



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

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

**“Pruebas de calidad y eficacia de la droga cruda de *Poliomintha longiflora* A. Gray  
(Lamiaceae): una contribución a la elaboración de la monografía tipo OMS de uno de los  
oréganos mexicanos”**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M. EN C. ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ**



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Jurado asignado**

<b>Presidente:</b>	Dr. Alfredo Ortega Hernández
<b>Primer vocal:</b>	Dr. Robert Arthur Bye Bötler
<b>Segundo vocal:</b>	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
<b>Tercer vocal:</b>	Dr. Andrés Navarrete Castro
<b>Secretario:</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

### **Lugar donde se realizó el presente trabajo de investigación:**

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

**Tutora:**

---

Dra. Rachel Mata Essayag

**Sustentante:**

---

M. en C. Isabel del Carmen Rivero Cruz

## **Agradecimientos**

Este trabajo esta dedicado con mi más sincero agradecimiento y toda mi admiración a mi asesora: la Dra. Rachel Mata Essayag. Gracias por creer siempre en mi; por motivarme a realizar este trabajo de investigación; por no dejarme vencer y estar siempre conmigo apoyándome y resolviendo todos los obstáculos que se presentaron; pero principalmente, gracias por ser el artesano de mi vida académica, a quién le debo todo lo bueno que tengo y que podría llegar a ser. Dra. Rachel con todo mi cariño muchas gracias.

Al financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (99395 y 150966) y DGAPA (IN-218110) a cargo de la Dra. Rachel Mata, para el desarrollo de esta investigación.

Al programa de apoyo para la superación del personal académico (DGAPA-PASPA), Facultad de Química, por las facilidades y la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

De manera muy especial agradezco al Dr. Andrés Navarrete Castro, miembro de mi Comité Tutelar, por toda su valiosa asesoría para la realización de algunos de los ensayos farmacológicos del presente proyecto. Muchas gracias por todo su apoyo, amistad y por abrirme las puertas de su laboratorio.

A los Dres. Alfredo Ortega Hernández y Samuel Estrada Soto, miembros de mi Comité Tutelar Ampliado, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A los Dres. Alfredo Ortega, Robert Bye y Martha Macías, miembros del Jurado, quienes revisaron y enriquecieron el contenido de este manuscrito.

Al Dr. Robert Bye y a la M. en C. Edelmira Linares por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

A la M. en C. Georgina Duarte Lisci por su apoyo para la realización de los análisis de HS-SPME y CG-EM.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por su amistad y apoyo técnico proporcionado a lo largo del presente trabajo.



A los M. en C. Martha Leyte, Viridiana Morales, Sol Cristians, Fernando Brindis y Harry Ospina por su invaluable apoyo en la realización de los experimentos farmacológicos.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por sus valiosos consejos y sobre todo su paciencia, que indudablemente ayudaron a enriquecer desde un inicio este trabajo de investigación, de corazón muchas gracias.

Finalmente, y no menos importante, al Dr. Mario A. Figueroa Saldívar porque aún en la distancia y en contra de las adversidades, siempre estuviste ahí para ayudarme y apoyarme, gracias amigo.

# Dedicatorias

# Índice

## Resumen

## Abstract

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes</b>	
2.1 Monografías científicas: herramienta de la Organización Mundial de la Salud para garantizar el uso racional de las plantas medicinales	3
2.2 Oréganos mexicanos	8
2.3 Uso medicinal de los oréganos	9
2.4 Antecedentes botánicos de <i>P. longiflora</i>	14
2.5 Estudios químicos y farmacológicos de <i>P. longiflora</i>	16
<b>3. Hipótesis y objetivos</b>	
3.1 Hipótesis	19
3.2 Objetivos	19
<b>4. Parte experimental</b>	
4.1 Material vegetal	21
4.2 Preparación de los extractos orgánicos	21
4.3 Ensayos de inocuidad	22
4.3.1 Toxicidad aguda en ratones	22
4.3.2 Toxicidad contra <i>Artemia salina</i> L	22
4.4 Ensayos de eficacia	23
4.4.1 Actividad antimicrobiana	23
4.4.2 Potencial antiespasmódico	24
4.4.2.1 Modelo del tránsito intestinal en ratones	24
4.4.2.2 Modelo del íleon aislado de cobayo	24
4.4.3 Potencial antinociceptivo	26
4.4.3.1 Prueba de la placa caliente	26
4.4.3.2 Prueba del estiramiento abdominal	26
4.4.4 Evaluación del potencial antidiabético	27
4.4.4.1 Modelo de diabetes mellitus tipo 2	27
4.4.5 Efecto agudo hipoglucemiante	26
4.5 Análisis estadístico	28
4.6 Análisis cromatográficos	28
4.7 Caracterización de los productos naturales	30
4.8 Estudio químico de <i>Poliomintha longiflora</i>	30
4.8.1 Fraccionamiento del extracto orgánico	30
4.8.2 Aislamiento, purificación e identificación del carvacrol (1)	30

4.8.3 Aislamiento e identificación de los ácidos ursólico (2) y oleanólico (3)	31
4.8.4 Estudio químico de la infusión	31
4.8.4.1 Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso	31
4.8.4.2 Aislamiento e identificación del carvacrol (1)	31
4.8.4.3 Aislamiento e identificación de la luteolina (4) y la apigenina (5)	31
4.8.5 Estudio químico del aceite esencial	32
4.9 Determinación simultánea de los principios marcadores	32
4.9.1 Preparación de la matriz de trabajo	32
4.9.2 Adecuabilidad del sistema	32
4.9.3 Linealidad del sistema	33
4.9.4 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	33
4.9.5 Exactitud	34
4.9.6 Precisión	34
4.10 Cuantificación de los marcadores	34
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>35</b>
5.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica	36
5.1.1 Inocuidad	
5.1.2 Evaluación de la eficacia preclínica	38
5.1.2.1 Evaluación del potencial antibacteriano	38
5.1.2.2 Evaluación del potencial antinociceptivo	38
5.1.2.3 Evaluación del potencial espasmolítico	42
5.1.2.4 Evaluación del potencial antidiabético	45
5.1.2.4.1 Evaluación del efecto hipoglucémico	46
5.1.2.4.2 Evaluación del efecto antihiperoglucémico	50
5.2 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad y composición	54
5.2.1 Composición química del aceite esencial	55
5.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de los aceites esenciales	66
5.2.3 Validación del método analítico para la cuantificación de marcadores	68
5.2.3.1 Linealidad del sistema	69
5.2.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación	71
5.2.3.3 Linealidad del método y exactitud	71
5.2.3.4 Precisión	73
5.2.3.5 Cuantificación simultánea de marcadores	74
5.3 Análisis químico de la infusión	74
5.4 Principales metabolitos secundarios presentes en los oréganos mexicanos	75
5.5 Correlación entre la composición química y las propiedades farmacológicas	75
5.5.1 Monoterpenoides: timol, carvacrol y <i>p</i> -cimeno	77
5.5.2 Flavonoides luteolina y apigenina	80
5.5.3 Ácidos orgánicos	80

<b>6. Conclusiones</b>	<b>82</b>
<b>7. Perspectivas</b>	<b>84</b>
<b>8. Referencias bibliográficas</b>	<b>85</b>

**Anexos**

Publicación

Participación en congresos

Gráficas curso temporal del efecto antidiabético

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Familias y especies pertenecientes al complejo orégano.	<b>10</b>
<b>Tabla 2.</b> Preparados medicinales que contienen orégano que se encuentran descritos en la Farmacopea Mexicana (1846).	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b> Efecto antibacteriano del extracto orgánico, aceites esenciales, timol, carvacrol y <i>p</i> -cimeno obtenidos a partir de los oréganos mexicanos.	<b>39</b>
<b>Tabla 4.</b> Efecto de los extractos orgánicos, infusiones y aceites esenciales de <i>L. graveolens</i> y <i>P. longiflora</i> sobre las contracciones inducidas por carbacol e histamina en una preparación de íleon aislado de cobayo.	<b>44</b>
<b>Tabla 5.</b> Efecto de los aceites esenciales de <i>L. graveolens</i> y <i>P. longiflora</i> sobre la inhibición del tránsito gastrointestinal en ratones.	<b>45</b>
<b>Tabla 6.</b> Compuestos volátiles identificados por GC-EM a partir de los aceites esenciales de <i>P. longiflora</i> y <i>L. graveolens</i> .	<b>57</b>
<b>Tabla 7.</b> Componentes volátiles identificados en las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> por la técnica de HS-SPME utilizando las fibras de CAR/PDMS y PDMS.	<b>61</b>
<b>Tabla 8.</b> Componentes volátiles identificados en las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> por la técnica de HS-SPME utilizando las fibras de CAR/PDMS y PDMS.	<b>63</b>
<b>Tabla 9.</b> Resultados experimentales de las curvas de calibración del timol (6), carvacrol (1) y <i>p</i> -cimeno (7) para evaluar la linealidad del sistema.	<b>70</b>
<b>Tabla 10.</b> Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema de 6, 1 y 7.	<b>70</b>
<b>Tabla 11.</b> Resultados experimentales de la curva de calibración del carvacrol (1) para evaluar la linealidad y exactitud del método.	<b>72</b>
<b>Tabla 12.</b> Resultados experimentales de la curva de calibración del timol (6) para evaluar la linealidad y exactitud del método.	<b>72</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados experimentales de la curva de calibración del <i>p</i> -cimeno (7) para evaluar la linealidad y exactitud del método.	<b>73</b>
<b>Tabla 14.</b> Resumen de las actividades farmacológicas de los principales metabolitos identificados en los oréganos mexicanos.	<b>78</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Reproducción de la monografía farmacopéica de la especie <i>Angelica sinensis</i> (tomada de Dang Gui Root, AHP, 2003).	6
<b>Figura 2.</b> Monografías tipo Organización Mundial de la Salud de plantas medicinales de México.	9
<b>Figura 3.</b> Reproducción del “tragorégano” ilustrado en el libro Historia Natural o Jardín Americano (Fray Juan Navarro, 1801).	11
<b>Figura 4. a)</b> Muestra de herbario; <b>b)</b> partes aéreas y <b>c)</b> flores de <i>P. longiflora</i> (tomadas del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM).	15
<b>Figura 5.</b> Metabolitos identificados por CLAE a partir de un extracto acuoso de <i>P. longiflora</i> (tomado de Zheng y Wang, 2001).	17
<b>Figura 6.</b> Metabolitos secundarios aislados a partir de <i>Lippia graveolens</i> .	18
<b>Figura 7a.</b> Efecto antinociceptivo de los extractos orgánicos de <i>P. longiflora</i> en el modelo de la placa caliente.	40
<b>Figura 7b.</b> Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>L. graveolens</i> en el modelo de la placa caliente.	41
<b>Figura 8.</b> Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>P. longiflora</i> en el modelo de estiramiento abdominal.	41
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso visceral.	43
<b>Figura 10.</b> Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos.	47
<b>Figura 11.</b> Efecto de la infusión de las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos.	48
<b>Figura 12.</b> Efecto agudo del extracto orgánico e infusión de las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos.	49
<b>Figura 13.</b> Efecto agudo del extracto orgánico e infusión de las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD–STZ–diabéticos.	49
<b>Figura 14.</b> Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral.	50
<b>Figura 15.</b> Efecto de la infusión de las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral.	51
<b>Figura 16.</b> Efecto de la infusión de las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral.	52

<b>Figura 17.</b> Efecto de las infusiones de las partes aéreas de <b>a) <i>L. graveolens</i></b> y <b>b) <i>P. longiflora</i></b> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral.	53
<b>Figura 18a.</b> Cromatograma de gases del aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> analizado en una columna capilar DB-5.	58
<b>Figura 18b.</b> Cromatograma de gases del aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> analizado en una columna capilar DB-5.	59
<b>Figura 19.</b> Esquema del proceso de <b>a) extracción</b> y <b>b) desorción</b> por HS-SPME-CG.	60
<b>Figura 20.</b> Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de HS-SPME.	62
<b>Figura 21.</b> Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de <i>L. graveolens</i> analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de HS-SPME.	64
<b>Figura 22.</b> Componentes volátiles mayoritarios presentes en las partes aéreas de <i>P. longiflora</i> identificados por espectrometría de masas.	65
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de los aceites esenciales de los oréganos mexicanos obtenidos por CLAE.	67
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de las infusiones de los oréganos mexicanos obtenidos por CLAE.	76
<b>Figura 25.</b> Efecto agudo de los marcadores <b>a) <i>p</i>-cimeno</b> , <b>b) carvacrol</b> y <b>c) timol</b> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos.	79
<b>Figura 26.</b> Efecto de los marcadores <b>a) <i>p</i>-cimeno</b> , <b>b) carvacrol</b> y <b>c) timol</b> en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral.	79



## Lista de abreviaturas

<b>AcOEt</b>	acetato de etilo
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	acetonitrilo
<b>AHP</b>	American Herbal Pharmacopoeia
<b>ANADEVA</b>	análisis de varianza
<b>°C</b>	grado Celsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	cloruro de calcio
<b>CaM</b>	calmodulina
<b>CCA</b>	cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	cromatografía en capa fina
<b>CCFP</b>	cromatografía en capa fina preparativa
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	cloroformo deuterado
<b>CG-EM</b>	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	diclorometano
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentración inhibitoria media
<b>CL<sub>50</sub></b>	concentración letal media
<b>CLAE</b>	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>CMI</b>	concentración mínima inhibitoria
<b>dL</b>	decilitro
<b>DL<sub>50</sub></b>	dosis letal media
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>EGTA</b>	ácido tetra-acético de etilenglicol
<b>E<sub>max</sub></b>	efecto máximo
<b>ESCOP</b>	Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia
<b>FHEUM</b>	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
<b>g</b>	gramo
<b>HCOOH</b>	ácido fórmico
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	ácido ortofosfórico
<b>h</b>	hora
<b>Hex</b>	hexano
<b>HS-SPME</b>	microextracción sólida en fase gaseosa
<b>ICH</b>	guías de la Conferencia Internacional de Armonización
<b>INI</b>	Instituto Nacional Indigenista
<b>IR</b>	espectroscopía en el infrarrojo
<b>kg</b>	kilogramo
<b>KCl</b>	cloruro de potasio
<b>L</b>	litro
<b>λ</b>	longitud de onda
<b>MeOH</b>	metanol
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	sulfato de magnesio
<b>m</b>	metro
<b>mg</b>	miligramo
<b>μg</b>	microgramo
<b>μm</b>	micrometro
<b>min</b>	minuto

<b>mL</b>	mililitro
<b>mm</b>	milimetro
<b>μL</b>	microlitro
<b>MTT</b>	bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
<b>m/z</b>	relación masa-carga
<b>NaCl</b>	cloruro de sodio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sodio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	fosfato ácido de sodio
<b>NAD</b>	dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	sulfato de sodio
<b>OGTT</b>	ensayo de tolerancia oral a la glucosa
<b>OSTT</b>	ensayo de tolerancia oral a la sacarosa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PDE1</b>	fosfodiesterasa de cerebro de bovino dependiente de calmodulina
<b>m/v</b>	relación peso volumen
<b>SIDA</b>	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>STZ</b>	estreptozotocina
<b>t<sub>R</sub></b>	tiempo de retención
<b>TMS</b>	tetrametilsilano
<b>UV</b>	espectroscopía en el Ultravioleta

## Resumen

La presente disertación describe parte de la investigación científica realizada para la elaboración de la monografía de la especie *Poliomintha longiflora* A. Gray (Lamiaceae), planta de amplio uso en la culinaria y en la medicina tradicional de nuestro país, de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la actualidad esta planta es extensamente comercializada en el norte de México como sustituto del orégano común, *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae).

Para el desarrollo de este proyecto se propuso una estrategia metodológica que se inició con las evaluaciones preclínicas de eficacia e inocuidad de *P. longiflora* y *L. graveolens* y culminó con el estudio químico de las especies seleccionadas con la finalidad de establecer los principios activos y/o marcadores de la planta, así como las pruebas de identidad y composición de dos de los oréganos más comercializados en México.

Como pruebas de inocuidad preclínica para *P. longiflora* se determinó su toxicidad aguda en ratones y contra el crustáceo *Artemia salina* L., de acuerdo con los procedimientos descritos por Lorke y Wha, respectivamente. El estudio de la toxicidad aguda permitió establecer que el extracto orgánico a diferentes dosis es muy tóxico,  $DL_{50}$  (dosis letal media)  $< 2$  mg/kg, y provocó efectos agudos importantes; en la prueba de *A. salina* el extracto también fue tóxico ya que la  $CL_{50}$  (concentración letal media) fue de 100  $\mu$ g/mL. Asimismo, la prueba de Ames permitió comprobar que el extracto orgánico no es mutagénico. Cabe hacer notar que cuando el ensayo se repitió con extracto orgánico recién preparado los efectos tóxicos antes descritos no se observaron; sin embargo, al repetir el ensayo con extracto almacenado durante 15 días los efectos tóxicos de nueva cuenta se presentaron.

El aceite esencial y la infusión de la planta fueron inocuos, recién preparados o almacenados. En ambos casos la  $DL_{50}$  fue mayor a 5000 mg/kg. Este hallazgo fue relevante ya que la planta se consume bajo la forma de esencia, infusión o condimento.

La eficacia preclínica de las especies se evaluó mediante una serie de experimentos farmacológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, seleccionados considerando los usos populares mejor documentados de la planta. Estos estudios incluyeron la evaluación del potencial antibacteriano, antinociceptivo, espasmolítico y antidiabético.

El potencial antibacteriano del extracto íntegro y del aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas de *P. longiflora*, aplicando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), permitió evidenciar que tanto el extracto íntegro como la esencia inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *B. subtilis* con una CMI (concentración mínima inhibitoria) de 128 µg/mL. En contraste, ninguno de los preparados de *L. graveolens* ensayados fueron sensibles a los microorganismos de prueba. En todos los casos la CMI fue marginal (CMI = 512 µg/mL).

Para establecer si los oréganos poseían propiedades antinociceptivas, los extractos orgánicos [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1)] de ambas plantas, recién preparados, fueron ensayados en ratones utilizando los modelos convencionales de estiramiento abdominal y de la placa caliente. Los resultados indicaron que en el rango de dosis ensayadas (10-600 mg/kg) los oréganos fueron inactivos en las dos pruebas.

El potencial espasmolítico de ambos oréganos se estableció utilizando dos modelos farmacológicos: el del íleon aislado de cobayo y la prueba del tránsito gastrointestinal en ratones. Los resultados encontrados permitieron comprobar que los preparados (extracto orgánico, infusión y aceite esencial) de los dos oréganos inducen una inhibición significativa y dependiente de la concentración de las contracciones inducidas por carbacol (CI<sub>50</sub> entre 28 y 50 µg/mL en el caso de *L. graveolens*, y entre 26 y 69 µg/mL para *P. longiflora*) e histamina (CI<sub>50</sub> entre 1.6 y 20 µg/mL en el caso de *L. graveolens*; y entre 1.9 y 48 µg/mL para *P. longiflora*) en íleon aislado de cobayo. También, inhiben de manera significativa el tránsito del carbón activado a través del tracto gastrointestinal en ratones.

La evaluación de los extractos orgánicos e infusiones de los oréganos mexicanos como agentes hipoglucemiantes se realizó utilizando un modelo de tipo agudo. El extracto orgánico de *P. longiflora* a la dosis de 31.6 mg/kg posee un efecto hipoglucemiante significativo tanto en animales normoglucémicos como diabéticos. Sin

embargo, la infusión de *P. longiflora* en animales sanos y diabéticos provocó un efecto hipoglucemiante moderado. Por otra parte, el extracto íntegro e infusión de *L. graveolens* también presentaron un efecto hipoglucemiante significativo en los dos modelos de animales evaluados.

El efecto del extracto íntegro e infusión de *P. longiflora* en las pruebas de tolerancia a la glucosa (OGTT) y a la sacarosa (OSTT), en animales normoglucémicos, indicó que a las dosis de 10 y 100 mg/kg producen un incremento significativo del pico posprandial. Por otra parte, en animales diabéticos a la dosis de 10 mg/kg se observó un incremento significativo del pico posprandial con respecto al vehículo. Los resultados de la evaluación de los preparados de *L. graveolens* en ratones normales y diabéticos fueron similares.

En conjunto estos resultados indican que ambas especies de oréganos evaluadas no son agentes antihiperoglucémicos eficaces; y por el contrario, aumentan los niveles de glucosa en los animales tratados de acuerdo con los experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa realizados, y permiten sugerir además, que el uso de las infusiones de estas plantas no es recomendable para el tratamiento de la diabetes hasta que no se realicen ensayos más concluyentes en otras especies animales.

La identificación de los componentes volátiles presentes en el aceite esencial y planta de los oréganos mexicanos se realizó por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). La identificación de los componentes de la esencia se estableció mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts, y la comparación de los espectros de masas generados por los componentes, con aquellos disponibles en la biblioteca del equipo y los descritos en la literatura especializada. Los perfiles cromatográficos obtenidos presentaron un elevado porcentaje de los monoterpenoides oxigenados, carvacrol en *P. longiflora* y timol en *L. graveolens*. Con la finalidad de complementar la información obtenida a partir de los análisis de las esencias por CG-EM, así como de establecer su contenido de componentes volátiles, se realizó un análisis por microextracción utilizando dos diferentes tipos de soportes sólidos en fase gaseosa (HS-SPME). En el caso de *P. longiflora*, el alfa-terpineno, el limoneno, el *p*-cimeno, el eucaliptol, el gamma-terpineno y el acetato de carvacrilo fueron identificados como los componentes volátiles

mayoritarios, en tanto que en *L. graveolens* se identificaron al alfa-pineno, al *p*-cimeno, al eucaliptol y al beta-cariofileno como los principales constituyentes.

El estudio químico del extracto orgánico preparado a partir de las partes aéreas de *P. longiflora*, permitió el aislamiento y la caracterización del carvacrol (**1**) y el timol (**6**), así como de los ácidos ursólico (**2**) y oleanólico (**3**). Por otra parte, el estudio realizado a partir de la infusión permitió de nueva cuenta identificar a **1** y **6**, así como a las flavanonas luteolina (**4**) y apigenina (**5**) como los principales componentes presentes en las especies de oréganos analizadas.

Finalmente, con relación a los parámetros de calidad, se establecieron los perfiles cromatográficos, así como los principios activos y/o marcadores de ambos oréganos aplicando la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Los perfiles cromatográficos obtenidos para cada una de las esencias permitieron determinar que el carvacrol (**1**), el timol (**6**) y el *p*-cimeno (**7**) constituyen los compuestos marcadores para la identificación de ambas especies de oréganos. En general, en las esencias de *P. longiflora* predomina **1**; en contraste, *L. graveolens* contiene principalmente **6**. Finalmente, se estableció y validó un método analítico por CLAE conducente a cuantificar simultáneamente a los tres marcadores presentes en las esencias. El método analítico propuesto es lineal, preciso, exacto y específico en el rango de concentraciones ensayadas.

## Abstract

This dissertation describes the chemical and pharmacological investigation of the medicinal species *Poliomintha longiflora* A. Gray (Lamiaceae) in order to elaborate its scientific monograph according to the guidelines of the World Health Organization (WHO). Currently this plant is extensively commercialized in the north of Mexico as substitute of the common oregano, *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae).

The first step in the study was the analysis of any potential toxicological effect of the organic extract of *P. longiflora* using the Lorke procedure and the brine shrimp (*Artemia salina* L.) test; the results revealed a noted toxicity to mice  $LD_{50}$  (lethal dose, 50%)  $< 2$  mg/kg and the shrimp naupilli  $LC_{50}$  (lethal concentration, 50%) = 100  $\mu$ g/mL. However, a freshly prepared organic extract, the infusion, and the essential oils of both species were not toxic in the acute toxicity test ( $LD_{50} > 5000$  mg/kg). In addition, *P. longiflora* was not mutagenic in any of the studied strains tested.

Next, several preparations of the plants were investigated from the pharmacological point of view in order to establish their preclinical efficacy. The activities evaluated were selected considering the popular medicinal uses of both oreganos as antiseptic, analgesic, spasmolytic, and antidiabetic agents.

Thus, the potential antimicrobial effect of the extracts and essential oils obtained from the aerial parts of *P. longiflora* was assessed against an appropriated battery of Gram negative and Gram positive microorganisms, according to the MTT microplate procedure. In general, all the test microorganisms were less sensitive to *L. graveolens* with a minimum inhibitory concentration (MIC of 512  $\mu$ g/mL). On the other hand, *P. longiflora* preparations (organic extract and essential oil) exerted marginal activity against *S. aureus* and *B. subtilis* with a MIC value of 128  $\mu$ g/mL in both cases.

The antinociceptive properties of the oreganos were accomplished using the conventional hotplate and acetic acid-induced writhing tests. Oral administration of the  $CH_2Cl_2$ -MeOH (1:1) extracts (at 10–600 mg/kg) of both plants did not display activity in the two tests.

