, la maceración con metanol no mostró ningún alcaloide, esto puede deberse a que se encuentran en una concentración muy baja, a que no están presentes o a que tienen una polaridad mayor.

Algunos alcaloides son terpenoides en naturaleza (Harborne, 1984), esta relación puede apreciarse muy bien en los  $R_f$ 's derivados de los extractos obtenidos con hexano y con acetato de etilo; en el primer caso se observa mejor la relación; sin embargo, desde el punto de vista biosintético algunos son más bien considerados como terpenoides modificados.

La familia Umbelliferae es una de las familias particularmente rica en aceites esenciales (Harborne, 1984) y, *Ligusticum porteri* no es la excepción, pues se ha reportado la presencia de varios terpenoides en la raíz (Delgado *et al.*, 1992; Cégiéla-Carlioz *et al.*, 2005). En el caso de las raíces de esta planta, su olor característico y penetrante se debe precisamente a la presencia de monoterpenos,

así como a los derivados de las ftálicas monoméricas y diméricas (Rios, 1996; Figueroa, 1997; Miyazawa *et al.*, 2004).

Estudios químicos de la raíz de *Ligusticum porteri* han permitido establecer la presencia de ftálicas monoméricas y diméricas para las cuales se tienen múltiples reportes de actividad biológica. Por todas las propiedades que se le han atribuido a los diversos compuestos que se han reportado en la raíz de *Ligusticum porteri*, es posible que los aceites esenciales presentes en infusión, que poseen un alto porcentaje de ftálicas, tengan una acción sinérgica entre ellos, dando como resultado la actividad biológica por la que la especie es conocida y utilizada (Goldhaber, 2008). Sin embargo, algunos compuestos, como Z-ligustílica, no pueden ser utilizados de manera pura, pues presentan una actividad altamente tóxica sobre *Artemia salina*.

Con estos reportes, y con los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad de los extractos acuosos de *Ligusticum porteri* en las larvas de tercer estadio de la craza ST de la prueba SMART en ala de *Drosophila melanogaster*, se puede decir que la toxicidad de los extractos no necesariamente se debe a que pueda haber presencia de alcaloides en dichos extractos, sino que más bien se puede deber a las ftálicas presentes en la raíz.

Plantas medicinales que presentan una gran proporción de ftálicas, como *Ligusticum porteri*, son de suma importancia, pues sus muy diversas propiedades les confieren una vasta utilidad en la salud humana.

## CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos de la raíz de *Ligusticum porteri* resultaron ser tóxicos con una dosis letal media en la concentración del 5%.
- La infusión tuvo un efecto letal en el 58% de la población, mientras que la decocción mostró dicho efecto en el 54%.

- El análisis estadístico no arrojó resultados de genotoxicidad en ninguna de las concentraciones probadas de ambos extractos acuosos con respecto al testigo concurrente.
- El grupo de metabolitos secundarios más abundante en los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, fue el de los terpenos.
- En los extractos obtenidos por maceración, se registró la presencia de alcaloides sólo en los extractos de hexano y de acetato de etilo. Siendo el agua un disolvente aún más polar que el metanol, se tiene la hipótesis de que en los extractos acuosos usados en las pruebas de toxicidad y genotoxicidad no hay presencia de alcaloides.
- La probable razón de la toxicidad de los extractos acuosos es la composición de diversas ftálicas; principalmente Z-ligustílica en la raíz.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Abbott, D. y Andrews, R. S. (1970). *Introducción a la cromatografía*. Alhambra. Madrid, España. 146 pp.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E. *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287: 2185-2195.
- Anaya – Lang, A. L. (2003). Metabolismo secundario. En: *Ecología Química*. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. México. 35 - 76 p.
- Andrade C., A. y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 325–348.
- Anonymous. 2000. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Tenth meeting of the Plants Committee. Species proposals for the 12th meeting of the Conference of the Parties: *Ligusticum porteri*.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila a laboratory handbook*. Cold Spring harbour laboratory press. New York. 139-271 p.
- Baars, A.J., Blijleven, W. G. H., Mohn, G. R., Natarajan, A. L. y Breimer, D. D. (1980). Preliminary studies on the ability of *Drosophila* microsomal preparations to activate mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 72: 257-264.



- Bentley, K. W. (1957). Introduction. En: *The Alkaloids*. Interscience Publishers, Inc. Nueva York. 1-9 p.
- Brusick D. (1987). Origins of Genetic Toxicology. En: *Principles of genetic toxicology*. Plenum Press. New York and London. 2°ed. 1-12 p.
- Brusick, D. J., Wanda, R. F., Brian, C. M. y Doolittle D. J. (2008). Genetic Toxicology. En: Wallace-Hayes, A. *Principles and Methods of Toxicology*. Informa Healthcare. Nueva York. 5°ed. 1179-1221 p.
- Bye R., Linares E. y Estrada E. (1995). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press. New York. 65-82 p.
- Cairns, J. (1981). The origin of human cancers. *Nature*. 289: 353-357.
- Cao, Y. Z., Zhang, W., He, J. Y., He, L. C. y Xu, C. B. (2006). Ligustilide induces vasodilatation via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx and release. *Vascular Pharmacology*. 45: 171-176.
- Cégiéla-Carlio, P., Bessiere, J. M., David, B., Mariotte, A. M., Gibbons, S. y Dijoux-Frnc M. G. (2005). Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Stahylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour and Fragrance Journal*. 20:671-675.
- Chan, S. S., Cheng, T. Y. y Lin, G. (2007). Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(3): 677-680.

- Clayson, D. B., Munro, I. C., Shubik, P., y Swenberg, P. (1990). Toxicity testing: strategies and conduct. En: *Progress in Predictive Toxicology*. Elsevier Science Publishers B. V. The Netherlands. 15-39 p.
- Cronquist, A., Holmgren, N.H. y Holmgren, P.K. (1997). Part A. Subclass Rosidae (except Fabales) En: *Intermountain Flora. Vascular Plants of the Intermountain West*. Vol. 3. The New York Botanical Garden Bronx. New York. USA. 340-341 p.
- Crowden, R. K., Harborne, J. B. y Heywood, V. H. (1969). Chemosystematics of the Umbelliferae – A general survey. *Phytochemistry*. 8: 1963-1984.
- Curtin, L. S. M. (1976). *Healing Herbs of the Upper Río Grande*. Arno Press, Nueva York. 281 pp.
- Dearfield, K. L., Cimino, M. C., McCarrol, N. E., Mauer, I., y Valcovic, L. R. (2002). Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res.*, 521: 121-135.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A. y Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 110: 334-342.
- Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Toscano, R. A., Bye R. A. y Linares, E. (1988). Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri*

(Umbelliferae). X-Ray structure of Z-6.6'-7.3<sup>ab</sup>-diligustilide. *Heterocycles* 27(6): 1305-1312.

- Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Ríos, M. Y. y Del Río, F. (1992). Phtalides and monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Medica*. 58: 570-571.
- Domínguez S., X. A. (1975). *Cromatografía en papel y en capa delgada*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos Washington, D. C. 79 pp.
- Du, J., Bai, B., Kuang, X., Yu, Y., Wang, C., Ke, Y., Xu, Y., Tzang, A. y Qian, Z. M. (2006)a. Ligustilide inhibits spontaneous and agonists- or K<sup>+</sup> depolarization-induced contraction of rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*. 108(3): 54-58.
- Du, J., Yu, Y., Ke, Y., Wang, C., Zhu, L. y Qian, Z. M. (2007). Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 211-214.
- Du, J., Yu, Y., Yao, Y., Bao, B., Zong, X., Lei, Y., Wang, C. Y. y Qian, Z. M. (2006)b. Ligustilide reduces phenylephrine induced-aortic tension in vitro but has no effect on systolic pressure in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Chinese Medicine*. 35(3): 487-496.
- Edwards, D. I. (1975). *Cromatografía: Principios y técnicas*. El Manual Moderno. S. A. México, D.F. 93 pp.

- Felger, R. S., Nabhan, G. P. y Bye, R. (1997). The Apachian/Madreal Region of southwestern North America as a Center of Plant Diversity. En: Davis, S. D. *et al. Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for their Conservation. Vol. III. The Americas.* World Wide Fund for Nature and International Union for Conservation and Nature. IUCN Publications Unit. Cambridge, U.K. 172-180 p.
- Felger, R. S. y Wilson, M.F. (1995). Northern Sierra Madre Occidental and its Apachian outliers: a neglected center of biodiversity. En: DeBano, L.F., Folliott, P.F. y Hamre, R.H. *Biodiversity and Management of the Madreal Archipelago: the Sky Islands of the Southwestern United States and Northwestern Mexico.* USDA Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station. Fort Collins, Colorado. 36-59 p.
- Figueroa, R. (1997). Derivatización química del Z-ligustilido, un metabolito bioactivo de *Ligusticum porteri*, para su evaluación biológica. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Francis, G. W. y Andersen, Ø. M. (2003). Natural Pigments. En: Sherma, J. y Fried, B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography.* Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 3° ed. 697-732 p.
- Frei, H., Clements, J., Howe, D. y Würigler, F. E. (1992). The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 279: 21-33.
- Frei H. y Würigler F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation. Res.* 203: 297-308.