In order to obtain the information about the antispasmodic properties of the two oreganos under investigation, a series of *in vitro* and *in vivo* experiments were accomplished. In these trials, the effect of the preparations (organic extract, infusion, and essential oil) on carbachol- and histamine-induced guinea-pig ileum contractions as well as the gastrointestinal motility in mice was investigated. The results indicated that both oreganos provoked a concentration-dependent inhibition of the guinea pig ileum of the carbachol- and histamine-induced contractions. In the case of *L. graveolens* the IC<sub>50</sub>'s values ranged from 28 to 50 µg/mL and 1.6 to 20 µg/mL, respectively and for *P. longiflora* the IC<sub>50</sub>'s values were in the ranges of 26–29 µg/mL and 1.9–48 µg/mL, respectively. In addition, both plants caused a significant dose-dependent inhibition on the intestinal movement retarding charcoal transit in mice.

The potential antidiabetic effect was assessed using well-known animal models. The organic extract of *P. longiflora* (31.6 mg/kg) showed a significant hypoglycemic action in both normal and NAD–STZ–diabetic mice. The effect of the infusion of *P. longiflora* provoked a moderate hypoglycemic activity. The oral administration of the organic extract and infusion of *L. graveolens* also displayed significant hypoglycemic effect. In normal mice, the extract and infusion of *P. longiflora* (10 and 100 mg/kg) in the oral glucose (OGTT) and sucrose (OSTT) tolerance tests produced a significant increase of the postprandial peak. On the other hand, in diabetic animals (10 mg/kg) a significant increase of the postprandial peak was also observed. The effect of the preparations of *L. graveolens* was similar. Altogether these results indicated that both species of oreganos are not efficacious antihyperglycemic agents. Therefore their use in diabetic patients could be risky.

In the present study, it is also reported a comparative analysis of the chemical composition of the essential oils, infusions, and organic extracts obtained from both Mexican oreganos. The GC–MS profiles of the oils showed a high content of oxygenated monoterpenes, mainly carvacrol (**1**) in *P. longiflora* and thymol (**6**) in *L. graveolens*, along with a large amounts of *p*-cymene (**7**). In the case of *P. longiflora*, a headspace solid-phase microextraction analysis (HS–SPME) of the leaves revealed that alpha-terpinene, *m*-cymene, *p*-cymene, 1-acetoxy-4-ethylbenzene, and carvacrol were the principal components. HPLC analysis of the infusions of both oreganos using a



reverse phase Hibar LiChrospher C-18 column led to the identification of apigenin, thymol, and *p*-cymene as the main components presents in *L. graveolens*. On the other hand, *P. longiflora* contained luteolin (**4**), apigenin (**5**), carvacrol, and *p*-cymene as the major compounds. Finally, were isolated carvacrol, thymol as well as ursolic (**2**) and oleanolic (**3**) acids from the organic extract of *P. longiflora*

A suitable HPLC method was developed to simultaneous quantification of three major components of Mexican oreganos oils. The optimal HPLC separation conditions were achieved with a reverse-phase Synergi Hydro-RP C-18 column and a mixture of CH<sub>3</sub>CN–water (55:45). For *P. longiflora*, the peaks corresponding to carvacrol (**1**) and *p*-cymene (**7**) possessed an area of 91.1 and 2.7%, respectively, of the total peak area quantified. In the case of *L. graveolens*, thymol (**6**), carvacrol (**1**), and *p*-cymene (**7**) showed an area of 36.4, 19.0, and 15.3%, respectively. Next, the HPLC method was fully validated according to International Conference on Harmonization (ICH) guidelines.

# 1. Introducción

*Poliomintha longiflora* A. Gray es una especie de amplio uso en la culinaria y en la medicina tradicional de nuestro país. Esta planta es extensamente comercializada en el norte de México y Estados Unidos como sustituto del orégano común, *Lippia graveolens* Kunth. Cabe mencionar que ambas especies forman parte del complejo de plantas medicinales designadas con el nombre común de “oréganos mexicanos”.

Un complejo de plantas medicinales es un conjunto de especies que comparten el mismo nombre popular, algunas características aromáticas y/o morfológicas, así como propiedades curativas, por lo que se utilizan de manera indistinta. En general, cada complejo tiene una especie dominante, que se comercializa inclusive fuera de su sitio de distribución. Sin embargo, hay ocasiones que cuando la planta dominante escasea, los usuarios la sustituyen, por otras con características morfológicas y organolépticas similares, aunque no tengan la misma eficacia (Linares y Bye, 1987).

De acuerdo con Linares y Bye (1987), en México existen alrededor de 25 complejos de plantas medicinales formados por 400 especies. Los datos se obtuvieron durante la realización de un inventario de plantas curativas que se comercializan en mercados, tiendas naturistas y farmacias localizados a lo largo del país y en algunas regiones del suroeste de los Estados Unidos, incluyendo Arizona, Colorado, Nuevo México y Texas. Aunque, en el reporte de Linares y Bye (1987) se detallan solo cuatro complejos del norte del país, los investigadores establecieron que las plantas llamadas comúnmente oréganos conforman uno de estos grupos de plantas. El complejo “orégano mexicano” comprende a un conjunto de especies aromáticas pertenecientes a varios géneros de cuatro familias. Estas plantas no sólo tienen una amplia historia en la culinaria Europea y de nuestro país como condimento, sino también un amplio uso en la medicina tradicional como agentes antibacterianos, antiespasmódicos, analgésicos, antioxidantes, sedantes, antiparasitarios, anticancerígenos y antidiabéticos, que data desde principios del siglo XVIII (Prieto *et al.*, 2007; Shihari *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008).

Quizás la especie dominante del complejo orégano es *Lippia graveolens* Kunth (sinónimo: *L. berliandieri* Schauer) y su principal sustituto actual es *Poliomintha longiflora*, objeto de estudio del presente proyecto de investigación. Esta última es muy valorada por los comerciantes del norte del país debido a su gran calidad como condimento. En el estado de Nuevo León, se reporta la presencia de orégano en localidades de los municipios de Allende, Linares, Monterrey y en particular en el municipio de Higuera. Este recurso es utilizado con fines comerciales por los habitantes del municipio de Higuera, y la colecta la realizan durante 4 a 7 meses del año, iniciando en los meses de Mayo o Junio. La cosecha promedio por persona es de 5 kg por día (Aranda *et al.*, 2009).

A pesar del uso indistinto de ambas plantas no existe información en la literatura especializada que permita justificarlo. De tal manera que el presente trabajo de investigación pretende validar los usos medicinales mejor documentados atribuidos a la especie *P. longiflora*, mediante la evaluación de su eficacia preclínica y el establecimiento de los principios activos y/o marcadores químicos de la planta para compararlos con los disponibles de *L. graveolens*. Tampoco se cuentan con monografías tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) o farmacopéicas que garanticen el uso racional de estas plantas, por lo que todo el conocimiento obtenido a través de esta investigación permitirá generarlas. Al mismo tiempo que se fundamentará la pertenencia de *P. longiflora* en el complejo orégano.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Monografías científicas: herramienta de la Organización Mundial de la Salud para garantizar el uso racional de las plantas medicinales.

A nivel mundial, las plantas medicinales y/o aromáticas desempeñan un papel importante en el cuidado de la salud especialmente en los países en vías de desarrollo. Se estima que el 80% de la población del mundo emplea recursos fitoterapéuticos como único medio para la atención primaria de la salud. Incluso, en algunos países como China, Cuba, India, Sri Lanka y Tailandia, las autoridades sanitarias fomentan el uso alternativo de este tipo de terapia en sus programas oficiales de salud (Rao *et al.*, 2004). En otros países donde la fitoterapia no forma parte de los cuadros básicos terapéuticos, el uso de plantas medicinales se ha incrementado sensiblemente en los últimos años. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el auge en el consumo de estos productos herbolarios se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos y a la continúa búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades emergentes, algunas letales, como el cáncer, la diabetes o el SIDA (OMS, 1999).

El incremento en la popularidad del uso de los medicamentos herbolarios ha evidenciado la necesidad de asistir a las autoridades regulatorias, a las organizaciones científicas y a los fabricantes, con información científica actualizada sobre los métodos de control de calidad o estandarización que permitan garantizar la seguridad y eficacia de las drogas crudas y sus preparados fitofarmacéuticos. Así, en 1978 por primera vez en su historia, la OMS recomendó a sus países miembros realizar una evaluación de los recursos terapéuticos utilizados en sus prácticas médicas alternativas y/o complementarias. Esta evaluación no debe limitarse al inventario sistemático de los vegetales que curan, sino también al conocimiento científico disponible de los mismos incluyendo sus aspectos botánicos, químicos, toxicológicos y farmacológicos, además de implementar medidas con la finalidad de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas

medicinales, establecer y mantener estándares adecuados de los productos, identificar plantas medicinales o medicamentos derivados de ellas que tengan una relación eficacia-efecto secundario satisfactorio y que, por lo tanto, puedan incluirse en los formularios o farmacopeas nacionales y, por último, realizar estudios clínicos y preclínicos. Toda la información obtenida a partir de estos estudios permitirá la elaboración de documentos oficiales y monografías para cada droga vegetal que promoverían el consumo racional y validarían el uso popular de estos productos. En este sentido, cabe destacar que la cifra de plantas medicinales en el mundo se ubica en alrededor de 422,000 especies, y tan sólo un 12.5% del total de estas especies se ha estudiado con la finalidad de establecer su eficacia terapéutica. Asimismo, la proporción de especies con usos medicinales documentados en los diferentes países, varía desde un 4.4 hasta un 20% (OMS, 2000a; 200b; Rao *et al.*, 2004).

Con la finalidad de orientar a sus países miembros en la tarea de integrar las monografías de plantas medicinales, la OMS estableció la información científica que debe incluir cada documento (OMS, 1999). La más relevante se indica a continuación:

a) Definición de la droga, especificando los nombres vernáculos y sinonimias de la planta.

b) Descripción botánica detallada, de interés para asegurar la calidad de las drogas crudas en las etapas de recolección, fabricación y/o comercio.

c) Pruebas generales de control de calidad, que permitan establecer la identidad, pureza y composición de cada planta medicinal.

d) Finalmente, debe de incluirse toda la información necesaria para establecer los parámetros de eficacia y seguridad, incluyendo formas de dosificación, contraindicaciones tales como sensibilidad o alergias, advertencias, carcinogenicidad, teratogenicidad, reacciones adversas y posología.

Con la elaboración de las monografías científicas de plantas medicinales no se plantea sustituir a los compendios oficiales (farmacopeas y formularios), sino contribuir al establecimiento de los mismos, al ofrecer a las autoridades pertinentes información veraz y actualizada sobre los más diversos aspectos de las drogas vegetales. También, éstas monografías pueden auxiliar en el proceso de regulación de los productos herbolarios. Tradicionalmente, éstos se han consumido sin ser sujetos a una regulación apropiada, y en

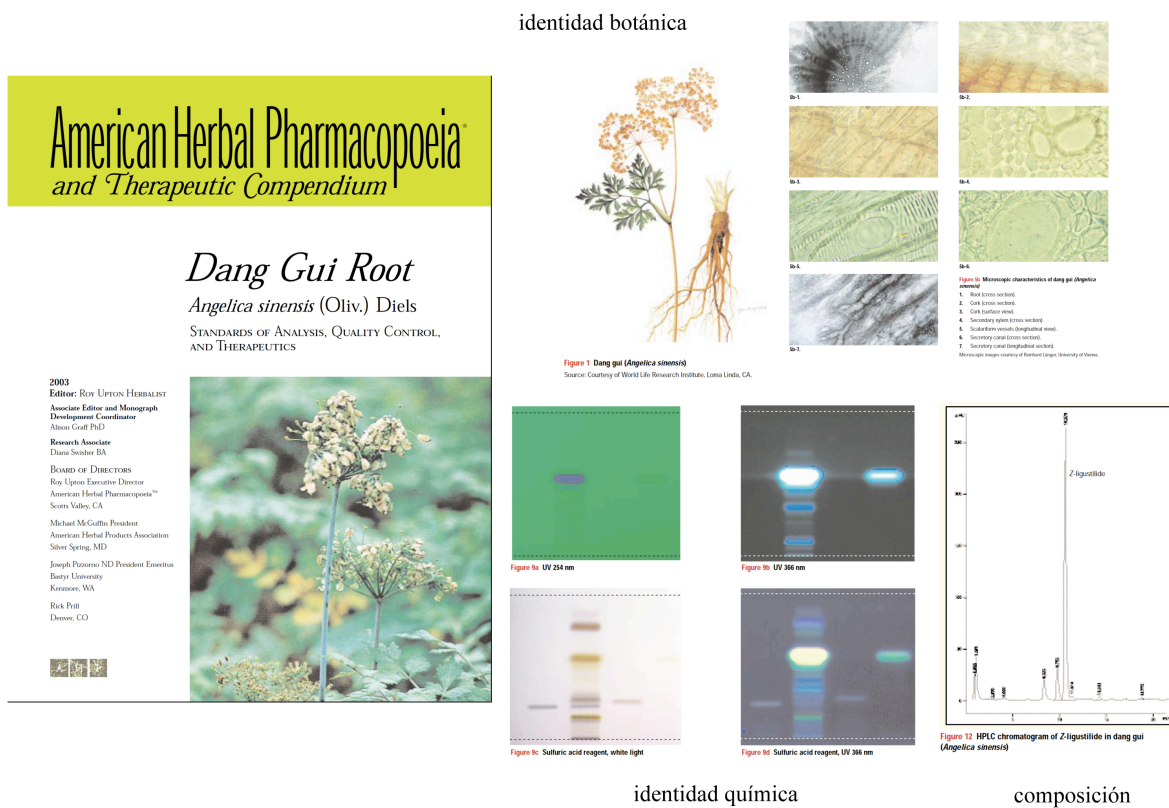
muchos casos, su registro como medicamentos se ve impedida por la carencia de parámetros de inocuidad, eficacia y calidad apropiados. Por otro lado, la existencia de las monografías permitiría regular a nivel global los criterios para el expendio, la fabricación, la comercialización y para evaluar la calidad, la seguridad y la eficacia de las drogas crudas y sus derivados, mismos que varían sorprendentemente en las distintas regiones del mundo (OMS, 1993).

Quizás el país que ha realizado un mejor esfuerzo para incorporar las prácticas médicas populares a su medicina oficial es China. Este país tiene una medicina tradicional milenaria y se estima que su arsenal terapéutico consta de alrededor de 5000 especies medicinales (Shen, 1996). De éstas, 538 han sido analizadas e incluidas en monografías tipo farmacopéico.

En los países de la Unión Europea, la fitoterapia siempre se ha considerado un instrumento terapéutico importante. Su éxito reciente se basa en productos eficaces, inocuos y con parámetros de calidad bien establecidos. Con la fundación en 1989 de la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP), se logró establecer criterios armónicos para la evaluación de las fitomedicinas, apoyar su investigación científica y contribuir a la aceptación de la fitoterapia a nivel comunitario europeo. A la fecha se han publicado alrededor de 60 monografías de plantas medicinales que han contribuido a normar el uso de las plantas medicinales en el continente europeo. Las monografías de la ESCOP también constituyen modelos idóneos para la integración de monografías científicas de plantas medicinales.

En Estados Unidos, el uso de los medicamentos herbolarios es menos generalizado que en otros países industriales. Esta circunstancia, entre otros factores, se debe a su distribución y reglamentación como alimentos o suplementos dietéticos (Mahady, 2001; Engel y Straus, 2002; OMS, 2000b; 2011). Sin embargo, en los últimos años se ha estimulado de manera notable la investigación conducente al establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, la pureza, la calidad y la eficacia de las drogas crudas y productos fitofarmacéuticos derivados mediante la divulgación de folletos, textos y monografías publicadas por la Farmacopea Herbolaria Americana (American Herbal Pharmacopoeia, AHP). Todo ello con el fin de promover el uso responsable de los medicamentos herbolarios, así como generar las muestras y/o sustancias de referencia para

realizar los ensayos de control de calidad de las plantas medicinales. Cada monografía publicada por la AHP contiene información crítica y detallada sobre los usos populares de las especies medicinales de mayor uso. También incluyen los estudios toxicológicos y farmacológicos, y en lo posible clínicos, que sustentan la eficacia y la seguridad de esas plantas; así como, sus principios activos y pruebas de pureza, composición e identidad (Figura 1) (Bone, 2001; OMS, 2000b; Flaster y Lassiter, 2004; Reif *et al.*, 2004; Betz *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Reproducción de la monografía farmacopéica de la especie *Angelica sinensis* (tomada de Dang Gui Root, AHP, 2003).

En México, las autoridades sanitarias han prestado poca atención al desarrollo de remedios herbolarios de calidad y eficacia. Debido a que los productos elaborados con las plantas medicinales tienen una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad, tanto de las clases sociales más necesitadas como en las económicamente privilegiadas, el comercio de este tipo de productos se ha incrementado de manera importante en la última

década. Lamentablemente, la deficiente regulación, la falta de criterios de calidad y la carencia de personal capacitado para evaluar esta medicina, han conllevado a que los productos comerciales presenten diferentes niveles de calidad. Además, el conocimiento científico de los mismos es deficiente, ya que son pocas las plantas medicinales que han podido cursar por las diferentes etapas del proceso de investigación que exigen los actuales lineamientos internacionales, que determinan la aceptación formal de un medicamento.

En respuesta a los requerimientos de la OMS, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) en el año 2001. Sin embargo, a pesar de la riqueza de la flora medicinal de nuestro país y de la gran tradición en el uso de las plantas medicinales con fines curativos, las monografías de especies autóctonas resultaron deficientes, tanto en calidad como en contenido. De tal manera que en el México actual, hay una carencia notable de estándares para el control de calidad de las plantas y sus preparados. Asimismo, la información acerca de la eficacia, la inocuidad, el desarrollo sustentable, la composición química y otros aspectos farmacéuticos de las mismas es limitada.

La FHEUM contiene una sección de 42 páginas de métodos analíticos de utilidad como herramientas para el control de calidad de plantas y materiales proveniente de éstas; todos los procedimientos se agrupan bajo el nombre de Métodos Generales de Análisis (MGA), idéntica a la publicada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para medicamentos alopáticos. En un total de 60 páginas, se incluyen 41 monografías de plantas medicinales y 23 de aceites esenciales, pertenecientes a plantas medicinales introducidas en nuestro país, que describen la definición de las drogas, la descripción botánica (macroscópica y microscópica) y los ensayos de composición, pureza e identidad cromatográfica. Finalmente, cuenta con una sección de extrafarmacopea dividida en dos partes; en la primera se presentan 19 monografías de especies medicinales de México que no cuentan con suficientes estudios químicos, toxicológicos, farmacológicos o clínicos que validen su uso terapéutico. Por último, la segunda parte contiene dos anexos, incluyendo una relación de especies de uso etnobotánico en México. En este contexto, considerando la biodiversidad de la flora medicinal de México, el contenido de monografías de especies vernáculas como las enlistadas en los anexos es escaso. De tal forma, que es necesario



generar parte de la información científica indispensable para elaborar y/o actualizar las monografías de especies mexicanas, más utilizadas en las prácticas médicas alternativas.

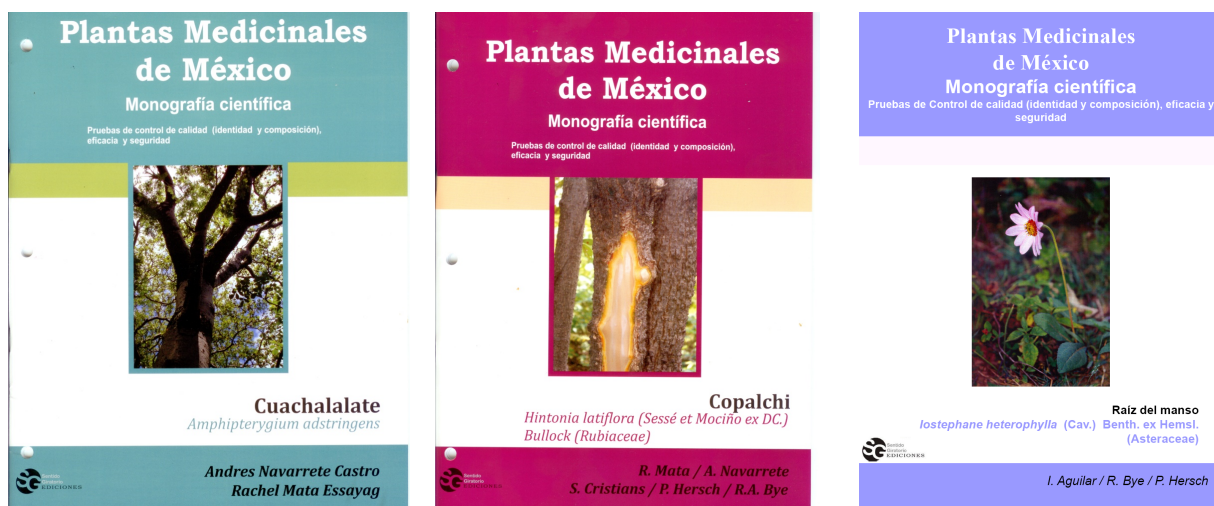
Como una respuesta ante la creciente necesidad de elaborar monografías de plantas nativas, en el año 2003, mediante el financiamiento del fondo sectorial Salud (CONACyT-C018), se inició en nuestro grupo de trabajo un proyecto multidisciplinario para generar la información científica necesaria para la integración de monografías tipo OMS de especies de reconocido uso en la medicina tradicional de nuestro país. Estos recursos permitieron iniciar este importante cometido, realizando en primera instancia, la investigación etnobotánica y taxonómica, el análisis químico y el desarrollo de los procedimientos de control de calidad para establecer la composición e identidad de cada especie, requeridos en una Farmacopea como documento regulatorio. También se realizó la caracterización farmacológica preclínica conducente a determinar la eficacia e inocuidad de cada una de las especies seleccionadas. A la fecha, el desarrollo de este proyecto permitió la integración y publicación de las monografías de las especies *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae), *Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schltdl (Anacardiaceae) e *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. ex Hemsl. (Asteraceae) (**Figura 2**), seleccionadas con base en su amplio uso en las prácticas médicas alternativas y a un listado en el que la Secretaría de Salud las ha catalogado como especies del cuadro básico de plantas medicinales (Mata *et al.*, 2010; Navarrete y Mata, 2010; Aguilar *et al.*, 2010).

Finalmente, es importante enfatizar que estas monografías contribuyen a la optimización del potencial terapéutico de la herbolaria nacional, a través de una serie de parámetros para el uso racional de los preparados herbolarios.

## **2.2 Oréganos mexicanos.**

En México, con el nombre popular de “orégano”, se designa a un complejo de 40 especies aromáticas y herbáceas pertenecientes a varios géneros de las familias Lamiaceae (*Calamintha*, *Hedeoma*, *Hyptis*, *Mesosphaerum*, *Monarda*, *Origanum*, *Plectranthus* y *Poliomintha*) y Verbenaceae (*Lantana* y *Lippia*), así como algunas especies de las familias Asteraceae (*Brickellia*) y Fabaceae (*Dalea*) (**Tabla 1**). De todas éstas, las más importantes

desde el punto de vista comercial son las especies de *Origanum vulgare*, *O. majorana*, *Poliomintha longiflora* y *Lippia graveolens*.



**Figura 2.** Monografías tipo Organización Mundial de la Salud de plantas medicinales de México.

Las especies del género *Origanum* son nativas de la zona mediterránea y todas ellas son ampliamente comercializadas como condimentos y con propósitos medicinales. En las leyendas mitológicas se dice que Afrodita, Diosa del amor, fue la que plantó el primer orégano y le dió la fragancia que actualmente posee. El orégano común y la mejorana fueron introducidas en México durante el período colonial y actualmente se cultivan en parcelas y huertos de zonas templadas del país, y se conocen comúnmente bajo el nombre de oréganos europeos. *L. graveolens* y *P. longiflora* son las especies endémicas de mayor distribución en México.

### 2.3 Uso medicinal de los oréganos.

Desde el punto de vista histórico y, de acuerdo con la información del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana publicado por el Instituto Nacional Indigenista (INI), la primera mención sobre el orégano en nuestro país fue realizada en el siglo XVI por Francisco Hernández en su obra Historia de las Plantas de la Nueva España, refiriéndose a *L. graveolens* como “una planta efectiva contra cualesquiera dolores e

igualmente cuando se necesita un calor más intenso” (Hernández, 1959; Argueta *et al.*, 1994).