- Frei H. y Würigler F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Env. Mutag.* 334: 247-258.
- Frei H. y Würigler F. E. (1996). Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis.* 11: 325-325.
- Geiss, F. (1987). Chapter IV: Sorbents and their activity. En: *Fundamentals of Thin Layer Chromatography (Planar Chromatography)*. Dr. Alfred Hüthig Verlag Heidelberg. Germany. 185-246 p.
- Gibbons, S. y Gray, A. I. (1998). Isolation by planar Chromatography. En: Cannell, R. J. P. *Natural Products Isolation*. Humana Press. Totowa, Nueva Jersey. 209-245 p.
- Gilbert S. F. (2003). Metamorphosis, regeneration, and aging. En: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 7ª ed. 575-612 p.
- Goldhaber P., G.D. (2008). *Inducción de cultivos in vitro de Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-Ligustílida*. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia.* 51: 168-173.

- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A. J. y Würgler, F. E. (1989). Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 222: 359-373.
- Graf, U., Heo, O. y Olvera Ramirez, O. (1992). The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutat. Res.* 266:197-203.
- Graf, U., Suresh, K. A., Guzmán R., J. y Würgler, F.E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 402:203-208.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., y Kale, P.G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Env. Mutag.* 6: 153-188.
- Guzmán-Rincón, J., Espinosa, J. y Graf, U. (1998). Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 412: 69-81.
- Guzmán-Rincón, J. y Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En: Butterworth, F. M. *Biomonitoring and Biomarkers of Environmental Change*. Plenum Press. Nueva York. 169-181 p.
- Hällström, I. (1987) Genetic variation in cytochrome P-450-dependent demethylation in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2279-2282.

- Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall. 2<sup>o</sup>ed. 288 pp.
- Harborne, J. B. y Baxter, H. (1999). Introduction. En: *The Handbook of Natural Flavonoids*. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra. Vol. 1. vii-xiii p.
- Heimbegner, J. L., Beck, C. E. y Beck, J. J. (2004). Antibacterial activity of several benzylidenephthalide derivates. *Journal of Undergraduate Chemistry Research*. 4: 141-143.
- Hernández, L. (1996). Aislamiento y caracterización de los constituyentes químicos del extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Hernández-Vázquez, L. (1999). Reactividad química de Toquinolida B, una ftálica dimérica aislada de *Ligusticum porteri*. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. y Marston, A. (1986). Planar Chromatography. En: *Preparative Chromatographye Techniques. Applications in Natural Product Isolation*. Springer-Verlag. Germany. 6-18 p.
- IARC (1991). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 51. Coffe, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal*. International Agency for Research on Cancer. Lyon. 513 p.
- Kobayashi, S., Mimura, Y., Naitoh, T., Kimura, I. y Kimura, M. (1993). Chemical structure-activity of Cnidium rhizome-derived phthalides for the

competence inhibition of proliferation in primary cultures of mouse aorta smooth muscle cells. *Japanese Journal of Pharmacology*. 63: 353-359.

- Kuang, X., Du, J. R., Liu Y. X., Zhang, G. Y. y Peng, H.Y. (2007). Postischemic administration of Z-ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 88(3): 213-221.
- Kuang, X., Yao, Y, Du, J. R., Liu, Y. X., Wang, C. Y. y Qian, Z. M. (2006). Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Research*. 1102: 145-153.
- Liang, M. J. y He, L. C. (2006). Inhibitory effects of ligustilide and butylidenephthalide on bFGF-stimulated proliferation of rat smooth muscle cells. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 41(2): 161-165.
- Liang, M. J., He, L. C. y Yang, G. D. (2005). Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum chuanxiong*. *Life Sciences*. 78: 128-133.
- Lin, G., Chan, S. S., Chung, H. S. y Li, S. L. (2005). Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. En: Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 32. Part 12. Bioactive Natural Products (part L). Elsevier B. V. 611-669 p.
- Lin, L. Z., He, X. G., Lian, L. Z., King W. y Elliot, J. (1998). Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical change of Z-ligustilide. *Journal of Chromatography A*. 810: 71-79.



- Lindsey, A. H. (1984). Reproductive Biology of Apiaceae. I. Floral Visitors to *Thaspium* and *Zizia* and Their Importance in Pollination. *American Journal of Botany* 71(3) 375-387.
- Lindsley, D. L. y Zimm, G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Vol.2, Academic press. San Diego, California.
- Linares, E. y Bye, R.A. (1986). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. 19: 153-183.
- Lu, Q., Qiu, T. Q. y Yang, H. (2006). Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation. *European Journal of Pharmacology*. 542: 136-140.
- Mabberley, D. J. (1997). *The Plant Book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press. 2° ed. 874 pp.
- Magnusson, J. y Ramel, C. (1990). Inhibitor of poly (ADP-ribose) transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells *in vivo* in *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. 5: 511-514.
- Marec, F. y Gelbic, I. (1994). High recombinogenic activities of three antiviral agents, adenine derivates, in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 311: 305-317.
- Martin, P. S., Yetman, D. Fishbein, M., Jenkins, P., Van Devender, T., Wilson, R. K. (1998). *Gentry's Rio Mayo Plants*. University of Arizona Press, Tucson. 558 pp.

- Matsumoto, K., Kohno, S. I., Qjima, K., Tezuka, Y., Kadota, S. y Watanabe, H. (1998). Effect of methylenechloride-soluble fraction of Japanese angelica root extract, ligustilide and butyldenephthalide, on pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice. *Life Sciences*. 62(23): 2073-2082.
- McMurry, J. (2004). Reacciones de los halogenuros de alquilo: sustituciones nucleofílicas y eliminaciones. En: *Química orgánica*. International Thompson Editores, S. A. 6ª ed. México. 343 - 392 p.
- Meepagala, K. M., Sturtz, G., Wedge, D. E., Schrader, K. K. y Duke S. O. (2005). Phytotoxic and antifungal compounds from two Apiaceae species, *Lomatium californicum* and *Ligusticum hultenii*, rich sources of Z-ligustilide and apiol, respectively. *Journal of Chemical Ecology*. 31(7): 1567-1578.
- Miyazawa, M., Tsukamoto, T., Anzai, J. e Ishikawa, Y. (2004). Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:4401-4405.
- Mollet, P. y Würigler, F. E. (1974). Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*. A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Res*. 25:421-424.
- Moore, J. A., Dalrymple, D. L. y Rodig O. R. (1982). *Experimental methods in Organic Chemistry*. Saunders College Publishing. USA. 3ª ed. 368 pp.
- Muller, H. J. (1927). Artificial transmutation of the gene. *Science*. 66: 84–87.

- Peng, H. Y., Du, J. R., Zhang, G. Y., Kuang, X., Liu, Y. X., Qian, Z. M. y Wang, C.Y. (2007). Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30(2): 309-312.
- Popl, M., Fähnrich, J. y Tatar, V. (1995). Classification of Alkaloids. En: *Chromatographic Analysis of Alkaloids*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 1-24 p.
- Prasad, N. G. y Joshi, A. (2003). What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of Genetics*. 82:45-76.
- Randerath, K. (1969). *Cromatografía de capa fina*. URMO. Bilbao, España. 291 pp.
- Reza-Garduño, R. G. (1987). Aislamiento y caracterización de los ftálicos de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae). Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Rios, M. Y. (1996). Aproximaciones sintéticas y correlaciones químicas de cicloaductos naturales diméricos derivados del Z-ligustílido. Tesis Doctoral. UNAM. México.
- Robbins, C. (1999). *Medicine from U.S. Wildlands: An assessment of native plant species harvested in the United States for medicinal use and trade and*

evaluation of the conservation and management implications. TRAFFIC North America, The Nature Conservancy.

- Rodriguez-Arnaiz, R., Orozco-Soto, P., Gaytán-Oyarzún, J.C. y Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 351: 133-146.
- Rodriguez-Arnaiz, R. y Ramos-Morales, P. (1992). *Drosophila como sistema para detectar agentes genotóxicos*. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias. UNAM. México. 50 pp.
- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 287: 2204-2215.
- Smith, I. y Feinberg, J. G. (1979). Sección tercera: Cromatografía en placa fina. En: *Cromatografía sobre papel y capa fina. Electroforesis*. Alhambra. 179-233 p.
- Spanó M. A., Frei H., Würigler F. E., y Graf U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*. 16(5):385-394.
- St John, M. A. R. y Xu, T. (1997). Insights from model systems. Understanding human cancer in a fly. *Am. J. Genet.* 61:1006-1010.
- Stoleson, S. H., Felger, R. S., Ceballos, G., Raish, C., Wilson, M. F. y Búrquez, A. (2005). Recent history of natural resource use and population

growth in northern Mexico. En: Cartron, J.-L., Ceballos, G. y Felger, R. S. *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*. Oxford University Press. Nueva York. 52-86 p.