**Tabla 1.** Familias y especies pertenecientes al complejo orégano.

Nombre científico	Familia	Nombres comunes y distribución geográfica
<i>Brickellia veronicaefolia</i> Kunth	Asteraceae	Orégano de cerro (Chihuahua), orégano de campo (México), orégano de monte (Puebla)
<i>Calamintha potosina</i> Schaff	Lamiaceae	Orégano de Sierra (S.L.P.)
<i>Cunila pycnantha</i> Rob. & Greenm	Lamiaceae	Orégano (Guanajuato)
<i>Dalea greggi</i> Gray	Fabaceae	Orégano cimarrón (Chihuahua, Oaxaca, Puebla, S.L.P., Sonora)
<i>Hedeoma floribunda</i> Standl.	Lamiaceae	Orégano (Chihuahua, S.L.P., Sonora)
<i>Hedeoma patens</i> Jones	Lamiaceae	Orégano salvia real (Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Sinaloa, Sonora)
<i>Lantana involucrata</i> L.	Verbenaceae	Orégano, peonía, colorada, tarete (Michoacán, Sinaloa, Tamaulipas)
<i>Lantana velutina</i> Mart.	Verbenaceae	Orégano (Guanajuato, S.L.P., Tamaulipas)
<i>Lantana involucrata</i> L.	Lamiaceae	Orégano europeo (zonas templadas de México, huertos familiares)
<i>Lippia graveolens</i> Kunth	Verbenaceae	Orégano (en la mayor parte de los estados) Orégano de Castilla, salvia (Coahuila, Durango, Jalisco, Querétaro, Sinaloa, Zacatecas)
<i>Lippia palmeri</i> Watson	Verbenaceae	Orégano (Baja California, Chihuahua, Sinaloa, Sonora)
<i>Monarda austromontana</i> Epl.	Lamiaceae	Orégano (Chihuahua, Sonora)
<i>Monarda citriodora</i> Cerv	Lamiaceae	Orégano (Chihuahua, Nuevo León, Sonora)
<i>Origanum mejorana</i> L.	Lamiaceae	Orégano europeo (zonas templadas de México, parcelas y huertos familiares)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae	Orégano (Coahuila, Nuevo León)
<i>Poliomintha longiflora</i> A. Gray	Lamiaceae	Orégano de cerro (Chihuahua), orégano de campo (México), orégano de monte (Puebla)

En el año de 1801, Fray Juan Navarro en su manuscrito Historia Natural o Jardín Americano (1992), describe los primeros reportes del orégano de la siguiente forma “.....tragorégano denominado poleo por muchos españoles y no era sino la planta llamada ‘orégano cabruno’, que sabe a orégano y a poleo. Nacida en Cuernavaca, es caliente, y seco en tercer grado. Su cocimiento provoca el mes, aprovecha a los hidrónicos, abre las opilaciones, reconstituye el color perdido, es diurético, desopila el bazo, adelgaza y evacua los humores. Sus hojas majadas y traídas a la boca, alivian el camino y quitan la sed” (Figura 3).



**Figura 3.** Reproducción del “tragorégano” ilustrado en el libro Historia Natural o Jardín Americano (Fray Juan Navarro, 1801).

La Farmacopea Mexicana editada por la Academia Farmacéutica en el año de 1846, enlista como medicamentos simples más usuales en farmacia a las especies *Lippia graveolens*, *L. organoides* y *Origanum vulgare* como oréganos del país y las incluyen en diferentes preparados medicinales (Farmacopea Mexicana, 1846). Los preparados tenían diferentes aplicaciones terapéuticas y generalmente se elaboraban bajo la forma de tinturas y polvos. En la **Tabla 2** se resumen los preparados y sus usos terapéuticos.

En la Nueva Farmacopea Mexicana editada en el año de 1896 por la Sociedad Farmacéutica Mexicana, también se describe el uso del orégano del país, *Lippia graveolens*, con las mismas características que el orégano europeo, utilizado como difusible y emenagogo.

La siguiente descripción de los usos del orégano se realizó en el año de 1888 por Fray Francisco Ximénez en su obra Libros de la Naturaleza, con idénticas indicaciones a las consignadas por Fray Juan Navarro.

**Tabla 2.** Preparados medicinales que contienen orégano descritos en la Farmacopea Mexicana (1846).

<b>Preparado</b>	<b>Contenido</b>	
<i>Alcoholatum nicotianae compositum</i>	hojas secas de tabaco	seis onzas
	orégano	de cada cosa cuatro onzas
	salvia	
	sauco	
	alhucema	
	aro	
	pimienta negra	
	mostaza	
	romero	
	euforbio	de cada cosa dos onzas
castor		
alcohol al 21°	doce libras	
<b>Usos y dosis:</b> al exterior contra la parálisis, los reumáticos crónicos, etc.		
<i>Alcoholatum pyrethri compositum</i>	raíz de perite	una onza
	sasafrás	media onza de cada cosa
	hojas de tabaco	
	tomillo	tres dracmas de cada cosa
	orégano	
	clavo	
	alcanfor	dos escrúpulos de cada cosa
	opio	
alcohol al 32°	cuatro libras	
<b>Usos y dosis:</b> contra la odontalgia		
<i>Vinum lavandulae compositum</i>	flores de alhucema	cuatro onzas
	hojas de ajeno del país	una onza de cada cosa
	hojas de romero	
	hojas de orégano	
	hojas de salvia	
	vino rojo	cuatro libras
	alcoholado de cidras compuesto	cuatro onzas
<b>Usos y dosis:</b> al exterior como tónico y resolutivo		
<i>Emplastrum lavendulae compositum</i>	polvos de alhucema	media libra de cada cosa
	pimienta de Tabasco	
	canela	dos onzas de cada cosa
	clavo	
	jengibre	
	orégano	cuatro onzas de cada cosa
	anís	
	romero	
	copal blanco	cuatro libras
	aceite aromático	una id.
	pez	una y media id.
	cera amarilla	cuatro id.
liquidámbar	seis onzas de cada cosa	
bálsamo negro		
<b>Usos y dosis:</b> piel divina		

En el año de 1902, el Prof. Juan Manuel Noriega en su libro *Historia de Drogas*, describe los usos de *O. vulgare*, planta vivaz comúnmente esparcida en los bosques secos y montuosos de Europa, que se encuentra también en México como *Lippia originaides* H.B.K. (Verbenaceae), con las mismas propiedades como estimulante difusible y emenagogo, además de su uso como tónico y excitante.

En 1989, Maximino Martínez, consigna los usos de la especie *Lippia berlandieri* Schawer, como un condimento, especialmente para el pozole y, en la medicina popular como estimulante, emenagogo y demulcente. También menciona el uso del cocimiento contra el “dolor de estómago” y la diarrea, y de la infusión alcohólica en fricciones “contra ataques”.

Finalmente, otros autores describen los usos de las especies *P. longiflora* o *L. graveolens* para tratar infecciones en general, diabetes, desórdenes menstruales enfermedades respiratorias y digestivas, incluyendo tos crónica, bronquitis y asma, así como el dolor de estómago, diarrea, indigestión, obstrucción biliar (Compadre *et al.*, 1982; Cáceres *et al.*, 1991, 1993; Forestieri *et al.*, 1996; Waizel y Waizel, 2009; Jiménez-Merino, 2011).

El resto de usos medicinales referidos al orégano en México consideran únicamente a la especie *O. vulgare*. Así, Hernández consigna a esta planta para “curar la parálisis, y como remedio contra las disenterías y otras enfermedades causadas por el frío”. En la obra del INI (1994) también se señala que de acuerdo con Gregorio López, el orégano común tiene usos “contra la mordedura de serpientes, purga melancolía, aprovecha a pasmos, ruptura de nervios e hidropesía. Provoca menstruación y es bueno contra la tos; sana agallas hinchadas, llagas de boca, campanilla y dolor de oídos, hace a la mujer fecunda, es útil contra la ronquera, purga cólera, provoca orina y cámara; aprovecha a bazo enfermo, hastío, requeldos azedos; resuelve hinchazón, es contra tos antigua y apostemas de pulmones”. A inicios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer se refirió a este orégano como “utilizado contra vómito, desgano de comer, obstrucción de hígado, hidropesía, almorranas, tullimiento y sordera”. Vicente Cervantes indicó los usos de esta especie como “corroborante, astringente, disolvente, estimulante, se usa contra la tos, asma, tisis y edemas” (Argueta *et al.*, 1994). Finalmente, Jiménez-Merino (2011) indica el uso de la infusión de la planta para curar diarrea, tos, asma, vómitos, empachos, catarros crónicos,

reumatismo, cólicos menstruales, inflamación del hígado y para regular la menstruación. El aceite se aplica con un algodón en caso de dolor de muelas.

En el año 2007, en el Manual de Fitoterapia, se describen las propiedades tónicas, digestivas y antiespasmódicas y, expectorantes de este orégano. También sus usos como diurético, antiséptico y cicatrizante y, en las digestiones difíciles y los síntomas asociados, como aerofagia, espasmo abdominal y flatulencias, además de su uso frecuente en la culinaria, para adobos y para aromatizar diversos guisos (Castillo y Martínez, 2007).

De lo anterior se desprende que el uso medicinal de *P. longiflora* se basa en su uso como un sustituto del orégano y lamentablemente no existen referencias al respecto.

#### **2.4 Antecedentes botánicos de *P. longiflora*.**

El género *Poliomintha* fue descrito por vez primera en el año de 1870 por A. Gray, quién lo separó del género *Hedeoma* para describir a las especies *P. longiflora* y *P. incana* (romero del desierto). Posteriormente, entre los años 1870 y 1940 cuatro especies más fueron clasificadas dentro de este género, *P. bicolor*, *P. marifolia*, *P. glabrescens* (romero frondoso) y *P. conjunctrix*. En la actualidad, se conocen diez especies que pertenecen a dicho género e incluyen: *P. bustamanta*, *P. dendritica*, *P. mollis*, *P. maderensis* y *P. longiflora* var. *congesta*, además de las mencionadas anteriormente. Éstas especies se localizan en el continente americano desde el sureste de los Estados Unidos hasta el noreste de México en los estados de Chihuahua, Coahuila, Monterrey y San Luis Potosí (Irving, 1972; Henrickson, 1982).

*P. longiflora* es un arbusto pequeño de hasta 1 m de alto, bisexual y perenne que habita en climas áridos o semisecos. Sus hojas son ovaladas o rómbicas, miden entre 6 y 9.5 mm de largo por 4–5 mm de ancho, con base atenuada, aguda en el ápice, verde oscuro, pecíolos delgados de hasta 1 mm, de venación inconspicua. Las flores solitarias miden 3 mm de largo y entre 1 y 4 mm de ancho y son rosadas con cáliz amórficos, con pedicelos delgados de 3 mm de largo, con tallos ramosos, glabrosos y tomentosos (**Figura 4**).

En Nuevo León, *P. longiflora* es la especie de orégano más importante y comercializada en los distintos centros de la población donde lo cosechan, en los centros comerciales y en los mercados del área metropolitana de Monterrey. Se considera el mejor



orégano del país. En el municipio de Higueras, se celebra cada año la feria anual del orégano en Semana santa, dedicada a las familias que recolectan el orégano en la Sierra de Picachos, donde permanecen por períodos hasta de quince días para cortar el codiciado condimento, secarlo y, posteriormente, venderlo (Alanís Flores *et al.*, 2008).



a)



b)



c)

**Figura 4.** a) Muestra de herbario, b) partes aéreas y c) flores de *P. longiflora* (tomadas del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, UNAM).



El orégano tiene dos usos principales: como condimento y como materia prima para la producción de aceites esenciales, utilizados como aditivo en las industrias de alimentos, químico-farmacéutica y de perfumes. También, las hojas aromáticas de esta especie se utilizan a menudo como condimento a lo largo de toda su área de distribución. Al menos en el sureste de México, en la Huasteca Potosina y en el Estado de México, las plantas se cultivan en huertos familiares.

Sin embargo, las poblaciones de los estados de Coahuila, Chihuahua y Nuevo León son la fuente del “orégano mexicano”, quizás el principal condimento de la cocina del occidente y norte de México. En la actualidad, es un producto exportado a todo el mundo, principalmente a los Estados Unidos y a los países mediterráneos. De acuerdo con la SEMARNAT, México es el principal productor de oréganos en el mundo, por encima de países como Grecia y Turquía. Se estima que nuestro país exporta cerca del 85% de su producción de orégano a los Estados Unidos y un 5% a Europa.

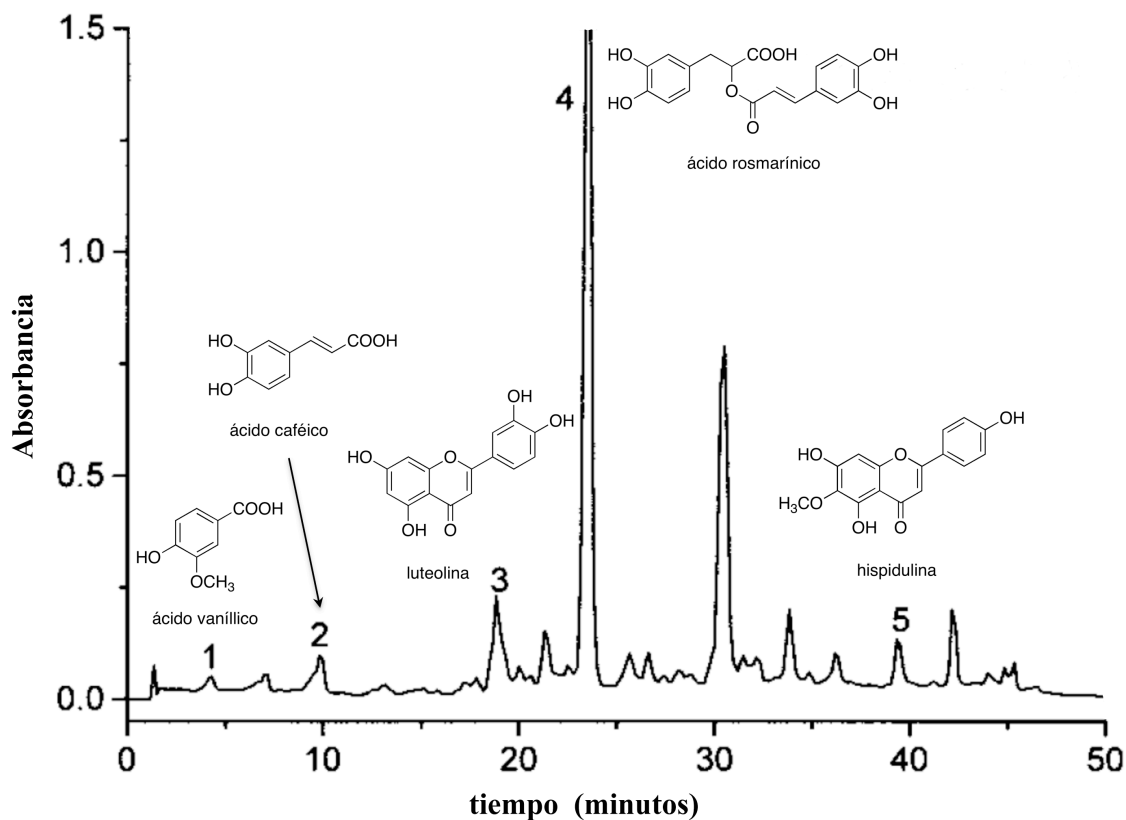
Las características aromáticas del “orégano mexicano” son ligeramente distintas del orégano verdadero, *O. vulgare*, el cual pertenece a la familia de las labiadas. Curiosamente, el “orégano mexicano” ha desplazado el uso del orégano verdadero, incluso en Grecia, Italia y Turquía, países de origen del orégano verdadero, y que son los principales importadores de este condimento después de Estados Unidos (Alanís Flores *et al.*, 2008).

## **2.5 Estudios químicos y farmacológicos de *P. longiflora*.**

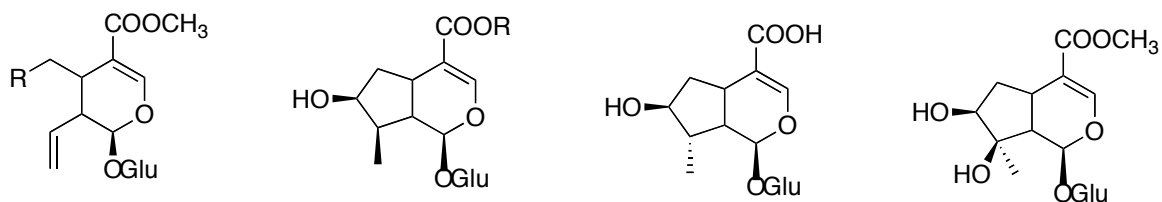
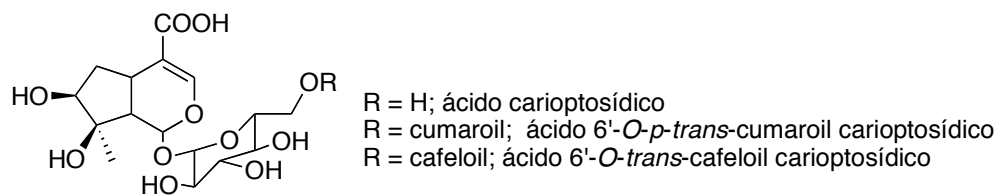
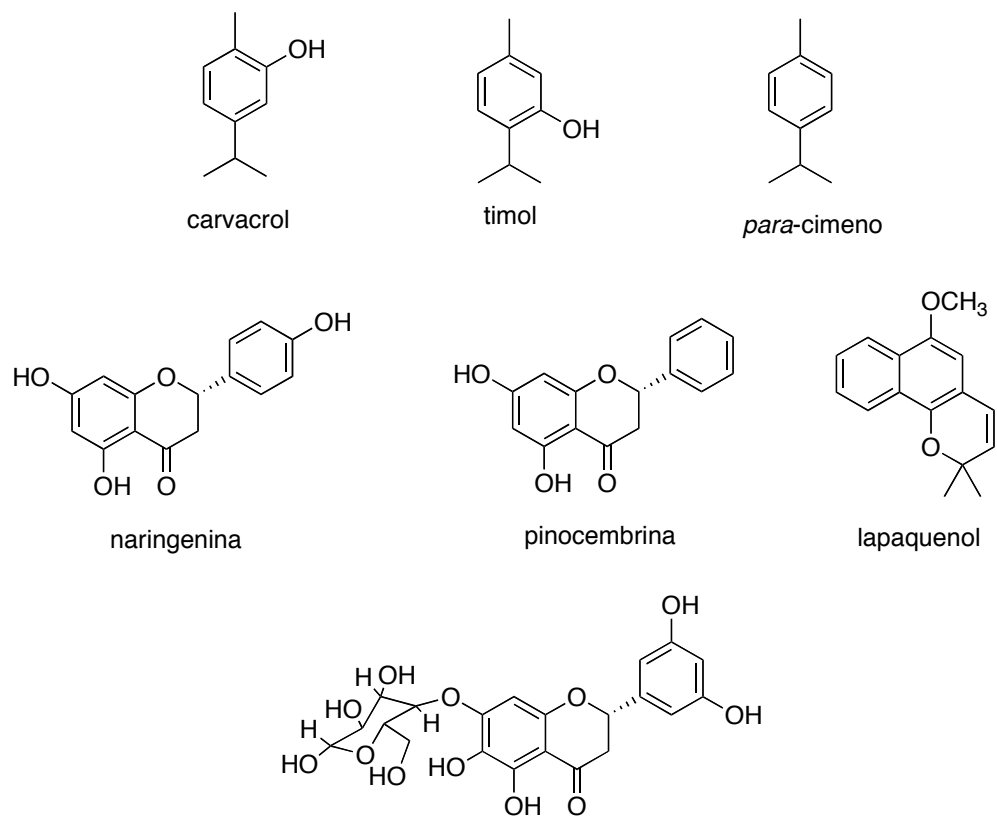
Desde el punto de vista farmacológico, *P. longiflora* no ha sido objeto de estudio alguno, sin embargo, una investigación realizada en el año 2001 por Zheng y Wang, permitió establecer su potencial antioxidante y la identificación por CLAE de los ácidos vainílico, caféico y rosmarínico, así como de los flavonoides luteolina e hispidulina (**Figura 5**).

En contraste, la especie dominante del complejo *L. graveolens*, ha recibido una mayor atención. Los estudios químicos realizados a la fecha se enfocan en el análisis de la composición del aceite esencial. Los metabolitos más importantes identificados en las esencias son el carvacrol, el timol y el *p*-cimeno (Rocha-Guzmán *et al.*, 2007). Otros productos aislados y caracterizados a partir de esta especie son de tipo flavanona

(naringenina y pinocembrina), naftalenos y monoterpenoides de tipo iridoide (**Figura 6**) (Domínguez *et al.*, 1989; Rastrelli *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Metabolitos identificados por CLAE a partir de un extracto acuoso de *P. longiflora* (tomado de Zheng y Wang, 2001).



R = CHO; secologanina  
 R = COOH; secoxiloganina  
 R = COOMe; dimetilsecologanósido

R = H; ácido logánico  
 R = Me; loganina

ácido 8-*epi*-logánico

carioptosído

**Figura 6.** Metabolitos secundarios aislados a partir de *Lippia graveolens*.

## 3. Hipótesis y Objetivos

### 3.1 Hipótesis

- Si las especies *Poliomintha longiflora* y *Lippia graveolens* pertenecen al mismo complejo de plantas medicinales éstas deben presentar una composición química, incluyendo los principios activos similares.

- Los usos populares medicinales mejor documentados de *P. longiflora* sugieren la presencia en la planta de principios antiespasmódicos, analgésicos, antiinflamatorios, antibacterianos y antidiabéticos.

### 3.2 Objetivos

Los objetivos primordiales del presente trabajo consisten en establecer la eficacia preclínica, la inocuidad y las pruebas de control de calidad que permitan establecer el fundamento científico del uso indistinto de *P. longiflora* y *L. graveolens*. También, se pretende generar la información necesaria para redactar sus monografías tipo OMS y farmacopéica que garanticen el uso racional de la planta.

Para el cumplimiento del objetivo principal, se formularon los siguientes objetivos específicos:

a) Establecer de manera preliminar la inocuidad de *P. longiflora* y *L. graveolens* mediante la evaluación de su toxicidad aguda y genotoxicidad de acuerdo a las metodologías de Lorke y Ames, respectivamente. También se determinará el efecto de los extractos sobre la viabilidad del crustáceo *Artemia salina* L.

- b)** Cuantificar la actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivo y Gram negativo de extractos y aceites esenciales de *P. longiflora* y *L. graveolens* mediante el método de microdilución.
- c)** Determinar el potencial analgésico de las drogas crudas (extractos orgánicos y aceite esencial) mediante las pruebas de nocicepción convencionales (placa caliente y estiramiento abdominal).
- d)** Establecer el potencial espasmolítico *in vivo* e *in vitro* de los extractos y aceite esencial de *P. longiflora* y *L. graveolens* utilizando los modelos del tránsito gastrointestinal en ratones y del ileón aislado del cobayo, respectivamente.
- e)** Establecer el potencial antidiabético de los extractos de los dos oréganos mexicanos mediante la realización de estudios agudos y de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa en ratones.
- f)** Determinar la naturaleza y estructura molecular de los compuestos activos de *P. longiflora* presentes en los extractos y/o aceite esencial mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales.
- g)** Establecer los parámetros de identidad de las drogas crudas mediante el establecimiento de los compuestos marcadores y perfiles cromatográficos.
- h)** Desarrollar y validar un método analítico apropiado para cuantificar los principios activos y/o marcadores de las esencias y/o extractos de ambos oréganos aplicando las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y de líquidos de alta eficiencia.

## 4. Parte experimental

### 4.1 Material vegetal.

Las partes aéreas de la especie medicinal *Poliomintha longiflora* A. Gray (Lamiaceae) fueron recolectadas en la Sierra de Real de Catorce, estado de San Luis Potosí, México, en Noviembre del 2005 [Lote 1, voucher (Bye & Linares 33919)] y en Noviembre del 2006 [Lote 2, voucher (Bye & Linares 33925)]. Un tercer lote de la especie *P. longiflora* fue proporcionado por un productor local en el estado de Coahuila, México, en el mes de Noviembre del año 2007 (Lote 3). La especie *Lippia graveolens* Kunth (Verbenaceae), utilizada en este estudio con fines comparativos, se adquirió en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México, en Agosto del año 2008. Un segundo lote de *L. graveolens* se recolectó en el municipio de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, en el mes de Noviembre de 2010 (Cristians–98). La identidad y la clasificación de ambas especies fue establecida por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares (Instituto de Biología, UNAM).

### 4.2 Preparación de los extractos orgánicos.

La preparación de los extractos orgánicos en mediana escala de las especies objeto de este estudio se realizó a partir del material vegetal seco y molido (1.2 kg), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente, utilizando una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –MeOH (1:1). El proceso se repitió tres veces obteniéndose 250 g de un residuo verde oscuro.

La preparación de los aceites esenciales se realizó mediante la técnica de hidrodestilación a partir de 150 g de material vegetal seco o fresco. Al término de la extracción, la esencia se separó del destilado, mediante un proceso de partición con diclorometano. La fase orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró al vacío.