- Tao, J. Y., Ruan, Y. P., Mei, Q. B., Liu, S., Tian, Q. L., Chen, Y. Z., Zhang, H. D. y Duan, Z. X. (1984). Studies on the antiasthmatic action of ligustilide of Dang-Gui, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 19(8): 561-565.
- Timbrell, J. A. (1991). Introduction; Dose-response relationships. En: *Principles of Biochemical Toxicology*. Burgess Science Press, Basingstoke, Hants. Great Britain. 2°ed. 1-25 p.
- Tsukamoto, T., Ishikawa, Y. y Miyazawa, M. (2005). Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 5549-5553.
- Tyman, J. H. (2003). Phenols, Aromatic Carboxylic Acids, and Indoles. En: Sherma, J. y Fried, B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 3° ed. 865-911 p.
- UNEP-ICPEMC; Brusick, D. J., Gopalon, W. B., Hesletine, E., Huismans, J. W., y Lohman, P. H. M. Eds. (1992). *Assessing the Risk of Genetic Damage*. Hodder & Stoughton, London.
- University of Maryland Program in Sustainable Development and Conservation Biology. (1999). Draft Proposal to list *Ligusticum porteri* in

Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Submitted to the U.S. Fish & Wildlife Service Office of Scientific Authority.

- UpS. (2007). United Plant Savers “At Risk” & “To Watch” List.
- van Schaik, N., Grant, A., Rubenchik, I. y Graf, U. (1984). Use of *Drosophila* test systems for genotoxicity testing of herbal teas. *Immunology and Hematology Research*. 3: 199-202.
- Vogel, E. W., Graf, U., Frei, H. y Nivard, M. M. J. (1999). The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. En: McGregor, D. B., Rice, J. M. y Venitt, S. *The Use carcinogenic Hazard Evaluation of Short-and-Medium-term Test for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation*. IARC Scientific Publications no.146. IARC. Lyon. 427-470 p.
- Wagner, H., Blatt, S. y Zgainski, E. M. (1984). *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. 320 pp.
- Walter, K. S. and H. J. Gillett. (1998). 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN—The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Welsh, S. L. (1993). *A Utah Flora*. Brigham Young University. Provo, Utah. 986 pp.

- Wilson, M. F. May (2007). Medicinal Plant Fact Sheet: *Ligusticum porteri* / Osha. A collaboration of the IUCN Medicinal Plant Specialist Group, PCA-Medicinal Plant Working Group, and North American Pollinator Protection Campaign. Arlington, Virginia
- Wilson, M. F. and Felger, R. S. (2003). In prep. *A Desert Pharmacopeia: The Medicinal Plants of Southwestern North America*.
- Yu, Y., Du, J.R., Wang, C. Y. y Qian, Z. M. (2008). Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells. *Experimental Brain Research*. 184: 307-312.
- Zschocke, S., Liu, J-H., Stuppner, H. y Bauer, R. (1998). Comparative Study of Roots of *Angelica sinensis* and Related Umbelliferous Drugs by Thin Layer Chromatography, High-Performance Liquid Chromatography, and Liquid Chromatography– Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 9: 283–290.

#### REFERENCIAS ELECTRÓNICAS:

- Australian New Crops Web Site:  
[http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/species\\_pages\\_L/Ligusticum\\_porteri.htm](http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/species_pages_L/Ligusticum_porteri.htm)
- Native American Botanic, 2004: [www.nativeamericanbotanics.com](http://www.nativeamericanbotanics.com)
- [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- <http://pick4.pick.uga.edu/mp/20m?r=.125&la=34.5&lo=-99&kind=Ligusticum+porteri>

## **ANEXOS**

### **Extracción**

La extracción es el término general para recuperar una sustancia de una mezcla poniéndola en contacto con un disolvente que disuelve el material deseado. La mezcla inicial puede ser sólida o líquida (Moore *et al.*, 1982).

El clásico procedimiento químico para obtener los compuestos orgánicos a partir de tejido de plantas secas es realizar maceraciones continuas del tejido fragmentado. El extracto obtenido es clarificado por filtración y posteriormente destilado en un rotaevaporador que va a concentrar disoluciones voluminosas en pequeños volúmenes (Harborne, 1984). La destilación es el proceso de calentar un líquido hasta su punto de ebullición, condensar el vapor resultante por enfriamiento y coleccionar el condensado en otro contenedor. Muchos líquidos orgánicos no pueden ser destilados a presión atmosférica debido a que la presión requerida causa descomposición. Esta dificultad puede superarse destilando a una presión menor. La presión de vapor de cualquier sustancia es una función de la temperatura, y a menor presión en el aparato de destilación, menor es el punto de ebullición (Moore *et al.*, 1982).

### **Cromatografía en placa fina**

Se denomina cromatografía a un procedimiento, en el cual una mezcla de sustancias a separar se desplaza en una dirección predeterminada por una disposición de aparatos, por medio de una materia sólida, insoluble, inorgánica u orgánica, más o menos finamente repartida, siendo retenidos los componentes en medida individualmente distinta (Randerath, 1969).

El proceso cromatográfico implica la distribución diferencial de un soluto o una sustancia adsorbible entre dos fases (Domínguez, 1975). Al medio de sostén se le llama fase estacionaria y, al disolvente revelador fase móvil o eluyente (Edwards, 1975).

Las bases modernas de la cromatografía en placa fina (TLC= thin layer chromatography) se deben a los extensos estudios de Stahl en 1956, quien fue el primero en desarrollar una técnica práctica de laboratorio para producir capas delgadas, uniformes, de diversas materias pulverizadas sobre láminas de vidrio (Smith y Feinberg, 1979). Las capas finas



preparadas sobre vidrio se denominan cromatoplasmas o simplemente placas (Abbott y Andrews, 1970).

El término capa fina fue introducido para significar que se aplicaba una capa de un material pastoso a una hoja de vidrio y que esta capa tenía un espesor aproximado de  $250\mu$ , con lo que se distinguía esta técnica de la cromatografía en papel (Smith y Feinberg, 1979). En el trabajo preparatorio se han usado capas de 2 a 10mm de espesor y, en vez de vidrio, se han empleado láminas de metal o de plástico (Smith y Feinberg, 1979).

El principio involucrado en la separación de sustancias por la cromatografía en placa fina incluye tanto efectos de fragmentación como de adsorción. Se llama efecto de fragmentación a la distribución de un soluto entre dos o más disolventes que no se mezclan. En la cromatografía en placa fina ocurren dichos efectos de fragmentación. Se puede obtener una fragmentación completa si se permite al soluto equilibrarse entre las fases estacionaria y móvil. Si esto no sucede no será buena la separación y las manchas tenderán a rayar o colorear (Edwards, 1975).

La adsorción se lleva a cabo cuando hay una concentración más alta en la superficie de un sólido que en la disolución circundante. Es totalmente un fenómeno de superficie y no debe confundirse con la absorción que es la entrada de una sustancia en el cuerpo de otra. La adsorción como contraste se refiere al enlace de una sustancia a la superficie de otra. Las separaciones se llevan a cabo sobre adsorbentes porque se crea un equilibrio entre el adsorbente y las moléculas de la fase móvil. Los componentes de la mezcla fuertemente adsorbidos estarán retardados, mientras que las sustancias mal adsorbidas se mueven más rápidamente con el disolvente móvil (Edwards, 1975).

La cromatografía en placa fina es un instrumento capaz de separar ácidos grasos vinculados entre sí. Otra de las ventajas de este tipo de cromatografía es que puede llevarse a cabo sobre capas delgadas de una amplia variedad de materiales inorgánicos pulverizados, como gel de sílice, celita y alúmina y sobre sustancias orgánicas como celulosa y celulosas modificadas químicamente. Se desprende de aquí que es posible elegir una capa de determinado material que sea más idóneo que el resto para el grupo de compuestos que se quiere separar (Smith y Feinberg, 1979). La capa de sílica gel ha

sido una de las más empleadas. Químicamente la superficie de sílica es probable que contenga las siguientes especies: a) grupos siloxanos (-Si-O-Si-); b) grupos silanoles libres -Si(OH)- Si(OH)-; c) agua hidrogenada unida a grupos silanoles; y d) agua granel (Geiss, 1987).

Las propiedades particulares de la cromatografía en placa fina permiten desarrollar el fraccionamiento en un periodo de tiempo mucho menor, pues la resolución es buena. Con esta técnica pueden realizarse separaciones por reparto, filtración sobre gel, adsorción e intercambio iónico (Abbott y Andrews, 1970; Smith y Feinberg, 1979). Las manchas, en general, son más compactas; se pueden separar y recuperar con facilidad cantidades extraordinariamente pequeñas (de orden inferior al microgramo); los reactivos de revelado fuertemente corrosivos, como el ácido sulfúrico, pueden ser pulverizados sobre las láminas de sílice y de albúmina sin afectar al revestimiento; y la capa se puede raspar con una espátula fina para recuperar, por elución, el contenido de una mancha o de una banda (Smith y Feinberg, 1979).