Finalmente, los extractos acuosos se prepararon mediante la técnica de infusión a partir de las partes aéreas de la especie, seguida de sucesivas particiones utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente.

### **4.3 Ensayos de inocuidad.**

#### **4.3.1 Toxicidad aguda en ratones.**

La evaluación de la toxicidad aguda potencial de los extractos orgánicos y el aceite esencial de *P. longiflora* se estableció de acuerdo con el procedimiento de Lorke (1983). El ensayo se realizó en ratones macho de la cepa ICR (20–25 g) adaptados a las condiciones del bioterio y con ocho horas de ayuno. El análisis se realizó en dos fases: en la primera los animales se trataron con 10, 100 y 1000 mg/kg de peso de cada preparado; en la segunda fase, los animales recibieron dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg de peso de los mismos tratamientos. Cada administración se efectuó por vía oral y por triplicado. Como control se utilizó un grupo de ratones que sólo fueron tratados con solución salina isotónica 0.9% (m/v) por la misma vía. En las dos fases experimentales, los animales se observaron durante 14 días. Al término del ensayo, los animales sobrevivientes se sacrificaron por dislocación cervical, para realizar una disección en el abdomen y así aislar los órganos vitales (hígado, riñón, corazón y estómago). A continuación se analizaron macro- y microscópicamente los órganos aislados con la finalidad de poder observar algún daño o alteración. Los animales que fallecieron en el transcurso del experimento también fueron sometidos al mismo análisis *post-mortem*. La  $DL_{50}$  (dosis que produce la mortalidad del 50% de los animales evaluados) se determinó mediante la media geométrica de las dosis ensayadas (Lorke, 1983).

#### **4.3.2 Toxicidad contra *Artemia salina* L.**

La toxicidad de los extractos orgánicos, así como, de las esencias contra el crustáceo *A. salina* L. se evaluó siguiendo la metodología descrita por Wha (1993), utilizando como control positivo el alcaloide colchicina. Brevemente, el ensayo se realizó preparando tres diferentes concentraciones de las muestras a evaluar (10, 100 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Enseguida, un mL de cada una de las diluciones de prueba se transfirió a un vial por separado y se evaporó el disolvente hasta sequedad a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por triplicado para cada concentración de prueba. Una vez evaporado el disolvente, se adicionaron 0.5 mL de MeOH a cada vial, agitando suavemente para favorecer la disolución de la muestra y se

aforó a 5 mL con salmuera. Posteriormente, se trasladaron 10 crustáceos con 48 horas de incubación en salmuera a cada uno de los viales y estos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes. El cálculo de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se realizó de acuerdo con la metodología descrita en la literatura (Wha, 1993).

#### **4.4 Ensayos de eficacia.**

##### **4.4.1 Actividad antimicrobiana.**

La actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales de los oréganos se determinó empleando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Appendino *et al.*, 2008) contra bacterias Gram positivo [*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)] y Gram negativo [*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y *Salmonella typhi* (ATCC 9992)]. Todos los microorganismos fueron proporcionados por el Cepario de la Facultad de Química, UNAM. Como medio de cultivo se utilizó caldo Müller-Hinton (MH). Este caldo se esterilizó en una autoclave a 121°C y 15 lb/cm<sup>2</sup>, durante 20 min.

Los ensayos correspondientes se efectuaron en placas de Elisa de 96 pozos. Cada pozo contenía 125 µL del medio de cultivo MH y 125 µL de una suspensión del microorganismo de prueba en solución salina, ajustada al 0.5% ( $1 \times 10^8$  células/mL) del estándar turbidimétrico de McFarland. Los pozos de las filas A–J contenían además 250 µL de las muestras a evaluar a las concentraciones de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1024 µg/mL disueltas en DMSO (12.5%). Las últimas filas de pozos (K–L) fueron utilizados como controles de esterilidad y/o de crecimiento. Las cajas se incubaron por 24 horas a 37 °C. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada como la menor concentración en la que no se observó crecimiento del microorganismo ensayado. Como control positivo se utilizó ampicilina.



#### 4.4.2 Potencial antiespasmódico.

##### 4.4.2.1 Modelo del tránsito intestinal en ratones.

La evaluación del potencial espasmolítico *in vivo* se realizó mediante la evaluación del efecto de las esencias, extractos y compuestos mayoritarios sobre el tránsito gastrointestinal en ratones macho de la cepa ICR con libre acceso a agua y con ayuno de 8 horas. Al cabo del período de ayuno, todos los animales recibieron por vía oral 0.3 mL de una suspensión de carbón activado al 10% en una suspensión acuosa de goma arábica (5%). Quince minutos después, se realizó la administración de los diferentes tratamientos (extractos orgánicos, aceite esencial o compuestos puros) suspendidos en solución salina (0.05% de Tween80) (1.0–316 mg/kg, *p.o.*). El grupo control positivo recibió loperamida (8 mg/kg) y el blanco solución salina (0.05% de Tween80). Finalmente, veinte minutos posteriores a la administración de la solución marcadora, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó una disección en el abdomen con la finalidad de extraer la porción del intestino delgado, desde el píloro hasta el yeyuno. El porcentaje de inhibición del tránsito gastrointestinal (PGT) se determinó midiendo la distancia recorrida por el carbón activado a lo largo del intestino de todos los tratamientos con respecto al control, utilizando la expresión matemática que se indica a continuación:

$$PGT = (Dc / Dt) \times 100$$

$$\% \text{ inhibición} = (PGT_1 - PGT_2) / PGT_1 \times 100$$

*Dc*: distancia recorrida por el control; *Dt*: distancia recorrida por el tratamiento

*PGT*<sub>1</sub>: vehículo; *PGT*<sub>2</sub>: tratamientos

##### 4.4.2.2 Modelo del íleon aislado de cobayo.

Los segmentos de íleon se obtuvieron de cobayos machos (200–250 g), en ayuno de 12 horas con libre acceso a agua. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se realizó una disección en el abdomen para aislar el íleon (10–12 cm). El íleon aislado se limpió y se cortó en segmentos de 1 a 1.5 cm. Los segmentos se colocaron en una solución de Krebs con la siguiente composición (mM): NaCl 118.1, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 2.4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 y glucosa 11.1. La solución se preparó con

agua destilada, el pH se ajustó a 7.4 y se mantuvo constantemente burbujeada con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) a 37 °C. Enseguida, los segmentos de íleon se colocaron en una cámara de incubación con 10 mL de solución de Krebs burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5) a una temperatura de 37 °C que se mantuvo mediante un baño recirculador. En estas condiciones, el tejido se sujetó de un extremo al piso de una cámara de órgano aislado y, del otro, a un transductor de fuerza Grass FT 03E conectado a un polígrafo MP100 Manager Biopac System. Los datos se obtuvieron mediante el software *AcqKnowledge*<sup>®</sup> versión 3.7.3.

El tejido se sometió a una tensión inicial de 1 g y se estimuló con 100 µL de carbacol (1 × 10<sup>-4</sup> M), en tres ocasiones y en intervalos de 30 min. Posterior a cada estímulo, el tejido se lavó tres veces con solución de Krebs con intervalos de 10 min entre cada lavado para permitir su recuperación.

Para evaluar el efecto antiespasmódico de los extractos orgánicos y el aceite esencial de los oréganos, en primer lugar, se adicionó en experimentos independientes 100 µL de un espasmógeno [carbacol (1 × 10<sup>-4</sup> M) o histamina (1 × 10<sup>-3</sup> M)] a la preparación, y se registró la actividad durante un período de tres minutos. La actividad registrada se consideró como el 100% de respuesta. Al cabo de este tiempo, los tejidos se lavaron con la solución de Krebs, en tres ocasiones y, con intervalos de 10 min entre cada lavado para permitir su recuperación. Posteriormente, se adicionó a la preparación 100 µL de la muestra a evaluar a las concentraciones finales de 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 µg/mL y el tejido se incubó durante 10 min. Después de la incubación, se adicionaron nuevamente 100 µL del mismo espasmógeno agregado inicialmente y la respuesta se registró durante tres minutos. Como controles positivos se utilizaron dos conocidos agentes antiespasmódicos el bromuro de ipratropium y el clorhidrato de difenhidramina. Para disolver las muestras se utilizó agua destilada y trazas de DMSO.

El cálculo de la CI<sub>50</sub> (concentración inhibitoria necesaria para disminuir la respuesta farmacológica en un 50%) para antagonizar una respuesta fija del espasmógeno de prueba se realizó a partir de las curvas concentración-respuesta (SigmaPlot versión 9.0) mediante un análisis de regresión no lineal (modelo de efecto máximo o Ecuación de Hill). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANADEVA) de una vía en el

programa SigmaStat versión 3.10, considerando diferencias significativas para una  $*p < 0.05$ .

#### **4.4.3 Potencial antinociceptivo.**

El potencial antinociceptivo se evaluó utilizando las pruebas de la placa caliente y del estiramiento abdominal, de acuerdo con los protocolos experimentales ya establecidos (Ulku *et al.*, 2006). En todos los experimentos se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso de 25 a 30 g. Como controles positivos se utilizaron morfina (placa caliente) y dipirona (estiramiento abdominal) (Déciga-Campos *et al.*, 2007a).

##### **4.4.3.1 Prueba de la placa caliente.**

Brevemente, este experimento se realizó sobre una placa caliente a la temperatura de  $55.5 \pm 0.2$  °C previa adaptación de los animales al entorno del experimento. Para ello, un día previo y momentos antes de iniciar el experimento, el conjunto animal-cilindro se colocó sobre la placa de calentamiento (apagada) durante 20 minutos. Enseguida, se realizó la administración de cada uno de los tratamientos en un intervalo de dosis entre 100 y 600 mg/kg; 30 minutos posteriores a la administración se aplicó el estímulo térmico. Para este ensayo se utilizó morfina (5 mg/kg) como control positivo (Angeles-López *et al.*, 2010).

##### **4.4.3.2 Prueba del estiramiento abdominal.**

En este experimento se realizó la evaluación de la nocicepción utilizando como sustancia algésica ácido acético glacial 0.6% *i.p.* La dipirona (100 mg/kg), el vehículo y los diferentes tratamientos (31.6–316 mg/kg), se administraron por vía oral 30 minutos antes del estímulo químico. Inmediatamente después de la administración del ácido acético, se contó el número de estiramientos presentados para cada tratamiento, a intervalos de 5 min, por un período de media hora (Angeles-López *et al.*, 2010).

#### **4.4.4 Evaluación del potencial antidiabético.**

La evaluación del efecto antihiper glucémico del extracto íntegro y las infusiones de los oréganos mexicanos se llevó a cabo utilizando las pruebas de tolerancia a los carbohidratos glucosa (OGTT) y sacarosa (OSTT) en animales normoglucémicos y diabéticos de acuerdo con los protocolos experimentales previamente establecidos (Williamson *et al.*, 1996; Cristians *et al.*, 2009; Brindis *et al.*, 2011). En todos los experimentos se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso entre 25–30 g y con un ayuno de 8 horas. Como controles positivos se utilizaron glibenclamida (OGTT) y acarbosa (OSTT).

Para su administración, todos los tratamientos fueron suspendidos en una solución salina con Tween80 al 0.05% y fueron administrados por vía oral utilizando una sonda orogástrica. Previa a la administración de todos los tratamientos se tomaron muestras de sangre a las 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas a partir de la vena caudal de los animales a través de una pequeña incisión en la parte final de la cola del ratón. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron por el método enzimático de la glucosa oxidasa utilizando un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson-Jonhson, Milpitas, CA., USA). Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL), se verificó si los animales presentaron una disminución del pico posprandial, relacionado con la administración de los tratamientos.

##### **4.4.4.1 Modelo de diabetes mellitus tipo 2.**

Los ratones macho (15–20 g) de la cepa ICR, se diabetizaron con una dosis *i.p.* de estreptozotocina (STZ, 100 mg/kg) previa administración del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD; 50 mg/kg, *i.p.*) (Masiello *et al.*, 1998).

#### **4.4.5 Efecto agudo hipoglucemiante.**

La evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos íntegros de los oréganos se realizó mediante un experimento de tipo agudo, utilizando animales normoglucémicos y diabéticos. Como control positivo se utilizó glibenclamida (10 mg/kg).

Una vez administrados todos los tratamientos se tomaron muestras de sangre a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas utilizando la misma estrategia metodológica indicada en el inciso anterior. Una vez obtenidos los valores de las lecturas de glucosa sanguínea (mg/dL) se calcularon los porcentajes de variación de glucemia utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = [(Gi - Gt) / Gi] \times 100$$

*Gi*: valor de glucemia inicial; *Gt*: valor de glucemia a las 0, 1.5, 3, 5, 7, 9

#### **4.5 Análisis estadístico.**

Los resultados experimentales de los ensayos farmacológicos de eficacia preclínica realizados en la presente investigación se encuentran expresados como el promedio de ocho réplicas  $\pm$  diferencia mínima significativa para cada tratamiento, en las distintas dosis analizadas. En cada experimento, siempre se empleó un control negativo (vehículo) y un control positivo (fármaco). En los gráficos correspondientes se presentan los resultados de las evaluaciones del efecto antinociceptivo [no. de estiramientos vs tiempo (estiramiento abdominal) y del área bajo la curva expresada como ABC vs tiempo (placa caliente)] y antidiabéticas [% de variación de la glucemia/ABC vs tiempo]. En todos los casos se analizaron los datos experimentales mediante un análisis de varianza (ANADEVA) con un valor de significancia de  $*p < 0.05$ , utilizando el programa estadístico Prisma Graph-Pad versión 4.0. En todos los casos se realizó una prueba *t* de Dunnet para encontrar las diferencias verdaderamente significativas entre los grupos de prueba y los grupo control ( $*p < 0.05$ ).

#### **4.6 Análisis cromatográficos.**

La cromatografía en columna abierta (cca) se realizó utilizando gel de sílice como adsorbente (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063–0.200  $\mu\text{m}$ , malla de 70–230 mm ASTM). Los análisis cromatográficos cualitativos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor

recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla de 3.5–7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones y empleando diversos sistemas de elución (Ettre y Kalasz, 2001; Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008). Como agente cromógeno se empleó una solución de sulfato de cerio amoniacal.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo Waters<sup>®</sup> (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector UV Dual (2487). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower<sup>®</sup> versión 2.0 (Waters). Los análisis se realizaron en columnas empacadas con gel de sílice Synergi Hydro-RP C-18 4 µm (Phenomenex<sup>®</sup>) [4.6 × 250 mm, 1.0 mL/min] y Hibar LiChrospher-RP C18 5 µm (Merck<sup>®</sup>) [4.6 × 250 mm, 0.6 mL/min]. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente. Las longitudes de onda ( $\lambda$ ) utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 265 y 280 nm.

La cromatografía de gases (CG) se realizó en un cromatógrafo Agilent<sup>®</sup> 6890N (Agilent Technology, Palo Alto, Calif., USA) equipado con un detector de masas (LECO-TOF). Todos los análisis se realizaron en una columna capilar DB-5 0.18 µm (Supelco<sup>®</sup>) [0.18 mm × 10 m] utilizando un gradiente de temperatura desde 40 hasta 340 °C (4 °C/min; 40 minutos). El helio se utilizó como gas acarreador (1 mL/min). La identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizó mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología desarrollada por Kováts que describe el uso de una serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>) (Van Del Dool y Kratz, 1963). En algunos casos, se realizó la coelución de las muestras con estándares disponibles comercialmente, y mediante la comparación de los espectros de masas con aquellos reportados en la base de datos (NIST, Diciembre 2005).

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) se realizó con fibras de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de un cm de longitud (100 µm; Supelco<sup>®</sup> Technology, St. Louis, Mo., U.S.A.). Previo a cada análisis, todas las fibras fueron acondicionadas en el CG a 250 °C durante dos horas. El proceso de extracción se realizó durante 10 minutos a temperatura ambiente, a partir de 500 mg del material vegetal seco o fresco, 75 mg de NaCl y 5 mL de agua destilada. Transcurrido el tiempo de extracción, la fase sólida se introdujo

en el CG para su subsecuente análisis, utilizando las mismas condiciones analíticas indicadas en el párrafo anterior. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### **4.7 Caracterización de los productos naturales.**

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 400 MHz ( $^1\text{H}$ )/100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) se registraron en un espectrómetro Varian Innova 500. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

Los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico (EM-IE) se generaron en un espectrómetro de masas JEOL JMSAX505HA utilizando el método de introducción directa a 70 eV y un barrido de 33 a 700 unidades de masa-carga ( $m/z$ ) por segundo. El registro de los espectros de RMN y EM se efectuó en la Facultad de Química de la UNAM.

#### **4.8 Estudio químico de *Poliomintha longiflora*.**

##### **4.8.1 Fraccionamiento del extracto orgánico.**

El extracto orgánico total (200 g) se sometió a un proceso de fraccionamiento utilizando una cromatografía en columna abierta (cca) sobre gel de sílice (2.5 kg) y como fase móvil mezclas en orden creciente de polaridad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH [(1:0)  $\rightarrow$  (1:1)]. Este proceso generó un conjunto de diez fracciones primarias ( $\text{F}_1$ - $\text{F}_{10}$ ).

##### **4.8.2 Aislamiento, purificación e identificación del carvacrol (1).**

De la fracción primaria  $\text{F}_2$  [725 mg;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1)] se obtuvieron 500 mg de un aceite amarillo, identificado como el carvacrol (**1**).

##### **4.8.3 Aislamiento e identificación de los ácidos ursólico (2) y oleanólico (3).**

La resolución cromatográfica de 5.3 g de un sólido blanco, que cristalizó de manera espontánea de las fracciones primarias  $\text{F}_7$ - $\text{F}_9$  [50 g;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1)], por cromatografía en capa fina (ccf) permitió el aislamiento de los ácidos ursólico (**2**; 2.6 g; 0.10%) y oleanólico (**3**; 3.2 g; 0.14%).

#### **4.8.4 Estudio químico de la infusión.**

##### **4.8.4.1 Fraccionamiento preliminar del extracto acuoso.**

El extracto orgánico obtenido a partir de la infusión (800 mg) se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (43.0 g). La fase móvil consistió de mezclas de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [(4:6) → (0:1)] y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH [(1:0) → (9:1)] de polaridad creciente. Este proceso generó un conjunto de 15 fracciones primarias (F<sub>1A</sub>-F<sub>15A</sub>).

##### **4.8.4.2 Aislamiento e identificación del carvacrol (1).**

La resolución de la fracción primaria F<sub>3A</sub> [50 mg; Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35:65)] mediante ccf [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (99:1)] permitió el aislamiento de 30 mg de un aceite amarillo identificado como el carvacrol (1).

##### **4.8.4.3 Aislamiento e identificación de la luteolina (4) y la apigenina (5).**

La resolución de las fracciones primarias F<sub>13A</sub> y F<sub>14A</sub> [86 mg; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5)] por ccf [CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-HCOOH (60:35:5)] permitió el aislamiento de la luteolina (15 mg; 4) y la apigenina (20 mg; 5).

#### **4.8.5 Estudio químico del aceite esencial.**

La separación de los constituyentes presentes en el aceite esencial [5 g], se realizó mediante un análisis cromatográfico por cca; la elución se efectuó con una mezcla binaria de hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en orden creciente de polaridad [(1:0) → (0:1)]. Este procedimiento permitió el aislamiento y la purificación del carvacrol (1; 1.0 g) como el componente mayoritario presente en la esencia.

#### **4.9 Determinación simultánea de los principios marcadores.**

Los análisis cromatográficos cuantitativos por CLAE se realizaron en una columna empacada con gel de sílice Synergi Hydro-RP C-18 4 µm (Phenomenex®) [4.6 × 250 mm, 1.0 mL/min] con un tamaño de partícula de 5 µm. Como sistema de elución, se utilizó un



sistema isocrático de CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (55:45). Las longitudes de onda ( $\lambda$ ) utilizadas para la detección de los tres metabolitos fueron de 265 y 280 nm, las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los tiempos de retención ( $t_R$ ) de **6**, **1** y **7** bajo estas condiciones, fueron de 17.43, 20.07 y 53.41 minutos, respectivamente.

#### **4.9.1 Preparación de la matriz de trabajo.**

El aceite esencial (10 mg) de *P. longiflora* o *L. graveolens* preparado por la técnica de hidrodestilación se disolvió en cuatro mL de CH<sub>3</sub>CN. La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc<sup>®</sup> 0.45  $\mu$ m y de 13 mm de diámetro y se analizaron por cromatografía de líquidos.

#### **4.9.2 Adecuabilidad del sistema.**

El ajuste del sistema cromatográfico se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de una solución de referencia con una concentración de 0.5 mg/mL. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del coeficiente de variación (CV), factor de capacidad ( $K'$ ), resolución (R), factor de coe (T) y número de platos teóricos (N).

#### **4.9.3 Linealidad del sistema.**

La linealidad del sistema se determinó construyendo tres diferentes curvas de calibración (concentración vs absorbancia) de acuerdo con el siguiente procedimiento: 5.0 mg de la referencia [carvacrol (**1**) o timol (**6**)] se disolvieron en 1 mL de CH<sub>3</sub>CN (5.0 mg/mL); 50.0 mg de la referencia [*p*-cimeno (**7**)] se disolvieron en 1 mL de CH<sub>3</sub>CN (50.0 mg/mL). A partir de las soluciones anteriores, se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de las mismas contengan entre 0.01 y 0.1 mg de la referencia **1** ó **6** y entre 0.1 y 1.0 mg de la referencia **7**. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de la referencia a cuantificar, se graficó con respecto a la concentración de cada referencia (**1**, **6** y **7**) en cada solución. El cálculo de la ordenada al origen ( $b_0$ ), la pendiente de la recta ( $b_1$ ), el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los

siguientes criterios:  $b_0 = 0$ ;  $b_1 \neq 0$ ;  $r \geq 0.99$ ;  $r^2 \geq 0.98$  e IC ( $\beta_1$ ; que no incluye el cero). Las muestras se analizaron por triplicado.

#### 4.9.4 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de diluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg/mL y cinco muestras blanco. Las diluciones contenían 0.01, 0.1 y 0.25 mg/mL de la referencia a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva del pico (ABC) correspondiente al pico de la referencia de cada réplica se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada solución. Para el cálculo  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $r$  y  $r^2$ , se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

#### 4.9.5 Exactitud.

La evaluación de la exactitud del método se realizó mediante la adición de tres diferentes concentraciones de los estándares **1** y **6** comprendidas en el intervalo entre 0.01 y 0.1 mg/mL y del compuesto **7** en un intervalo entre 0.1 y 1.0 mg/mL a la matriz de trabajo. Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se interpolaron en la curva de calibración desarrollada en el inciso **4.9.3**. Los resultados obtenidos fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ( $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 3\%$ ) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la pendiente [IC( $\beta_1$ )] del % de recobro.

#### **4.9.6 Precisión.**

La precisión del sistema o repetibilidad se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución de referencia. Por otra parte, la precisión del método o precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de seis réplicas a dos concentraciones diferentes de las referencias (**1, 6**; 0.05 y 0.1 mg/mL) y (**7**; 0.5 y 1.0 mg/mL) adicionadas a la matriz de trabajo (0.5 mg/mL). El análisis se efectuó en dos días diferentes por dos analistas distintos. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se analizaron mediante un ANADEVVA utilizando el estadístico de Fischer (F) y se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

#### **4.10 Cuantificación de los marcadores.**

Diez miligramos de la muestra a analizar disueltos en 1 mL de CH<sub>3</sub>CN se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc<sup>®</sup> de 0.45 µm y de 13 mm de diámetro. El carvacrol (**1**), el timol (**6**) y el *p*-cimeno (**7**) presentes en cada muestra se cuantificaron registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **4.9**.

## 5. Resultados y discusión

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto multidisciplinario enfocado al estudio de especies vegetales selectas de amplio uso en la medicina popular de México con miras a la generación de la información científica necesaria para la integración de sus monografías tipo OMS y/o farmacopéicas. La especie eje del presente trabajo, *Poliomintha longiflora*, forma parte del complejo de plantas medicinales constituido por hierbas comúnmente designadas con el nombre de “orégano”. La especie dominante del complejo es *Lippia graveolens*, y su sustituto más importante es *P. longiflora*. Sin embargo, no existe información en la literatura especializada que permita justificar el uso indistinto de éstas plantas.

Con el desarrollo del presente proyecto se pretende establecer la información que permita racionalizar o justificar (establecer las bases científicas que justifiquen) la sustitución de una especie por otra. Para ello, es necesario validar los usos medicinales mejor documentados atribuidos a la especie *P. longiflora* mediante la evaluación de su eficacia preclínica, así como establecer los principios activos y/o marcadores químicos de la especie y compararlos con los disponibles para *L. graveolens*.