La muestra es disuelta en una pequeña cantidad de disolvente antes de la aplicación a la placa. Se prefiere un disolvente volátil (hexano, diclorometano, etil acetato), ya que con disolventes menos volátiles puede haber problemas de ensanchamiento de las bandas. Se pueden usar una gran variedad de disolventes: disolventes puros de las series elutrópicas (series con poder de elución creciente) (Randerath, 1969), mezclas de disolventes y también disolventes totalmente acuosos, totalmente orgánicos, acuoso-orgánicos e iónicos. Si un disolvente puro no separa bien la mancha, se ensayan mezclas de disolventes que contengan uno que la desplace demasiado y otro que no la mueva. Al usar mezclas de disolventes, conviene recordar que pequeñas variaciones en composición pueden cambiar mucho los valores de  $R_f$ , así como también la resolución de la separación. En el estudio de productos naturales o de productos farmacéuticos conviene correr cromatografías del material usando mezclas en diferente proporción de los mismos disolventes (Domínguez, 1975). La concentración de la muestra debe ser de 5-10%. La muestra de la disolución que contiene la mezcla cuyas sustancias se quieren separar es aplicada como una banda, la cual debe ser tan estrecha como sea posible, debido a que la separación depende de la anchura de ésta (Hostettmann *et al.*, 1986). Una vez aplicada la muestra, se deja secar y posteriormente el extremo de la placa más

próximo a la mancha se introduce en un disolvente apropiado para su elución, pero sin que la mancha llegue a introducirse en él, de manera que éste ascienda durante el tiempo preciso, después de lo cual la lámina es retirada y secada de nuevo. Entonces se observan las sustancias, ya sea directamente, o, si son incoloras, rociando la placa con un revelador (Smith y Feinberg, 1979). La localización de las bandas se facilita con el indicador fluorescente y con la absorción de luz UV por los diferentes compuestos. Sin embargo uno de los problemas con los indicadores es que reaccionan con los ácidos, ocasionalmente incluso reaccionan con el ácido acético (Hostettmann *et al.*, 1986).

El comportamiento migratorio de una sustancia se describe en función de la relación de frente ( $R_f$ ). Es decir, el cociente de la distancia recorrida por la mancha de la sustancia y la distancia recorrida, al mismo tiempo, por el disolvente (Domínguez, 1975).

Una visualización o detección efectiva es crucial para obtener compuestos puros y, una detección pobre puede dar como resultado una baja recuperación del producto que se encuentra en el adsorbente. La detección puede ser no destructiva, por medio de detección UV por ejemplo, o destructiva, mediante la cual, los compuestos son contaminados por la adición de un revelador (Gibbons y Gray, 1998). Los principales grupos de metabolitos secundarios se pueden detectar de la siguiente forma:

➤ Flavonoides

- Sin tratamiento químico

UV-254 nm: Todos los flavonoides causan opacamiento de la fluorescencia.

UV-365 nm: Dependiendo del tipo estructural, los flavonoides fluorescen amarillo, azul o verde. La intensificación o una diferenciación mayor de la fluorescencia en luz UV-365nm se puede lograr por el uso de varios tipos de reveladores.

Los extractos de flavonoides frecuentemente contienen otros materiales, como ácidos vegetales y cumarinas, las cuales forman zonas fluorescentes azules (Wagner, 1984).

➤ Fenoles

- Sin tratamiento químico

Los pigmentos fenólicos son coloridos y, de esta forma fácilmente monitoreados durante su aislamiento y purificación. Todos los compuestos fenólicos son aromáticos, por lo que muestran absorción intensa en la región UV del espectro. Además, los compuestos fenólicos exhiben cambios batocrómicos en sus espectros en la presencia de álcalis (Harborne, 1984).

- Con Cloruro Férrico

La disolución al 1% de cloruro férrico en etanol da manchas azules, rojas, verdes y marrón. Este compuesto también es usado para detectar flavonoides (Domínguez, 1975).

➤ Compuestos insaturados

- Con Permanganato de potasio

La aspersion con solución alcalina de sosa de permanganato potásico 0.1N, da manchas amarillas sobre fondo rojo violeta. Este compuesto también es usado para detectar fenoles “sencillos” (Randerath, 1969).

➤ Alcaloides

- Sin tratamiento químico

UV-254 nm: Muchos alcaloides muestran un oscurecimiento pronunciado de la fluorescencia en luz UV-254 nm (ej. Estricnina, brucina, purinas).

UV-365 nm: Algunos alcaloides fluorescen azul o amarillo en luz UV-365 nm (Wagner, 1984).

- Con el reactivo de Dragendorff (DRG)

Éste es el método tradicional para la detección de alcaloides, aunque debe tenerse cuidado, pues algunos compuestos que no son alcaloides, como iridoides y algunos flavonoides dan una reacción positiva. Los alcaloides dan una coloración oscura de naranja a roja. Generalmente no requiere calentarse, aunque en ocasiones hay que calentar un poco a 100°C hasta que haya coloración (Gibbons y Gray, 1998).

Las zonas de alcaloides pueden verse distintas si se rocía primero con Dragendorff y después con solución nitrito de sodio 5% o ácido sulfúrico etanólico 5% (Wagner, 1984).

➤ Terpenoides

- Sin tratamiento químico

UV-254 nm: Sustancias con sistemas de uniones dobles conjugadas muestran opacamiento de fluorescencia.

UV-365 nm: La mayoría no tienen fluorescencia específica (Wagner, 1984).

- Con el reactivo de Liebermann-Burchard (LB)

La placa TLC es rociada con la solución recién preparada, se calienta por 10 minutos a 100 °C y se observa en luz UV-365 nm o en luz visible.

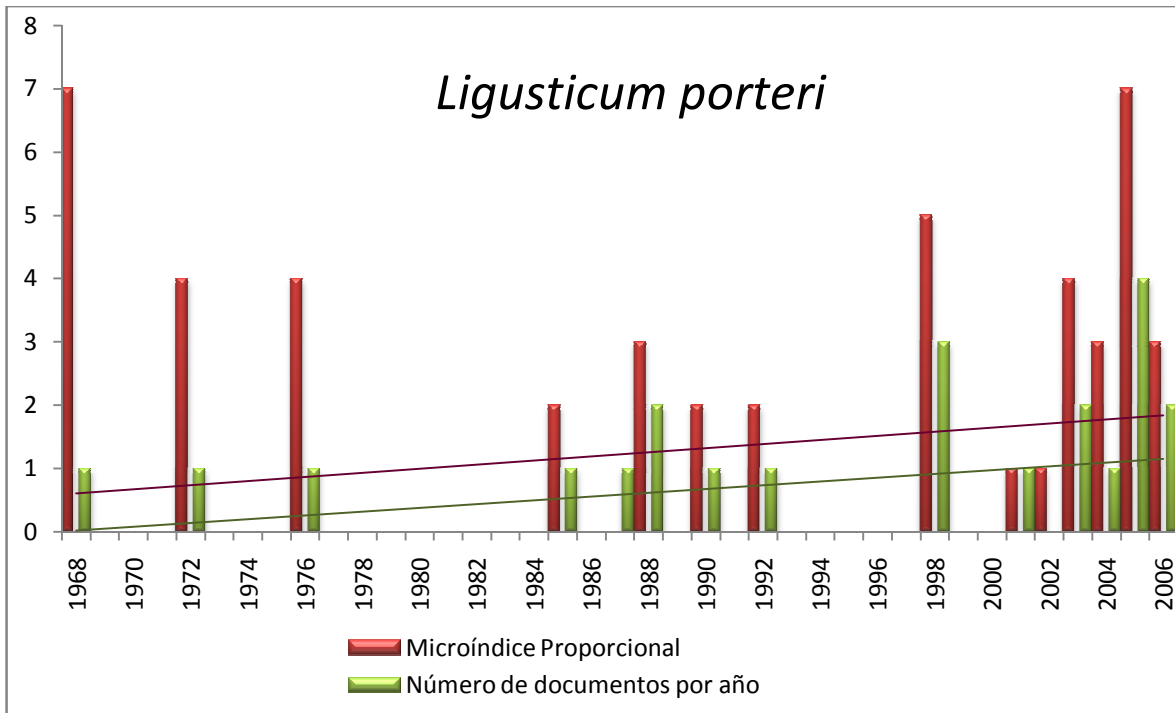
Absintina= color arena en luz UV-365 nm; café oscuro en luz visible.

Cnicina= gris luminoso en luz UV-365 nm; gris claro en luz visible (Wagner, 1984).

Con esta reacción también se observan esteroides y las manchas son azules, verdes, rosa-violáceas o grises (Domínguez, 1975).

### **Popularidad de *Ligusticum porteri***

La figura 19, muestra que la popularidad de esta planta medicinal no es reciente y que ha ido incrementándose con el paso de los años. *L. porteri* es una planta de gran interés debido a las variadas propiedades que se le atribuyen.



**Figura 19.** Popularidad de *Ligusticum porteri* en el tiempo. Se muestra el número de documentos que mencionan a *Ligusticum porteri* desde el año 1968 al 2006, así como su línea de tendencia. También se presenta el microíndice proporcional, que es la proporción de documentos que han mencionado a *Ligusticum porteri* a lo largo del tiempo y, su respectiva línea de tendencia. La escala se multiplica por un millón para obtener el número total de documentos publicados para ese año. Modificado de: Australian New Crops Web Site.