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este trabajo se resume a continuación: en primer lugar se prepararon los extractos orgánicos y acuosos en mediana escala de las especies *P. longiflora* y *L. graveolens*, con la finalidad de realizar las evaluaciones preclínicas de eficacia e inocuidad. Las pruebas de inocuidad se realizan con el propósito de documentar los posibles efectos tóxicos o reacciones adversas, que pudiera presentar la especie vegetal objeto de este estudio, y poder así obtener información preliminar sobre la seguridad de la planta. Estas determinaciones se realizaron a pesar de que la especie se ha utilizado por siglos sin que se hayan documentado efectos tóxicos o reacciones adversas. Por otra parte, los estudios de eficacia preclínica se efectúan con el objetivo de validar experimentalmente los usos mejor documentados de la planta en las prácticas médicas populares. A continuación se realizó el estudio químico de las especies seleccionadas aplicando distintas técnicas

cromatográficas, que permitieron la identificación de los metabolitos secundarios bioactivos y marcadores, y el establecimiento de perfiles cromatográficos de utilidad como pruebas de identidad química de dos de los oréganos más comercializados en México. Por último, se desarrolló y se validó un método analítico por CLAE para identificar a estos oréganos y para evaluar el contenido de compuestos marcadores en los extractos derivados de ambas especies. Toda la metodología analítica desarrollada indudablemente será de gran valor para el control de calidad de éstas especies sea cual fuere su utilidad comercial.

Los resultados generados a través de la estrategia metodológica antes descrita se discutirán en dos partes: la primera abarca la evaluación de la inocuidad y la eficacia farmacológica de los oréganos mexicanos. En la segunda parte, se describen todos los aspectos relacionados con la investigación química.

## **5.1 Evaluación de la inocuidad y eficacia preclínica.**

### **5.1.1 Inocuidad.**

Los estudios conducentes a determinar la inocuidad preclínica de la especie medicinal *P. longiflora* consistieron en la evaluación de la toxicidad aguda en ratones y para el crustáceo *Artemia salina* L. de acuerdo con los procedimientos establecidos por Lorke (1983) y Wha (1993), respectivamente, así como la evaluación del potencial mutagénico (Maron y Ames, 1983) de los extractos orgánicos obtenidos a partir de las partes aéreas de la planta.

El estudio de la toxicidad aguda en ratones del extracto orgánico, almacenado por varios días, provocó efectos tóxicos agudos importantes ( $DL_{50} < 2$  mg/kg). La necropsia realizada a los animales al cabo del ensayo indicó que el preparado afecta algunos órganos vitales como el corazón. En todos los casos, se observó la aparición de coágulos alrededor de este órgano. La evaluación de la toxicidad contra *A. salina* permitió establecer que el extracto también es tóxico para el crustáceo. El valor de  $CL_{50}$  calculado fue de 100  $\mu$ g/mL.

Cabe mencionar que cuando el extracto se evaluó recién preparado los efectos tóxicos previamente descritos no se observaron, sugiriendo que uno o más constituyentes presentes en el extracto se transforman en uno o más productos tóxicos que inducen los efectos tóxicos detallados. Por otra parte, los resultados de esta prueba para la esencia e infusión ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg), recién preparadas o almacenadas, evidenciaron que ambas muestras no provocan efectos tóxicos agudos importantes en roedores. Estos resultados nos permiten inferir que los compuestos volátiles o de mayor polaridad presentes en los extractos no son tóxicos.

Para determinar el potencial mutagénico del extracto íntegro de la especie *P. longiflora* se utilizó la metodología clásica descrita por Ames (Maron y Ames, 1983). Esta prueba se fundamenta en la detección de productos capaces de provocar la reversión de la mutación en el operón de la histidina (His) de distintas cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102, TA104, etc.), diseñadas especialmente a través de procedimientos genéticos específicos. Estas cepas son auxótrofas a la histidina (His-) y, consecuentemente, el crecimiento de colonias bacterianas no se observará en ausencia de dicho aminoácido. Por otra parte, debido a que en los últimos años se ha demostrado que algunos agentes carcinogénicos requieren de una activación metabólica, en este experimento, se realizó la prueba de mutagenicidad en presencia de la fracción posmitocondrial S9. Esta fracción contiene fragmentos de retículo endoplásmico y, por lo tanto, la mayor parte de las enzimas monooxigenasas requeridas para activar mutágenos y/o carcinógenos potenciales.

Los resultados obtenidos indican que el extracto orgánico evaluado no provocó la reversión de la mutación de las cepas de *S. typhimurium* (TA98, TA100 y TA102) ensayadas, ya que las mismas no fueron capaces de crecer en un medio mínimo sin His (Déciga-Campos *et al.*, 2007a).

Los resultados de cardiotoxicidad encontrados en el presente estudio, en conjunto con los estudios de estabilidad que se realicen posteriormente, permitirán establecer una alerta sanitaria, en donde se asiente este hallazgo de manera concisa. Este documento será de utilidad para regular el consumo de preparados a base de extractos orgánicos de *P. longiflora* por parte de las autoridades sanitarias de nuestro país (OMS, 2000a; 2000b;

2010). Aparentemente, la infusión y las esencias son inocuas, y el extracto íntegro no provoca mutagenicidad.

### **5.1.2 Evaluación de la eficacia preclínica.**

Para establecer la eficacia preclínica de las especies se realizaron una serie de experimentos farmacológicos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los estudios se seleccionaron considerando los usos populares de la planta e incluyeron: la evaluación del potencial antibacteriano, antinociceptivo, espasmolítico y antidiabético.

#### **5.1.2.1 Evaluación del potencial antibacteriano.**

El potencial antibacteriano del extracto íntegro y del aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas de *P. longiflora* se evaluó utilizando una batería de microorganismos Gram positivo y Gram negativo mediante la técnica de microdilución con el colorante MTT (Appendino *et al.*, 2008). Este ensayo permitió evidenciar que ambas muestras inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivo (*S. aureus* y *B. subtilis*) con una CMI de 128 µg/mL. En el caso de la especie *L. graveolens*, los preparados ensayados presentaron una actividad inhibitoria marginal sobre el crecimiento de todas las bacterias evaluadas [CMI 512 µg/mL; **Tabla 3**]. Con base en estos resultados se estableció que *P. longiflora* contiene principios antibacterianos que apoyan su uso como agente antiséptico en el tratamiento de heridas.

En el caso de *L. graveolens*, los resultados obtenidos se encuentran en armonía con el efecto antibacteriano bien documentado para varias especies de este género (Pascual *et al.*, 2001; Arana-Sánchez *et al.*, 2010). Por otro lado, a pesar de que las especies pertenecientes al género *Origanum*, también de la familia de las labiadas, son bien reconocidas por sus potentes propiedades antisépticas, este trabajo representa el primer reporte de la eficacia antibacteriana descrita para *P. longiflora* (Burt, 2004; Fisher y Phillips, 2006; *inter alia*).

### 5.1.2.2 Evaluación del potencial antinociceptivo.

La evaluación del potencial antinociceptivo asociado con dolor de tipo central y periférico de los órganos objeto de este estudio se realizó utilizando los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal, respectivamente (Déciga-Campos *et al.*, 2007b; Palacios *et al.*, 2008).

**Tabla 3.** Efecto antibacteriano del extracto orgánico, aceites esenciales, timol, carvacrol y *p*-cimeno obtenidos a partir de los órganos mexicanos.

microorganismo	CMI (µg/mL)						
	EPI <sup>a</sup>	ELg <sup>b</sup>	AePI <sup>c</sup>	AeLg <sup>d</sup>	carvacrol	<i>p</i> -cimeno	timol
<i>B. subtilis</i>	256	256	128	512	128	1024	256
<i>S. aureus</i>	256	512	128	512	128	1024	512
<i>E. coli</i>	512	512	256	512	128	512	1024
<i>S. typhi</i>	512	512	256	512	128	512	1024
<i>P. aeruginosa</i>	512	1024	512	NA	128	512	1024

<sup>a</sup>Extracto orgánico de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *P. longiflora*; <sup>b</sup>Extracto orgánico de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) de *L. graveolens*

<sup>c</sup>Aceite esencial de *P. longiflora*; <sup>d</sup>Aceite esencial de *L. graveolens*

CMI: fueron determinadas por triplicado; en todas las evaluaciones el antibiótico ampicilina fue utilizado como control positivo (CMI 0.0015 µg/mL)

NA: sin actividad

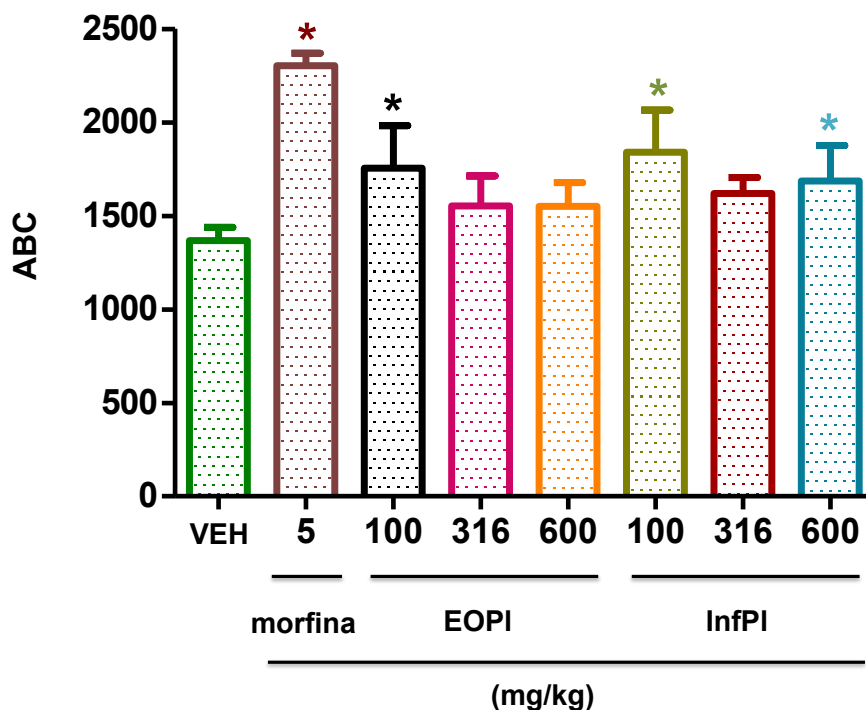
Con relación al primer método, la aplicación de un estímulo térmico a los ratones, produce una respuesta que se caracteriza por el levantamiento o lamedura de una o ambas patas traseras y/o un brinco hacia afuera del sistema cilindro-placa caliente. Estas respuestas son de origen supraespinal (Le Bars *et al.*, 2001).

La segunda prueba mide el potencial de los preparados para contrarrestar la irritación provocada por la administración de una solución de ácido acético (0.6% v/v) a los ratones de prueba. La solución algésica induce una reacción inflamatoria caracterizada por contracciones de la musculatura abdominal, extensiones de las extremidades inferiores y el estiramiento del cuerpo.

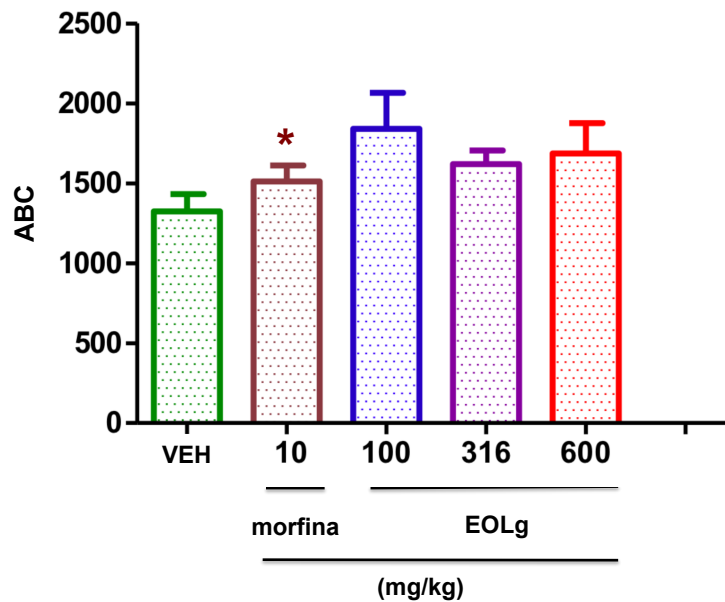
La evaluación de los extractos recién preparados [extracto orgánico CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) e infusión] de *P. longiflora* (**Figuras 7a y 8**) y *L. graveolens* (**Figuras 7b y 8**), a las dosis de 10.0, 31.6, 100, 316 y 600 mg/kg (*p.o.*), permitió establecer que las preparaciones no presentan un efecto antinociceptivo importante con respecto al control en los dos modelos de prueba (*\*p* < 0.05), a pesar del contenido de



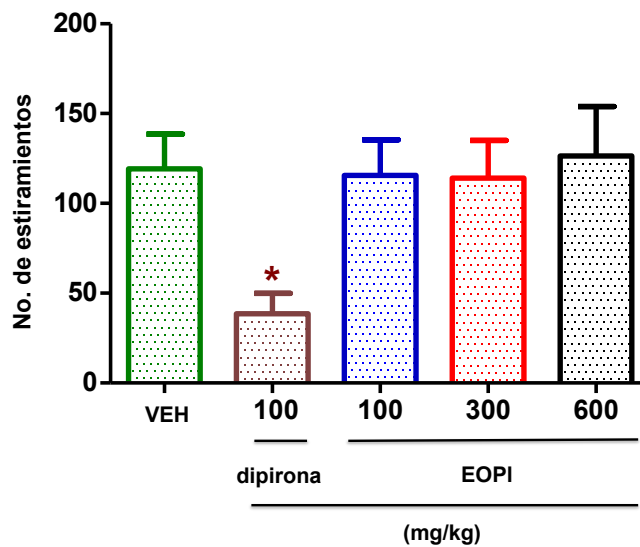
carvacrol, con propiedades analgésicas-antiinflamatorias comprobadas. Esto debido posiblemente a la presencia en las plantas de otros componentes con efectos farmacológicos opuestos (Aidyn *et al.*, 1996; Baser, 2008; Guimaraes *et al.*, 2010). Por lo tanto, la actividad de estos oréganos para el tratamiento de cólicos menstruales y estomacales están correlacionados principalmente con su efecto espasmolítico.



**Figura 7a.** Efecto antinociceptivo de los extractos orgánicos de *P. longiflora* en el modelo de la placa caliente. VEH: vehículo; EOPI: extracto íntegro; InfPI: infusión. Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) del período de latencia con respecto a la dosis. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo).



**Figura 7b.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *L. graveolens* en el modelo de la placa caliente. VEH: vehículo. Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) del período de latencia con respecto a la dosis. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo).

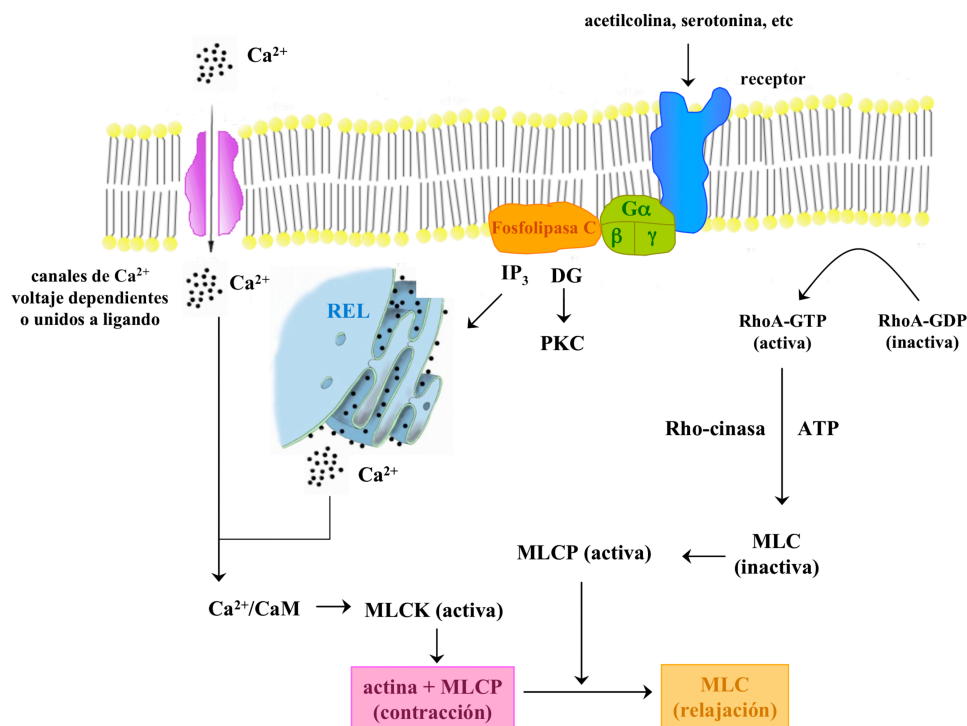


**Figura 8.** Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *P. longiflora* en el modelo de estiramiento abdominal. VEH: vehículo. Cada valor representa el número total de estiramientos  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo).

### 5.1.2.3 Evaluación del potencial espasmolítico.

Los extractos orgánicos, las infusiones y las esencias de los oréganos mexicanos se ensayaron para determinar su potencial espasmolítico utilizando dos modelos farmacológicos: el del íleon aislado de cobayo y la prueba del tránsito gastrointestinal en ratones (Van Den Broucke y Lemli, 1980; 1982; Astudillo *et al.*, 2004; Figueroa *et al.*, 2007). En el primer ensayo, se determinó el efecto de los preparados vegetales sobre las contracciones inducidas en intestino de cobayo por los espasmógenos histamina ( $1 \times 10^{-3}$  M) y carbacol ( $1 \times 10^{-4}$  M). La selección del carbacol y la histamina como espasmógenos se realizó con base en su acción sobre receptores específicos membranales acoplados a las proteínas G. La activación de estos receptores desencadenan una serie de procesos de señalización que culminan con la contracción del músculo liso. Así, los agonistas excitatorios activan cuatro de varias enzimas efectoras capaces de hidrolizar a los fosfolípidos de la membrana: la fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), que hidroliza específicamente al fosfatidilinositol, la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC), la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). La activación de estas enzimas provoca la movilización de Ca<sup>2+</sup> y la producción de segundos mensajeros en cada una de las fases de la contracción muscular. En la fase inicial, el segundo mensajero 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y el diacilglicerol (DAG), que se producen durante la hidrólisis del fosfatidil-4,5-difosfato (PDP) membranal por la acción de la enzima fosfolipasa C- $\beta$ , provocan la movilización de Ca<sup>2+</sup> hacia el citoplasma y, con ello, la activación de la proteína cinasa C que modula la fase de contracción sostenida posiblemente regulando a la proteína cinasa de la miosina de cadena ligera (MLCK). En la **Figura 9** se esquematizan los eventos que tienen lugar durante el proceso de contracción y relajación del músculo liso visceral (Samuelsson, 1991; Williamson *et al.*, 1996; Kating y Trevor, 1998; Lecci *et al.*, 2002; Web, 2003).

El segundo ensayo, permite evaluar el efecto espasmolítico *in vivo* en ratones y consiste en determinar el tiempo de tránsito del carbono activado a través del tracto gastrointestinal mediado por el grado de motilidad intestinal. La disminución del tránsito con respecto a un control es indicativa de un efecto relajante de la musculatura lisa (Tan-No *et al.*, 2003).



**Figura 9.** Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso visceral (tomado de Web, 2003).

De acuerdo con los resultados que se ilustran en la **Tabla 4** la infusión y la esencia de *P. longiflora* provocan una inhibición significativa de las contracciones inducidas sobre el íleon aislado de cobayo. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados para la infusión y la esencia fueron de 25.8 y 37.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, para las contracciones inducidas por carbacol, y de 1.9 y 48.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, para las inducidas por histamina. Esta relajación, si bien fue importante, resultó un tanto menor que la del bromuro de ipratropium y el clorhidrato de difenhidramina, utilizados como controles positivos.

En el caso de *L. graveolens*, los resultados obtenidos indicaron que los tres preparados evaluados inducen la relajación de las contracciones inducidas por ambos espasmógenos sobre la preparación de íleon de cobayo de manera dependiente de la concentración. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  calculados se resumen en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Efecto de los extractos orgánicos, infusiones y aceites esenciales de *L. graveolens* y *P. longiflora* sobre las contracciones inducidas por carbacol e histamina en una preparación de íleon aislado de cobayo.

Tratamiento	carbacol ( $1 \times 10^{-4}$ M)	histamina ( $1 \times 10^{-3}$ M)
<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL) ± E.E.M.</b>		
<i>P. longiflora</i>		
extracto	68.9 ± 2.1	34.9 ± 0.9
aceite esencial	37.6 ± 2.3	48.1 ± 0.9
infusión	25.8 ± 2.1*	1.9 ± 1.1*
<i>L. graveolens</i>		
extracto	28.0 ± 4.3*	2.3 ± 0.1*
aceite esencial	20.0 ± 0.8*	1.6 ± 0.1*
infusión	49.7 ± 3.3	20.0 ± 0.9*
<b>E<sub>max</sub> (10<sup>-3</sup> µg/mL) ± E.E.M.</b>		
<i>P. longiflora</i>		
extracto	89.3 ± 4.3	92.6 ± 3.0
aceite esencial	97.6 ± 0.8	94.6 ± 1.8
infusión	98.2 ± 0.6	98.1 ± 0.7
<i>L. graveolens</i>		
extracto	96.4 ± 0.9	87.3 ± 4.7
aceite esencial	97.1 ± 0.6	98.9 ± 0.2
infusión	90.9 ± 2.0	96.8 ± 1.4

E<sub>max</sub>: Efecto máximo; valor promedio ± E.E.M. (n = 8); \*p < 0.05

Con base en los resultados previamente descritos se estableció que *P. longiflora* al igual que *L. graveolens* contienen principios espasmolíticos. En el caso de *L. graveolens*, se observó una respuesta inhibitoria selectiva para las contracciones provocadas por el espasmógeno histamina, sin embargo, *P. longiflora* presentó una respuesta inespecífica ya que abatió las contracciones inducidas por los dos agonistas utilizados en el estudio. De cualquier forma, estos resultados se encuentran en armonía con los descritos por Van Den Broucke y Lemli (1980) quienes demostraron que el extracto orgánico de la especie relacionada *O. compactum* inhibe selectivamente las contracciones inducidas por histamina.

Por otra parte, el extracto orgánico de *L. graveolens* a la dosis de 100 mg/kg inhibió de manera significativa el tránsito gastrointestinal en un 28% (\*p < 0.05). En el caso de *P. longiflora* sólo la infusión presentó un efecto antiespasmódico relevante ya que, a la dosis de 316 mg/kg disminuye de manera importante el tránsito a través del intestino ( $41.13 \pm 8.07\%$ ). Éste efecto fue menor al observado para la loperamida (8.0

mg/kg) utilizada como control positivo y que inhibió el tránsito en un  $51.74 \pm 5.60\%$  ( $*p < 0.05$ ).

Los resultados de la evaluación de la inhibición de la motilidad gastrointestinal de los aceites esenciales permitieron establecer que las esencias de *L. graveolens* (200 mg/kg) y de *P. longiflora* (316 mg/kg) inhiben de manera significativa y notable el tránsito intestinal del carbono activado en un 46.5 y 22.3%, respectivamente (**Tabla 5**) ( $*p < 0.05$ ).

El conjunto de resultados recién descritos sugiere que los preparados de *P. longiflora* y *L. graveolens* provocan su efecto antiespasmódico a través de un mecanismo de contracción-relajación muscular que involucra, probablemente, a los receptores acoplados a proteínas G, el bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  o una inhibición de las proteínas involucradas en el proceso, por tan sólo mencionar algunos (Samuelsson, 1991; Williamson *et al.*, 1996; Kating y Trevor, 1998; Lecci *et al.*, 2002; Web, 2003).

Finalmente, estas pruebas permitieron validar a nivel preclínico el uso popular de ambas especies de oréganos en el tratamiento de cólicos estomacales y menstruales.

**Tabla 5.** Efecto de los aceites esenciales de *L. graveolens* y *P. longiflora* sobre la inhibición del tránsito gastrointestinal en ratones.

Tratamiento	Dosis (mg/kg) p.o.	(%) de avance de la solución marcadora	(%) inhibición del tránsito GI
Control	-	82.59 ± 5.13	-
AePl	10	81.35 ± 3.02	1.50
	31.6	81.07 ± 2.98	1.84
	52.6	80.84 ± 1.81	2.12
	100	75.09 ± 4.54	9.08
	316	64.19 ± 1.89	22.27*
AeLg	10	75.80 ± 3.67	8.22
	31.6	70.20 ± 3.01	15.00
	100	63.43 ± 5.25	23.19*
	200	44.14 ± 1.60	46.55*
Loperamida	8	42.20 ± 5.83	48.90*

valor promedio ± E.E.M. (n = 8);  $*p < 0.05$

#### 5.1.2.4 Evaluación del potencial antidiabético.

Considerando el uso prolongado y bien documentado de *L. graveolens* en el tratamiento de la diabetes (Morton, 1981; Pascual *et al.*, 2001), en la presente

investigación se decidió establecer la eficacia preclínica de *P. longiflora* y *L. graveolens* como agentes antidiabéticos, evaluando *in vivo* sus posibles efectos antihiper glucemiante e hipogluce miente, tanto en ratones normoglu cé micos como diabéticos. Para el modelo de diabetes mellitus tipo 2 se administró a los animales una dosis única de 100 mg/kg de STZ (*i.p.*) previa administración de NAD (40 mg/kg; *i.p.*); este tratamiento protege parcialmente a las células  $\beta$  pancreáticas del daño oxidativo excesivo que produce la STZ, permitiendo así, la generación de un cuadro fisiológico similar al de la diabetes tipo 2 en los ratones. Este modelo ha sido una importante herramienta de investigación en la búsqueda de nuevos agentes antidiabéticos (Masiello *et al.*, 1998; Srinivasan y Ramarao, 2007; Cristians *et al.*, 2009; Brindis *et al.*, 2011).

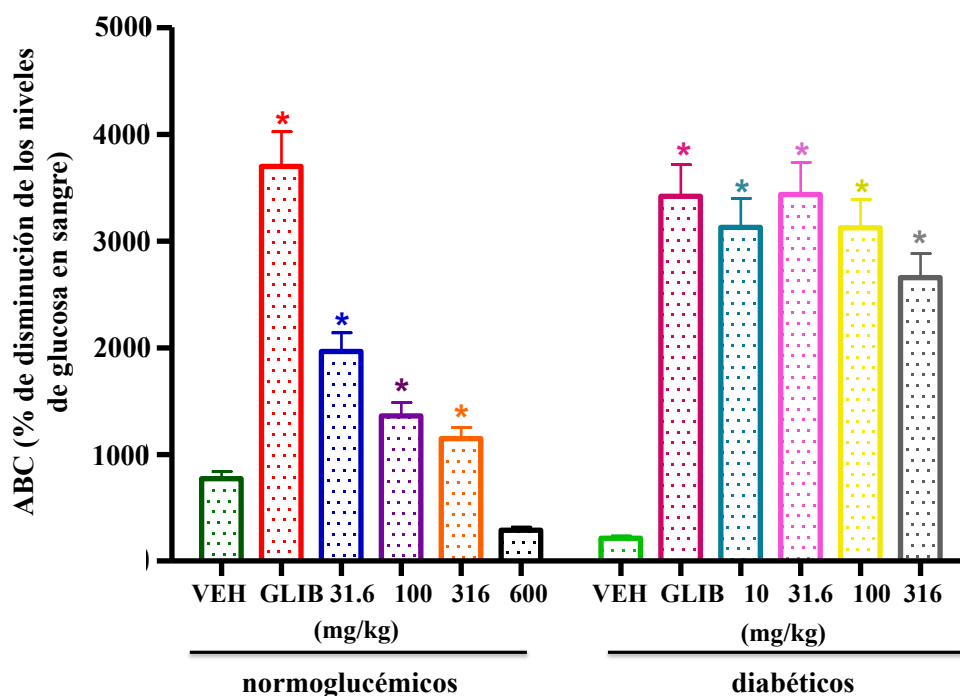
El estudio del potencial antidiabético de los oréganos en un país como México es de gran relevancia ya que un gran sector de la población que padece diabetes utiliza plantas medicinales para el tratamiento de la enfermedad, de tal forma, que muchos pacientes frecuentemente abandonan el tratamiento alopático apropiado y, recurren a los tratamientos prescritos por los curanderos locales o vendedores de hierbas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Esta circunstancia se ve favorecida además, por la creencia de que estos productos son inocuos y resultan más económicos y accesibles. Por otro lado, la incidencia de diabetes mellitus en la población mexicana ha aumentado notablemente en los últimos años, de tal manera que esta enfermedad demanda mayor atención médica y es una de las causas más importantes de hospitalización y ausentismo laboral (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002). Datos recientes de la encuesta nacional de salud indican que en el año 2000 cerca de 3.6 millones de mexicanos mayores de 20 años padecen diabetes mellitus tipo 2 y se estima que para el año 2030, el número de pacientes diabéticos en México se incrementará a más de seis millones (Barceló *et al.*, 2003).

#### **5.1.2.4.1 Evaluación del efecto hipoglu cé mico**

La evaluación de los extractos orgánicos e infusiones de los oréganos mexicanos como agentes hipogluce miantes se realizó utilizando un modelo de tipo agudo. El extracto orgánico de *P. longiflora*, a la dosis de 31.6 mg/kg, posee un efecto hipogluce miente significativo en animales normoglu cé micos (**Figura 10**). Tres horas

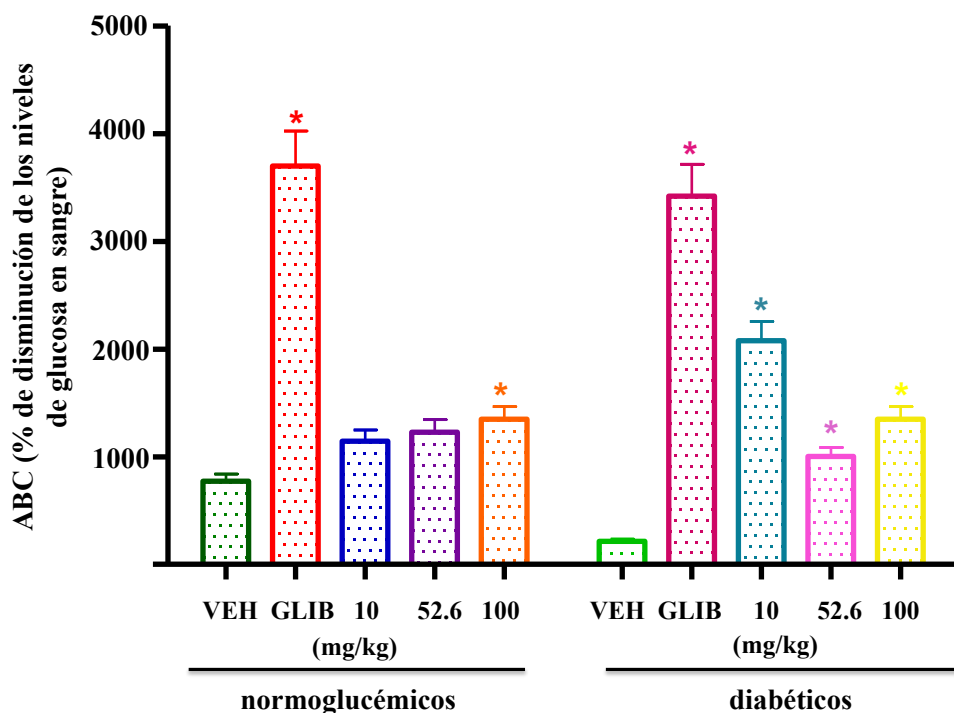
después de su administración se observó una disminución de la glucemia en un 22%. El efecto máximo se observó a las cinco horas posteriores al tratamiento (37%) y se mantuvo constante hasta el final del experimento. La evaluación del extracto orgánico en animales diabéticos (**Figura 10**) mostró que al término de la primera hora de la administración del tratamiento, a la dosis de 31.6 mg/kg, los niveles de glucosa disminuyeron hasta un 40% manteniendo además, el efecto constante a lo largo del experimento. La infusión de *P. longiflora* en animales sanos (**Figura 11**), a las tres dosis ensayadas, provocó una disminución mayor al 10% en los niveles de glucosa en sangre una hora posterior a la administración y, cinco horas después se observó el efecto máximo sobre la disminución de la variación de la glucosa sanguínea (18%).

En animales diabéticos, el mejor efecto hipoglucemiante se observó con la infusión a la dosis de 10 mg/kg (-29%) una hora posterior a la administración oral de cada tratamiento (**Figura 11**).



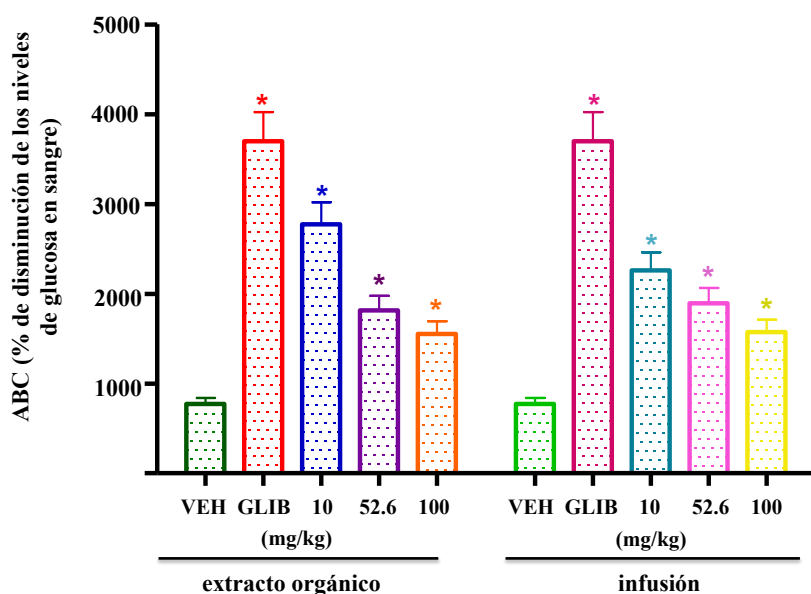
**Figura 10.** Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



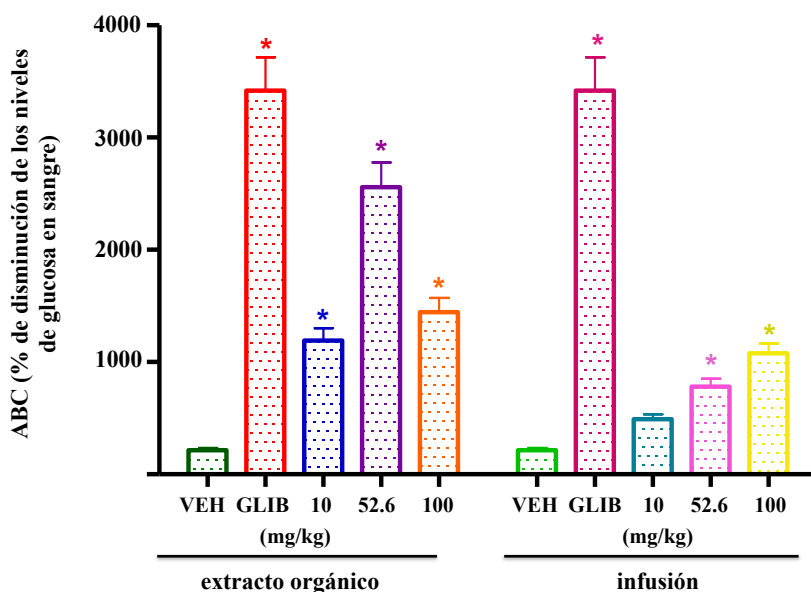


**Figura 11.** Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVIA seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

El extracto íntegro e infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* también presentaron un efecto hipoglucemiante significativo tanto en animales normoglucémicos como en los diabéticos. En el caso de los normoglucémicos, la mejor actividad se observó a la dosis de 10 mg/kg, después de la primera hora de la administración de los tratamientos el efecto fue constante durante todo el experimento (**Figura 12**). En ratones diabéticos, la actividad biológica observada para el extracto orgánico fue mucho mayor en comparación con la actividad observada para la infusión, a la dosis de 52.6 mg/kg, con un porcentaje máximo de variación de la glucemia del  $-32\%$  (**Figura 13**).



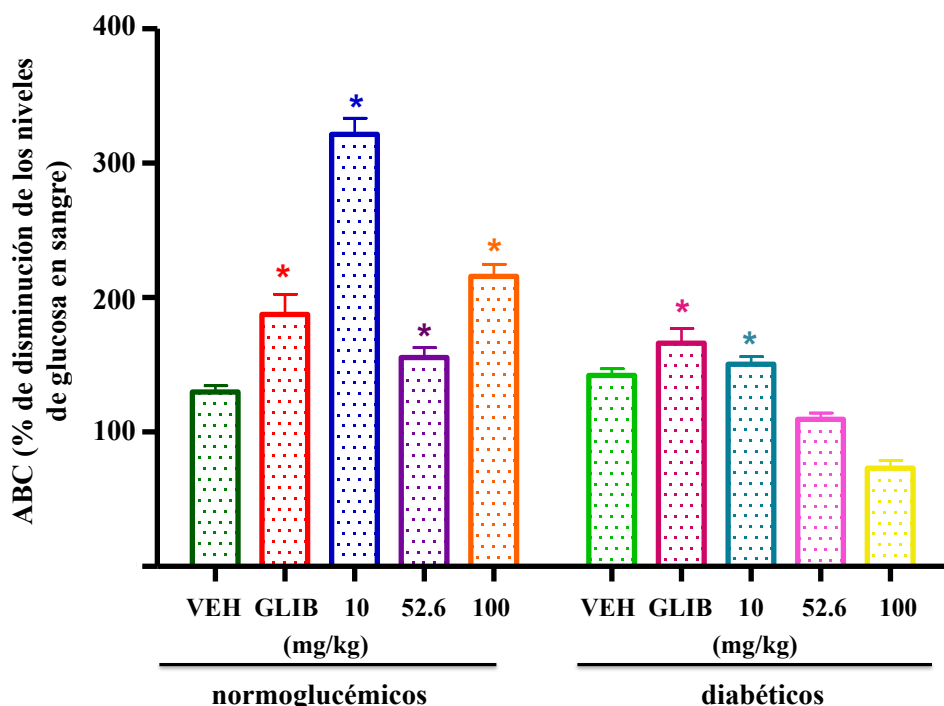
**Figura 12.** Efecto agudo del extracto orgánico e infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



**Figura 13.** Efecto agudo del extracto orgánico e infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

#### 5.1.2.4.2 Evaluación del efecto antihiper glucémico.

El efecto del extracto íntegro de *P. longiflora* en la prueba de tolerancia a la glucosa (OGTT) en animales normoglucémicos indicó que la dosis de 10 mg/kg produce un incremento significativo del pico posprandial con respecto al control. Por otra parte, la misma dosis en animales diabéticos no provocó un incremento importante del pico posprandial (**Figura 14**).

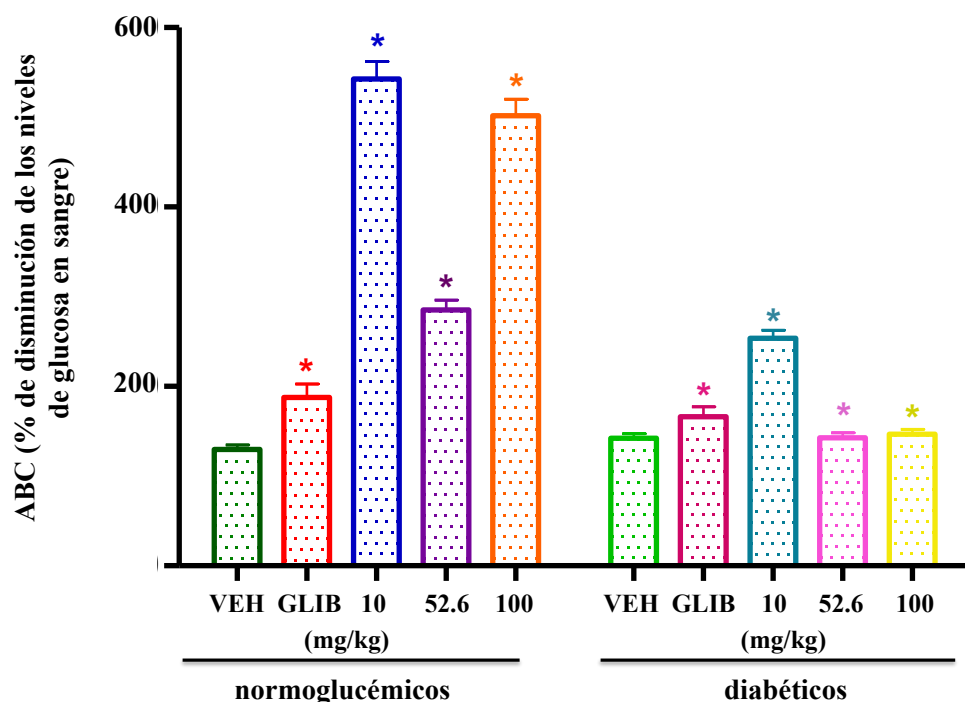


**Figura 14.** Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVA seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

Los resultados obtenidos durante la evaluación de la infusión de *P. longiflora* se ilustran en la **Figura 15**. En animales normoglucémicos (10 y 100 mg/kg) y diabéticos (10 mg/kg) se observó un efecto hiper glucémico significativo ( $*p < 0.05$ ).

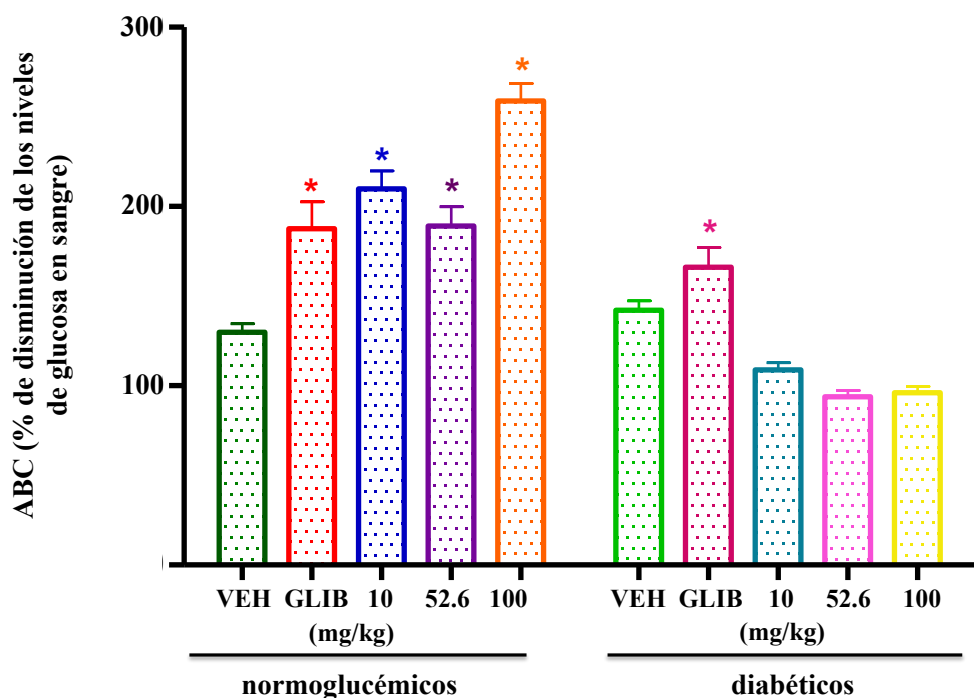
En la **Figura 16** se ilustran los resultados de la evaluación de la infusión de *L. graveolens* en ratones normales y diabéticos. Como se observa en esta figura, las dosis de 10 y 100 mg/kg significativamente incrementan los niveles de glucosa con respecto al

vehículo en animales normoglucémicos ( $*p < 0.05$ ). En contraste, en ratones diabéticos, a las tres dosis ensayadas no se observa ningún incremento significativo del pico posprandial.



**Figura 15.** Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

En la prueba de tolerancia a la sacarosa (OSTT), los resultados del efecto de las infusiones de ambas plantas en ratones normales indicaron que en contraste con la acarbosa, todos los tratamientos afectan el pico posprandial con respecto al vehículo, sugiriendo que estos preparados tienen un efecto hiperglucémico por medio de un mecanismo por investigar. Por otra parte, en ratones diabéticos las infusiones de ambas plantas no afectan de manera significativa el pico posprandial (**Figura 17**).



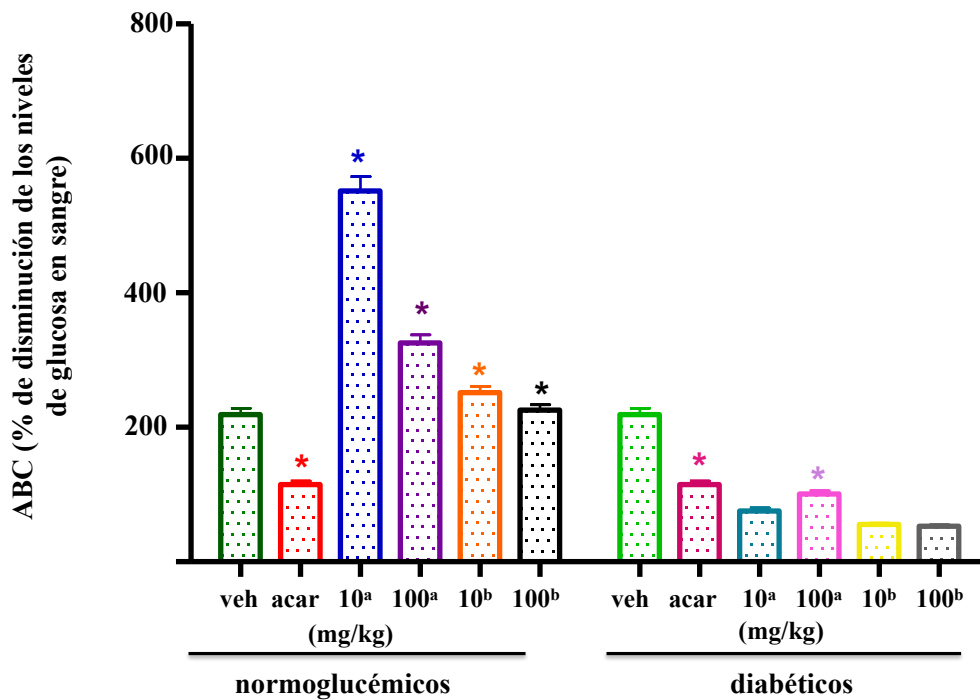
**Figura 16.** Efecto de la infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD–STZ–diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

Todos estos resultados indican que las especies de oréganos evaluadas no son agentes antihiper glucémicos eficaces, por el contrario, tienden a incrementar los niveles de glucosa en animales normoglucémicos de acuerdo con los experimentos de tolerancia a la glucosa y sacarosa.

Los resultados globales permiten inferir que el marcado estado de hiperglucemia observado se debe a una disminución de los mecanismos de homeostasia en los animales sanos objeto de los estudios de tolerancia a la glucosa y a la sacarosa. Evidentemente, el metabolismo de la glucosa en animales sanos y diabéticos es extremadamente complejo y son muchos los posibles blancos de acción a nivel molecular que podrían estar implicados en la respuesta observada. En este sentido, un posible escenario involucraría un deterioro de la tolerancia a los carbohidratos, debido a una disminución de la utilización periférica de la glucosa o un incremento en la producción de glucosa endógena (gluconeogénesis). Otro mecanismo podría involucrar una alteración de la cascada del AMPc que conlleve a una disminución de la utilización de la glucosa vía la

síntesis de glucógeno. En los animales diabéticos, este efecto no es tan marcado, debido a que los mecanismos compensatorios están alterados (Firth *et al.*, 1986; Ganong, 2000).

Con base en los resultados preliminares del estudio del potencial antidiabético de los oréganos mexicanos, el uso de las infusiones de estas plantas no es recomendable para el tratamiento de la diabetes, hasta que no se realicen ensayos más concluyentes en otras especies animales.



**Figura 17.** Efecto de las infusiones de las partes aéreas de a) *L. graveolens* y b) *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos y NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. VEH: vehículo; ACAR: acarbosa (5 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

## **5.2 Establecimiento de las pruebas químicas de identidad y composición.**

La calidad farmacéutica de las drogas crudas y sus preparados se puede garantizar mediante la aplicación de métodos analíticos apropiados que permitan precisar su grado de calidad, conservación y estabilidad y, según sean los casos su valor farmacológico. De manera adicional podrá confirmarse la ausencia de adulterantes y valorar el contenido de principios activos (composición) o compuestos marcadores. El contar con los métodos apropiados para establecer la pureza, la identidad y la composición de las drogas crudas garantizará el uso seguro y eficaz de las mismas.

En numerosos países alrededor del mundo, la calidad y la pureza requeridas para una droga cruda de amplio uso terapéutico se encuentran determinadas por las especificaciones establecidas en las farmacopeas o tratados oficiales. Aquellas drogas que no reúnan los requisitos exigidos deben ser rechazadas como insumos. Cuando estos estándares no se encuentran establecidos es necesario elaborar una monografía propia, siguiendo el esquema descrito en las farmacopeas que garantice la calidad de la planta.

Los métodos analíticos utilizados hoy día para establecer la identidad química y la composición de las drogas crudas son fundamentalmente de tipo cromatográfico (CLAE, CCF, CG), y representan la herramienta de separación más utilizada en el aseguramiento de la calidad de las drogas crudas y en la identificación de los compuestos activos y/o marcadores. Existen otras técnicas de análisis de vanguardia que incluyen a la electroforesis capilar, la espectroscopia (UV e IR), la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear y finalmente métodos combinados CL–UV, CL–EM, CL–RMN, etc (Liang *et al.*, 2004).

El desarrollo de los métodos analíticos de utilidad para el control de calidad de las drogas crudas no es tarea sencilla, ya que las matrices de análisis, principalmente extractos vegetales, resultan sumamente complejas y variables. En la mayoría de los casos el desarrollo de estos métodos constituye un verdadero reto para el personal especializado que realiza estas investigaciones.

Una vez que se desarrollan los métodos analíticos apropiados es necesario validar que estos son fiables y repetibles, evaluando los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud y especificidad (USP 32; ICHQ2B, 1996 y documentos

ahí citados). En los siguientes párrafos se describen las pruebas de identidad y composición desarrolladas para los oréganos mexicanos.

### 5.2.1 Composición química del aceite esencial.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial de los oréganos mexicanos se realizó utilizando la cromatografía de gases (CG) acoplada a la espectrometría de masas (EM), mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts (Van Del Dool y Kratz, 1963). La CG es sin duda, el método de análisis adecuado para realizar el control de calidad de aceites esenciales debido a la volatilidad de sus constituyentes. También permite obtener los perfiles cromatográficos representativos y característicos de cada esencia, así como la abundancia de cada constituyente (Liang *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos a partir de estos análisis se ilustran en la **Tabla 6** y en las **Figuras 18a** y **18b**. Los rendimientos (%) de los aceites esenciales obtenidos a partir de *P. longiflora* (Lotes 1 y 3) fueron de  $1.67 \pm 0.06$  y de  $0.33 \pm 0.004$  para *L. graveolens* (Lote 1 y 2). El análisis de cada esencia reveló la presencia de 31, 36, 24 y 24 compuestos que representan el 99.9, 99.9, 99.2 y 99.0%, respectivamente, de la composición total de cada aceite esencial. Los productos fueron identificados mediante el cálculo de los índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts (1963). Debido a que se trabajó con un programa de temperatura de tipo lineal y que los índices de retención para los analitos desconocidos son independientes de las variables de la columna y de las condiciones cromatográficas empleadas, el cálculo de los índices de retención de los picos desconocidos ( $I_x$ ) se realizó aplicando la ecuación de Van Del Dol que se indica a continuación:

$$I_x = 100 n + 100 [(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n)]$$



En donde

$n$ : número de átomos de carbono del alcano más corto;  $t_n$ : tiempo de retención del alcano más corto;  $t_{n+1}$ : tiempo de retención del alcano más largo;  $t_x$ : tiempo de retención del pico de interés.

Simultáneamente al cálculo de estos índices de retención se obtuvieron los espectros de masas de los componentes de las esencias en la modalidad de impacto electrónico. Enseguida, los espectros así generados se compararon con aquellos de la base de datos del equipo y con los reportados en la literatura. De manera adicional, algunos compuestos fueron confirmados mediante la inyección de sus estándares, disponibles comercialmente bajo las mismas condiciones cromatográficas. Estos compuestos incluyeron: carvacrol (**1**), timol (**6**), *m*-cimeno (**17**), *p*-cimeno, (**7**),  $\gamma$ -terpineno (**21**),  $\beta$ -cariofileno (**24**), germacreno D (**27**), eucaliptol (**33**), eugenol (**42**) y óxido de  $\beta$ -cariofileno (**45**).

La característica más importante de las esencias analizadas a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos es el elevado porcentaje de los monoterpenoides oxigenados, carvacrol (**1**; 10–18%) en *P. longiflora* y timol (**6**; 13%) en *L. graveolens* (**Figuras 18a** y **18b**). Adicionalmente, las esencias contienen cantidades significativas de óxido de  $\beta$ -cariofileno (**45**; 7–11%), *p*-cimeno (**7**; 5–15%), *m*-cimeno (**17**; 1–4%) y  $\beta$ -cariofileno (**24**; 3–6%).

Las principales diferencias observadas en la composición de ambas esencias fueron el elevado contenido de eucaliptol (**33**; 13%) y del éter metílico del timol (**6**; 2%) en *L. graveolens*. *P. longiflora* por su parte, presenta como componente mayoritario al carvacrol (**1**), así como considerables cantidades de 6-metil-3,4-xilenol (**43**, 12%), acetato de carvacrilo (**44**, 1–12%) y 4-(1-metiletetil)-ciclohexenal (**56**, 4–11%) (**Tabla 6**) que no fueron detectados en la esencia de *L. graveolens*.

**Tabla 6.** Compuestos volátiles identificados por GC-EM a partir de los aceites esenciales de *P. longiflora* y *L. graveolens*.

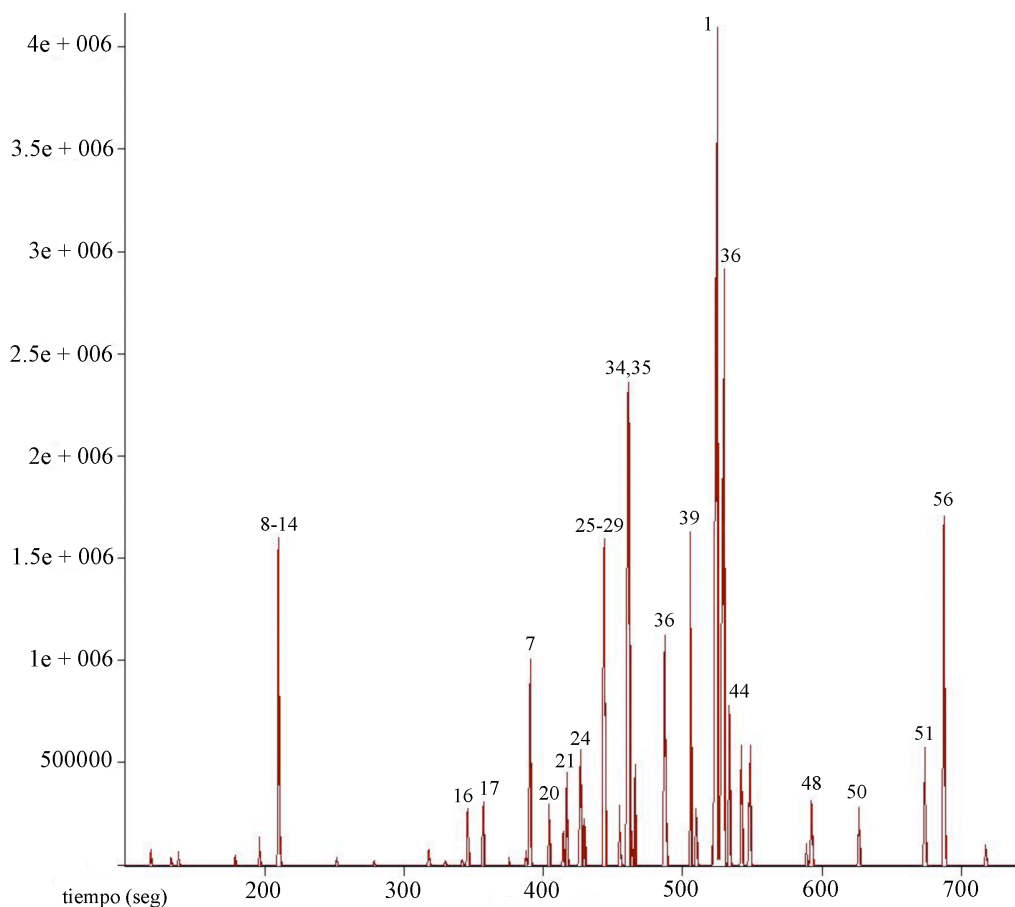
No.*	Compuesto	IR <sup>a</sup>		% de cada componente				Método de identificación <sup>b</sup>
		PL	LG	PL (lote 1)	PL (lote 3)	LG (lote 1)	LG (lote 2)	
<b>Hidrocarburos</b>								
8	triciclono	915			0.03			EM, IR
9	$\alpha$ -tujeno	920	920	0.16	1.97	0.25	0.13	EM, IR
10	$\alpha$ -pineno	926	926	0.06	1.39	0.29	0.85	EM, IR
11	campfeno	941	941	0.22	1.50	0.13	0.38	EM, IR
12	sabineno	965	965		0.27	1.83	0.10	EM, IR
13	$\beta$ -pineno	969	969	0.10	0.60	0.51	0.30	EM, IR
14	$\alpha$ -mirceno	985	985	0.32	4.79	1.20	1.07	EM, IR
15	$\alpha$ -felandreno	1003	1003	0.08	0.51	0.06	1.73	EM, IR
16	$\alpha$ -terpineno	1012	1012	0.74	2.06	3.89	4.52	EM, IR
17	<i>m</i> -cimeno	1022	1022	1.40	4.61	0.96	1.13	EM, IR, ref
7	<i>p</i> -cimeno	1023	1023	15.12	14.09	7.46	5.70	EM, IR, ref
18	4-etenil-1,4-dimetil-ciclohexeno	1028			0.59			EM, IR
19	$\beta$ -felandreno	1034			1.57			EM, IR
20	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1045			4.80		1.82	EM, IR
21	$\gamma$ -terpineno	1057	1057	2.57	6.31	3.89	0.78	EM, IR, ref
22	<i>D</i> -elemeno	1372		0.08				EM, IR
23	bicicloelemeno	1378			0.06			EM, IR
24	$\beta$ -cariofileno	1415	1415	4.57	3.34	6.29	6.05	EM, IR, ref
25	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1441	1441		1.25	1.39		EM, IR
26	opposita-4,15-(11)-dieno	1424			0.07			EM, IR
27	germacreno D	1470	1470	0.16	0.14	0.96	0.10	EM, IR, ref
28	germacreno A	1508		0.22	0.01			EM, IR
29	( <i>Z</i> )- $\gamma$ -bisaboleno	1513		0.59	0.12			EM, IR
30	$\alpha$ -ioneno	1518		0.02				EM, IR
31	$\alpha$ -cadineno	1534					0.16	EM, IR
32	$\alpha$ -calacoreno	1537		0.04				EM, IR
<b>Alcoholes y fenoles</b>								
33	eucaliptol	1027	1027	0.24		16.84	10.17	EM, IR, ref
34	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1068			0.52	0.40	0.33	EM, IR
35	( <i>E</i> )-piperitol	1179			0.18		0.19	EM, IR
36	$\alpha$ -fenchol	1100			1.57			EM, IR
37	$\alpha$ -terpineol		1178			7.62	1.84	EM, IR
38	éter metílico del timol	1229	1229	0.08		2.44	1.34	EM, IR, ref
39	1-acetoxi-4-etilbenceno	1238	1238	7.06	0.60			EM, IR
6	timol		1278			13.73		EM, IR, ref
1	carvacrol	1310	1310	10.20	18.36	13.48	12.55	EM, IR, ref
40	alcohol <i>p</i> -isopropilbencílico	1345			4.88			EM, IR
41	3,4-dimetoxestireno	1351		0.24	0.03			EM, IR
42	eugenol	1372	1372	0.14		0.93		EM, IR, ref
43	6-metil-3,4-xilenol	1379		12.81				EM, IR
44	acetato de carvacrilo	1378	1378	12.81	1.41	0.69		EM, IR, ref
45	óxido de $\beta$ -cariofileno	1578	1578	11.97	5.53	7.06		EM, IR, ref
46	espatulenol		1600			1.11	0.41	EM, IR
47	$\alpha$ -alasken-8-ol	1603		0.68	0.63			EM, IR
48	óxido de humuleno		1626				0.73	EM, IR
49	$\alpha$ -cadinol		1643				1.40	EM, IR

\*El número de pico corresponde al pico indicado en las Figuras 18a y 18b. <sup>a</sup>IR índice de retención experimental determinado en una columna DB-5. <sup>b</sup>EM = espectrometría de masas, IR = índice de retención reportado en la literatura, ref = referencia comercial.

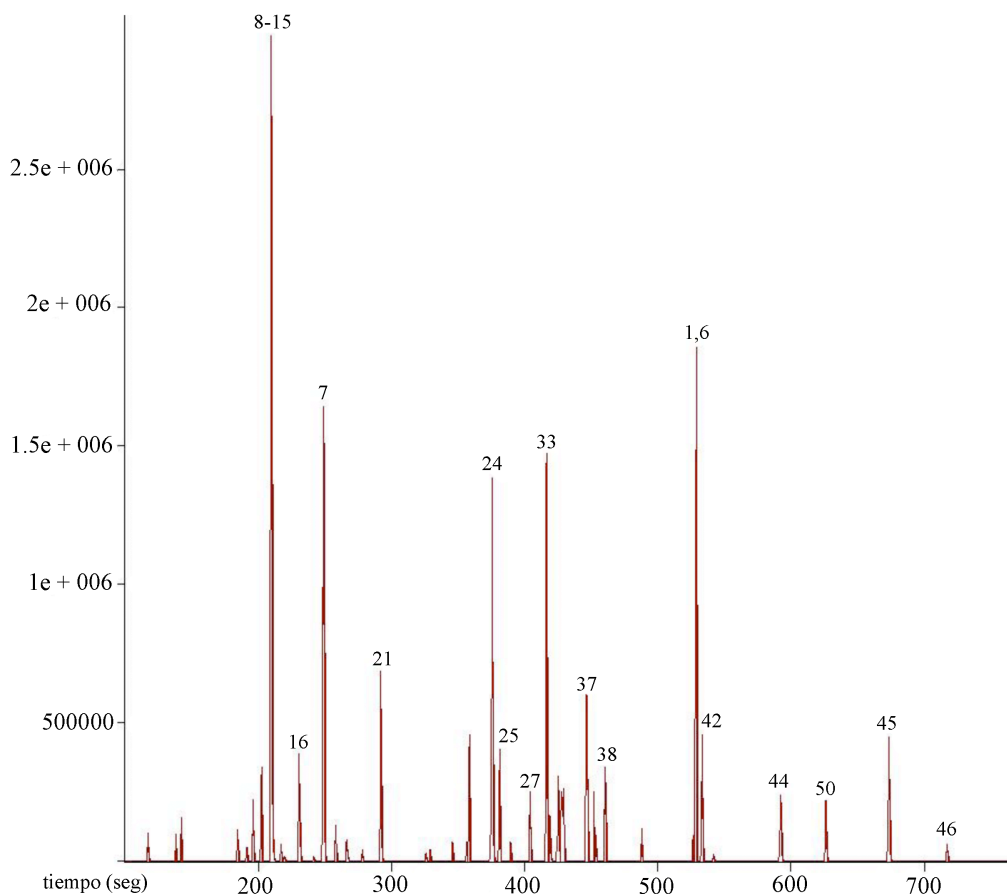
**Tabla 6.** Compuestos volátiles identificados por GC-EM a partir de los aceites esenciales de *P. longiflora* y *L. graveolens*.  
–continuación–

No.*	Compuesto	IR <sup>a</sup>		% de cada componente				Método de identificación <sup>b</sup>
		PL	LG	PL (lote 1)	PL (lote 3)	LG (lote 1)	LG (lote 2)	
<b>Cetonas</b>								
50	γ-octanólida	1196	1196		0.35	5.69		EM, IR
51	piperitenona	1355		5.41				EM, IR
52	3,3,6-trimetil-1,5-heptadien-2-ona	1056			6.17			EM, IR
53	( <i>E</i> )-jasmona	1396			4.52			EM, IR
54	( <i>E</i> )-β-damascona	1399		0.32				EM, IR
55	10-metildecalin-2,7-diona	1530		0.08				EM, IR
<b>Aldehídos</b>								
56	4-(1-metiletetil)-ciclohexenal	1322		11.27	4.88			EM, IR
<b>Total identificados</b>				99.9	99.9	99.2	99.0	

<sup>a</sup>El número de pico corresponde al pico indicado en las Figuras 18a y 18b. <sup>a</sup>IR índice de retención experimental determinado en una columna DB-5. <sup>b</sup>EM = espectrometría de masas, IR = índice de retención reportado en la literatura, ref = referencia comercial.



**Figura 18a.** Cromatograma de gases correspondiente al aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas de *P. longiflora* analizado en una columna capilar DB-5.

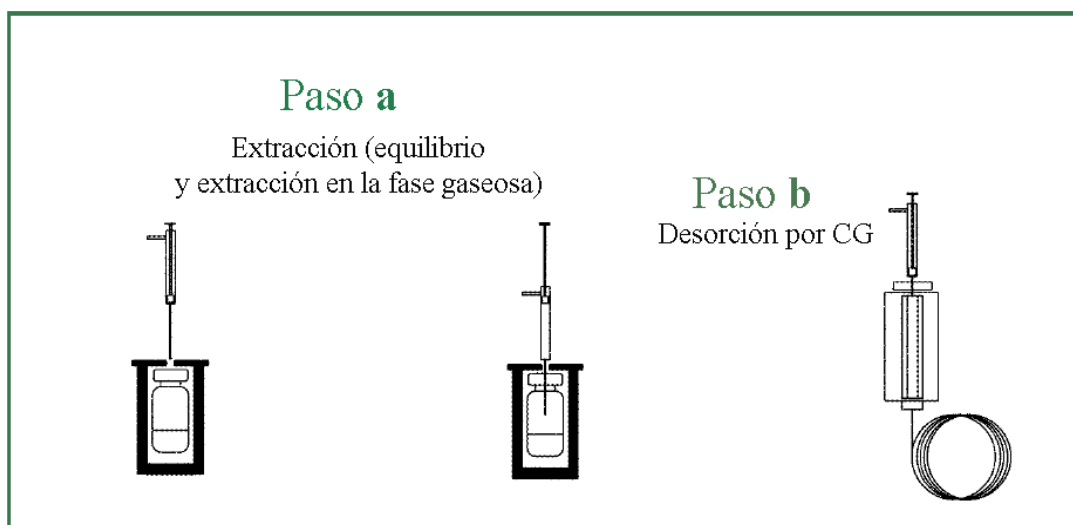


**Figura 18b.** Cromatograma de gases correspondiente al aceite esencial obtenido a partir de las partes aéreas de *L. graveolens* analizado en una columna capilar DB-5.

Estas diferencias observadas para ambas especies de oréganos pueden ser de utilidad para diferenciar a las dos especies comercializadas indistintamente. Sin embargo, futuros estudios sobre la especie *P. longiflora* deben de realizarse para establecer las diferencias en el contenido metabólico con respecto a la época de recolecta y las variaciones de tipo geográficas y ontogénicas.

Por otra parte, con la finalidad de complementar la información obtenida a partir de los análisis de las esencias de ambos oréganos por CG-EM, y para establecer el contenido de los componentes volátiles con mayor detalle, se realizó un análisis de microextracción sólida en fase gaseosa (HS-SPME). La SPME se basa en la extracción de los analitos de una matriz, en este caso el material vegetal fresco o seco, mediante una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria, que en la mayoría de los casos es de naturaleza química polimérica, seguida de la desorción de los compuestos

mediante temperatura o un disolvente orgánico. En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas: la primera es un proceso de extracción en la que la fibra recubierta con la fase estacionaria se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinada, de manera que se produce la migración de los analitos desde la solución hacia la fibra hasta que se alcanza un equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra. En la **Figura 19** se muestra una ilustración del proceso de SPME en fase gaseosa.



**Figura 19.** Esquema del proceso de a) extracción y b) desorción por HS-SPME-CG.

La forma más habitual de llevar a cabo la desorción de los compuestos es térmicamente acoplando a la SPME con la CG de forma tal, que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas acarreador. Generalmente, la naturaleza del analito a ensayar determina el tipo de fibra a utilizar, empleándose recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para compuestos de naturaleza química polar y recubrimientos como PDMS para aquellos menos polares. En el presente trabajo se utilizaron dos diferentes tipos de fibras: la de carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y polidimetilsiloxano (PDMS).

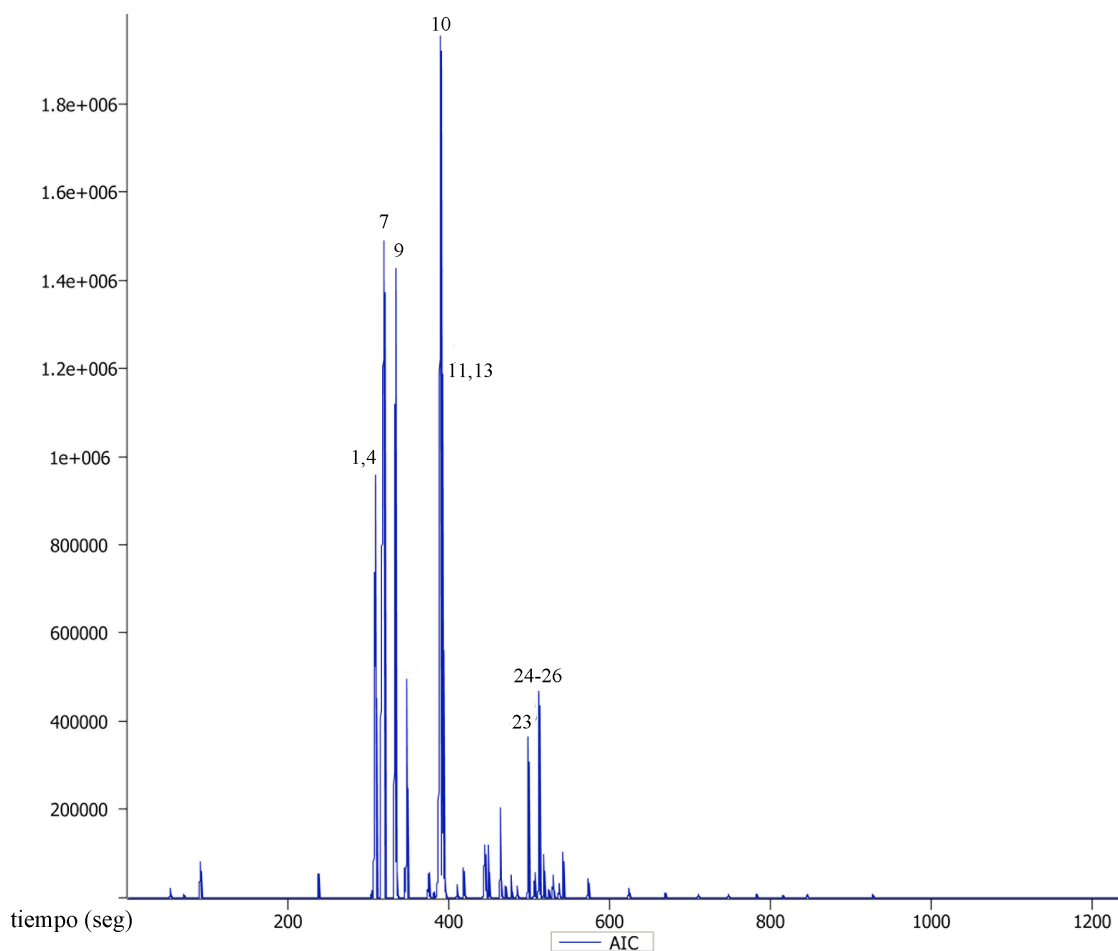
Los resultados obtenidos a partir de estos análisis nos permitieron establecer que los mejores perfiles cromatográficos se obtuvieron con la fase sólida poco polar de PDMS para ambas especies analizadas (**Tablas 7-8; Figuras 20-22**).

En el caso de *P. longiflora*, el  $\alpha$ -terpineno, el limoneno, el *p*-cimeno, el eucaliptol, el  $\gamma$ -terpineno y el éter metílico de carvacrol fueron identificados como los componentes volátiles más abundantes (**Figura 20**), en tanto que, en *L. graveolens* se identificaron al  $\alpha$ -pineno, al *p*-cimeno, al eucaliptol y al  $\beta$ -cariofileno como los principales componentes.

**Tabla 7.** Componentes volátiles identificados en las partes aéreas de *P. longiflora* por la técnica de HS-SPME utilizando las fibras de CAR/PDMS y PDMS.

No. Pico*	Compuesto	IR <sup>a</sup>	área (%)	
			CAR/PDMS	PDMS
1	$\alpha$ -tujeno	920		0.3
2	$\alpha$ -pineno	926		
3	campfeno	941		
4	$\alpha$ -sabineno	965		0.2
5	$\beta$ -pineno	969		
6	$\alpha$ -mirceño	985	3.0	
7	$\alpha$ -felandreno	1003	1.9	2.3
8	D-2-careno	1000		0.4
9	$\alpha$ -terpineno	1012	2.3	0.4
10	<i>p</i> -cimeno	1023	58.4	66.5
11	limoneno	1025		7.3
12	eucaliptol	1027	4.5	
13	$\gamma$ -terpineno	1057		5.9
14	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1068		2.6
15	<i>p</i> -cimeneno	1075		1.1
16	terpinen-4-ol	1164		0.5
17	$\alpha$ -terpineol	1176		0.3
18	éter metílico del carvacrol	1226		6.6
19	1-acetoxi-4-etilbenceno	1238	1.10	
20	acetato de bornilo	1270		0.4
21	carvacrol	1310	14.5	6.2
22	acetato de carvacrilo	1378	0.4	
23	$\beta$ -cariofileno	1415	0.5	0.2
24	aromadendreno	1443		0.2
25	germacreno D	1470		0.5
26	germacreno A	1508		0.5

\*El número de pico corresponde al número indicado en la **Figura 20**. <sup>a</sup>El IR de cada compuesto corresponde al IR reportado en la literatura determinado en una columna DB-5.



**Figura 20.** Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de *P. longiflora* analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de HS-SPME. Picos:  $\alpha$ -tujeno (1);  $\alpha$ -sabineno (4);  $\alpha$ -felandreno (7); D-2-careno (8);  $\alpha$ -terpineno (9); *p*-cimeno (10); limoneno (11);  $\gamma$ -terpineno (13); (*Z*)-hidrato de sabineno (14); *p*-cimeneno (15); terpinen-4-ol (16);  $\alpha$ -terpineol (17); éter metílico del carvacrol (18); acetato de bornilo (20); carvacrol (21);  $\beta$ -cariofileno (23); aromadendreno (24); germacreno D (25); germacreno A (26).

**Tabla 8.** Componentes volátiles identificados en las partes aéreas de *L. graveolens* por la técnica de HS-SPME utilizando las fibras de CAR/PDMS y PDMS.

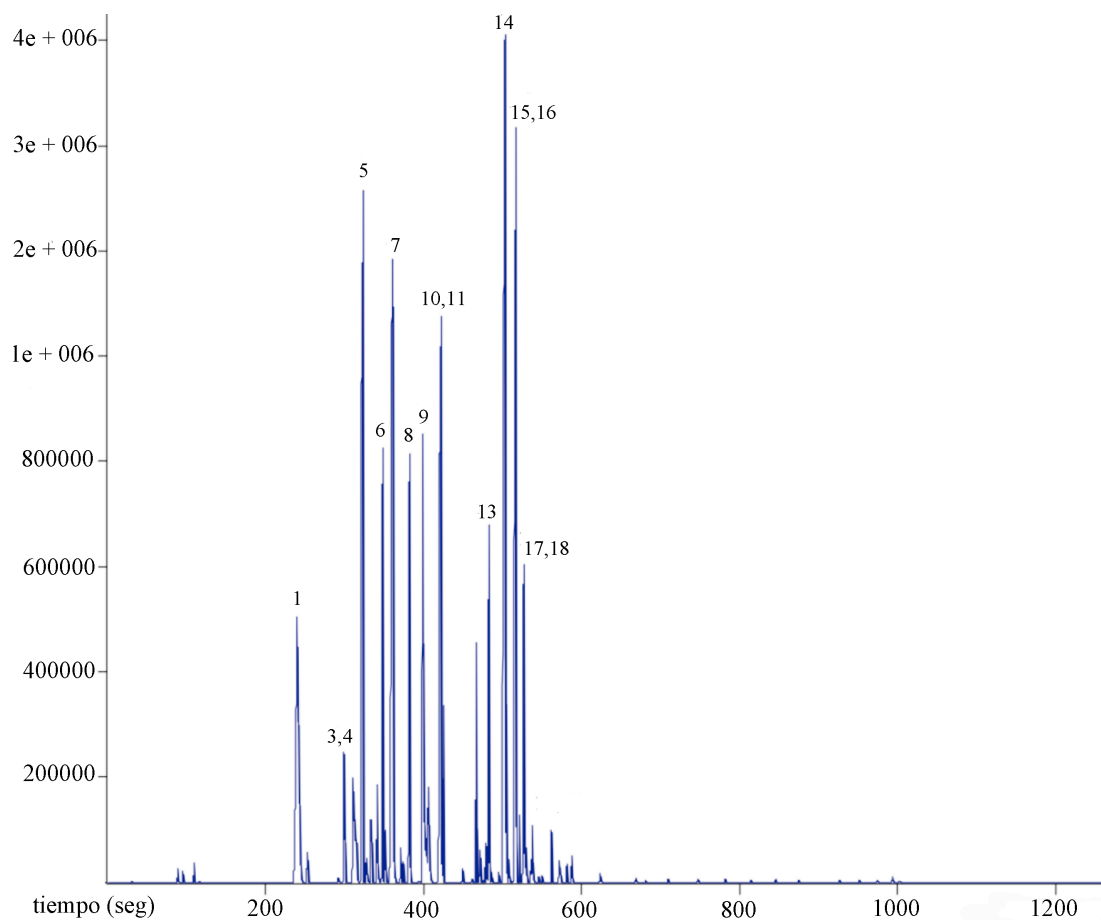
No. Pico*	Compuesto	IR <sup>a</sup>	área (%)	
			CAR/PDMS	PDMS
1	$\alpha$ -pineno	926	4.8	18.7
2	$\beta$ -pineno	969	3.3	
3	$\alpha$ -mirceno	985		1.9
4	$\alpha$ -felandreno	1003		2.3
5	<i>p</i> -cimeno	1023	4.5	15.1
6	eucaliptol	1027	2.6	17.0
7	$\gamma$ -terpineno	1057	1.1	14.2
8	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1068	4.8	2.8
9	camfor	1123	1.7	2.0
10	terpinen-4-ol	1164	2.8	2.3
11	éter metílico del carvacrol	1226	5.2	2.6
12	carvacrol	1310	1.0	
13	acetato de carvacrilo	1378		0.7
14	$\beta$ -cariofileno	1415	14.5	16.2
15	aromadendreno	1443	7.2	0.2
16	germacreno D	1470	5.1	0.3
17	germacreno A	1508		0.3
18	óxido de longipineno	1565		0.2

\*El número de pico corresponde al número indicado en la **Figura 21**. <sup>a</sup>El IR de cada compuesto corresponde al IR reportado en la literatura determinado en una columna DB-5.

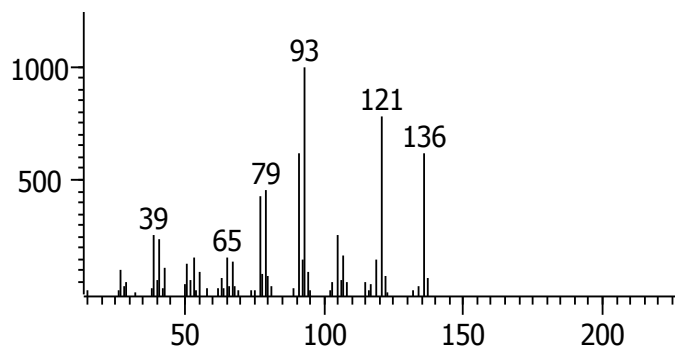
Cabe mencionar que los resultados obtenidos del análisis por CG de las esencias y los de HS-SPME no son comparables, debido a que los principios fisicoquímicos que fundamentan ambas técnicas analíticas son muy distintos. En este caso, los resultados cualitativos obtenidos en cada caso están en armonía, de tal manera que la HS-SPME puede ser utilizada como una técnica complementaria, rápida y eficiente para la detección de compuestos volátiles en ambos oréganos.

En síntesis, los aceites esenciales de *P. longiflora* y *L. graveolens* presentan una composición química similar a la reportada para varias especies relacionadas pertenecientes al género *Origanum* y que también presentan al carvacrol (**1**) como el constituyente mayoritario (Aydin *et al.*, 1996; Lecona-Urbe *et al.*, 2007; Saeedi y Morteza-Semnanai, 2007).

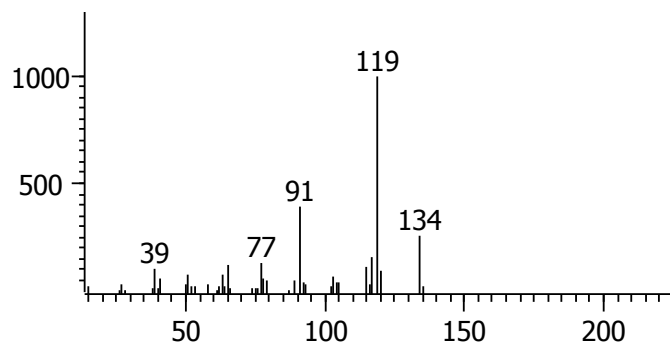




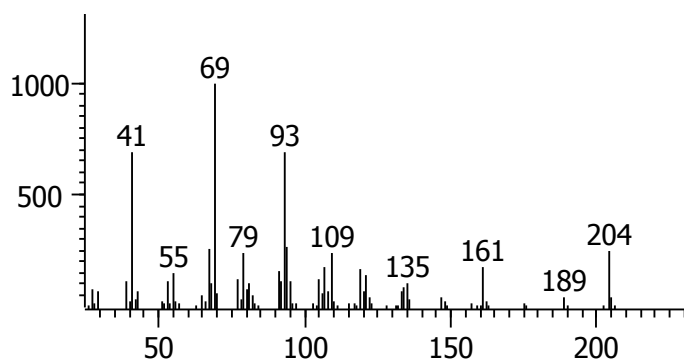
**Figura 21.** Cromatograma de gases de los componentes volátiles presentes en las partes aéreas de *L. graveolens* analizados en una columna capilar DB-5 por la técnica de HS-SPME. Picos:  $\alpha$ -pineno (**1**);  $\alpha$ -mirceno (**3**);  $\alpha$ -felandreno (**4**); *p*-cimeno (**5**); eucaliptol (**6**);  $\gamma$ -terpineno (**7**); (*Z*)-hidrato de sabineno (**8**); camfor (**9**); terpinen-4-ol (**10**); éter metílico del carvacrol (**11**); acetato de carvacrilo (**13**);  $\beta$ -cariofileno (**14**); aromadendreno (**15**); germacreno D (**16**); germacreno A (**17**); óxido de longipineno (**18**).



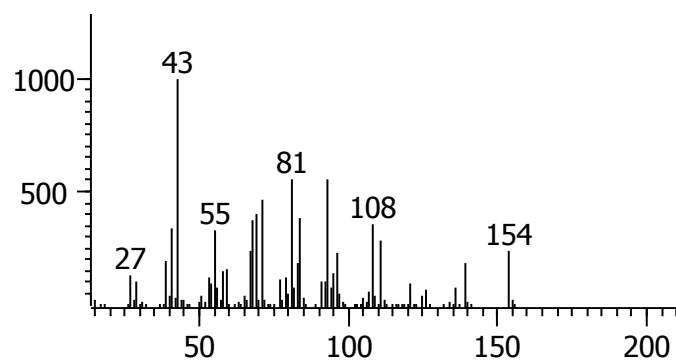
**a**



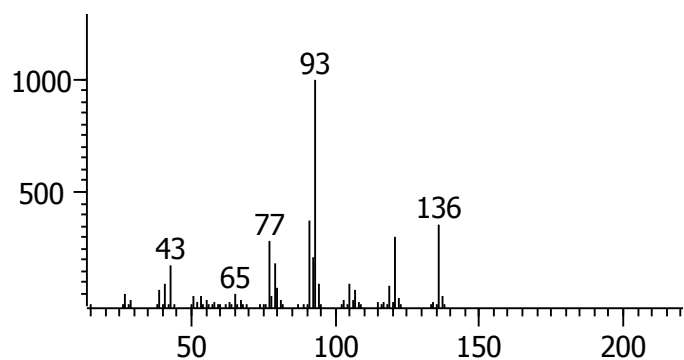
**b**



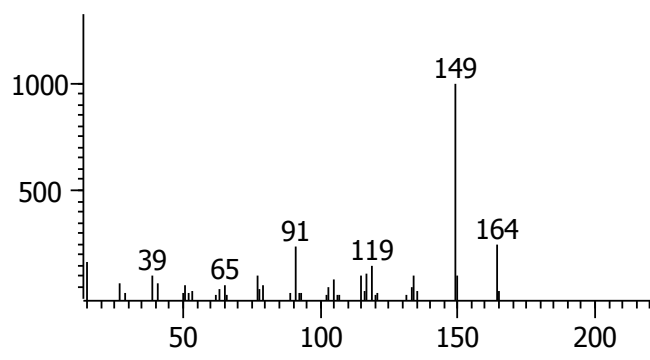
**c**



**d**



**e**



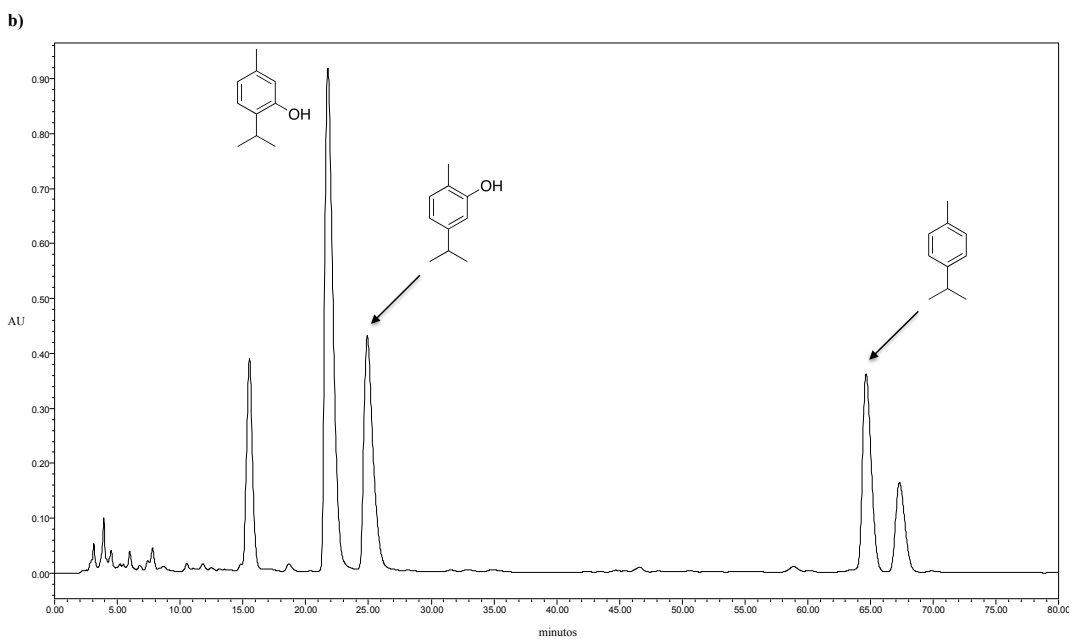
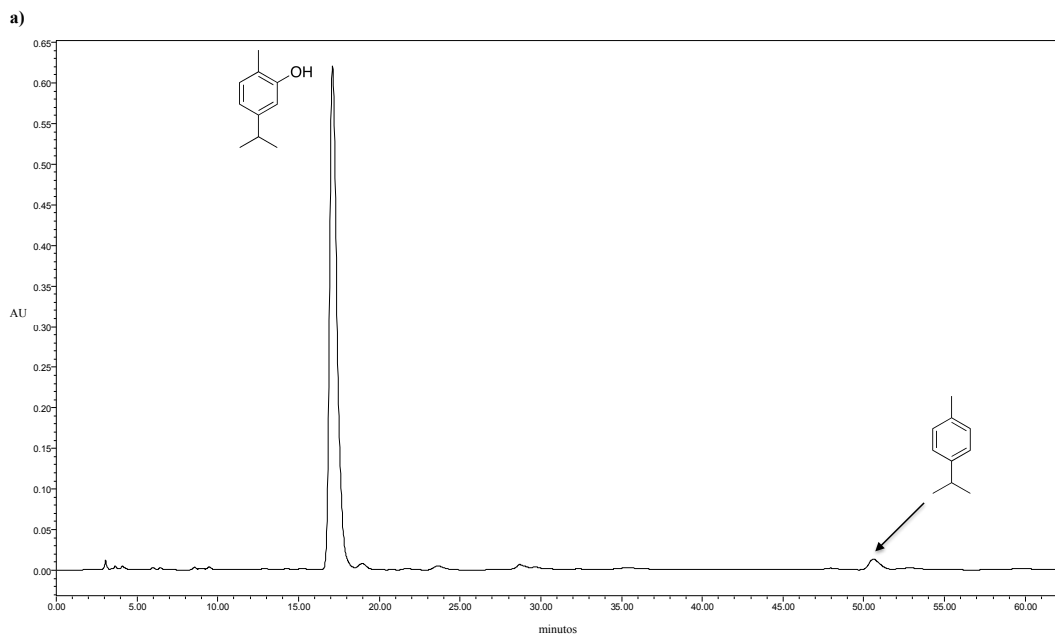
**f**

**Figura 22.** Principales componentes volátiles presentes en las partes aéreas de *P. longiflora* identificados por la técnica de espectrometría de masas:  $\alpha$ -terpineno (**a**); *p*-cimeno (**b**); limoneno (**c**); eucaliptol (**d**);  $\gamma$ -terpineno (**e**); éter metílico del carvacrol (**f**).

### 5.2.2 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de los aceites esenciales.

Con el objetivo de completar las pruebas de identidad química mediante el establecimiento de perfiles cromatográficos, así como desarrollar un método apropiado para establecer la composición de los oréganos mexicanos y cuantificar el contenido de principios activos y/o marcadores, se utilizó la técnica de CLAE. Esta técnica es ampliamente utilizada para el análisis de productos herbolarios debido a que es de fácil implementación y no está limitada por la falta de volatilidad o termoestabilidad de los constituyentes de las drogas, por lo tanto, prácticamente se puede aplicar para el análisis de cualquier material vegetal. Para lograr la separación eficiente de los productos presentes en las complejas matrices es necesario ajustar adecuadamente las condiciones de trabajo, considerando el uso de columnas apropiadas y fases móviles de diferente composición con un valor de pH adecuado.

Los perfiles cromatográficos obtenidos para cada una de las esencias analizadas se obtuvieron por ensayo y error. Este análisis permitió establecer que el carvacrol (**1**), el timol (**6**) y el *p*-cimeno (**7**) constituyen los compuestos marcadores para la identificación de ambas especies de oréganos. Las condiciones óptimas de separación fueron obtenidas en una fase reversa Synergi Hydro-RP C18 utilizando como fase móvil un sistema binario isocrático de CH<sub>3</sub>CN–agua (55:45). El análisis de la esencia de *P. longiflora* mediante la aplicación de estas condiciones analíticas generó el cromatograma que se ilustra en la **Figura 23**, donde los picos correspondientes al carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**) representan el 91.1% y 2.7%, respectivamente del total del área cuantificada en el cromatograma. En el caso de la esencia de *L. graveolens*, las áreas cuantificadas para los picos correspondientes al timol (**6**), al carvacrol (**1**) y al *p*-cimeno (**7**) fueron del 36.4, 19.0 y 15.3%, respectivamente. Finalmente, la presencia de **1** en *P. longiflora* permite relacionar quimiotaxonómicamente a esta especie con otras especies del complejo de oréganos.



**Figura 23.** Cromatograma de los aceites esenciales de los oréganos mexicanos obtenidos por CLAE. **a)** *P. longiflora*; **b)** *L. graveolens*. Fase móvil: sistema isocrático binario constituido por CH<sub>3</sub>CN-agua (55:45), velocidad de flujo 1.0 mL/min. Fase estacionaria: columna Synergi Hydro RP (Phenomenex, tamaño de partícula de 5 µm), de 4.6 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud. Detección UV: 265 nm.

### 5.2.3 Validación del método analítico para la cuantificación de marcadores.

Para la valoración simultánea del timol (**6**), el carvacrol (**2**) y el *p*-cimeno (**7**) se seleccionó el método analítico por CLAE que se describió en el inciso anterior (**5.2.2**).

Una vez seleccionado el método analítico, se procedió a ajustar experimentalmente la concentración de la matriz de análisis para obtener una respuesta analítica (área bajo la curva) del detector en un rango menor a 0.1 unidades de absorbancia. Posteriormente se ajustaron e identificaron las señales correspondientes a las sustancias de interés **1**, **6** y **7** mediante la técnica de coelución. Los resultados derivados de este análisis permitieron establecer una concentración para la solución de referencia de la matriz de trabajo de los compuestos **1**, **6** y **7** de 0.05, 0.05 y 0.5 mg/mL, respectivamente.

Por otra parte, la evaluación del ajuste del método cromatográfico se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por la FEUM, con la finalidad de establecer si el sistema de medición es adecuado y la respuesta analítica detectada es dependiente de las condiciones de análisis y/o instrumentales. Para ello, se realizaron una serie de inyecciones en el cromatógrafo de una solución de referencia de los compuestos a analizar con una concentración de 0.1 mg/mL para **1** y **6**, y de 1.0 mg/mL para **7**. Los resultados obtenidos y cálculos realizados nos permitieron estimar los siguientes parámetros: coeficiente de variación (CV; 0.7), factor de capacidad ( $K'$ ; 3.7125), resolución (R; 0.5), factor de coleo (T; 0.5) y número de platos teóricos (N; 752). Estos resultados nos permiten establecer que la columna evaluada separa de manera adecuada a los analitos de interés y que la respuesta analítica observada es apropiada para cuantificar el contenido de timol (**6**), carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**) (FEUM, 2007).

A continuación se desarrolló el protocolo para validar el método analítico para cuantificar los principios activos y mayoritarios presentes en los oréganos mexicanos, y así poder completar parte de la información científica necesaria para establecer su composición y cuantificar de manera simultánea los principios biodinámicos presentes en las drogas crudas y preparados herbolarios comerciales.

Los parámetros de calidad evaluados de acuerdo con las normas internacionales establecidas por la International Committee of Harmonization (ICH) y Eurachem

incluyen: linealidad del método y sistema, precisión, exactitud y especificidad (ICHQ2R1, 2005).

### 5.2.3.1 Linealidad del sistema.

Un método es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito adicionado en la muestra objeto de análisis. La linealidad del sistema se determinó construyendo tres curvas de calibración con cinco diferentes niveles de concentración, en un intervalo de concentraciones entre 0.01 y 1.0 mg de la referencia **1** ó **6**, y entre 0.1 y 1.0 mg de la referencia **7**. Los compuestos utilizados como referencia durante el desarrollo del método analítico fueron aislados de la especie *P. longiflora* y tienen una pureza mayor al 98%, de acuerdo con los análisis cromatográficos y espectroscópicos correspondientes. Los resultados de las curvas de calibración se resumen en la **Tabla 9**. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple y permitieron establecer la linealidad del sistema cromatográfico en el intervalo de concentraciones analizadas [ $r^2 = 0.998$  (**6**),  $0.999$  (**1**) y  $0.999$  (**7**)]. Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema se resumen en la **Tabla 10**. Finalmente, para evaluar si las ecuaciones obtenidas describen adecuadamente la relación entre las dos variables (concentración vs respuesta analítica) se realizó un análisis de varianza de la regresión lineal (ANADEVA). En todos los casos, para cada modelo, los resultados indicaron que el parámetro F (estadístico de Fisher) calculado para la regresión supera a su valor crítico, por lo tanto, la variación en la respuesta se encuentra explicada por el modelo propuesto. Posteriormente, las pruebas de hipótesis relativa a los coeficientes de regresión demostraron que las pendientes de la recta de las regresiones obtenidas son diferentes a cero y las ordenadas al origen tiene el valor de  $-5.23 \times 10^4$  (**6**),  $2.11 \times 10^5$  (**1**) y  $-2.9 \times 10^6$  (**7**).

**Tabla 9.** Resultados experimentales de las curvas de calibración del timol (**6**), carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**) para evaluar la linealidad del sistema.

réplica	<b>6</b> (mg/mL)	ABC	<b>1</b> (mg/mL)	ABC	<b>7</b> (mg/mL)	ABC
1	0.01	3403389	0.01	2691931	0.1	7588378
2	0.01	3541234	0.01	2833280	0.1	7480370
3	0.01	4227503	0.01	3309566	0.1	7519691
4	0.01	423458	0.01	3568008	0.1	6902066
5	0.01	3604467	0.01	2829463	0.1	7219695
6	0.01	3762652	0.01	2389344	0.1	7318671
1	0.025	8424279	0.025	7946103	0.25	23950804
2	0.025	8825396	0.025	8364967	0.25	24295139
3	0.025	10132068	0.025	8437539	0.25	24119539
4	0.025	10404584	0.025	8432101	0.25	23672650
5	0.025	8704304	0.025	8220438	0.25	21553907
6	0.025	9320322	0.025	8659506	0.25	28266425
1	0.05	19603838	0.05	13283223	0.5	50123490
2	0.05	21050145	0.05	13450288	0.5	56490356
3	0.05	20925582	0.05	12953010	0.5	52123596
4	0.05	20981491	0.05	13450288	0.5	51586249
5	0.05	19579787	0.05	13079730	0.5	52123490
6	0.05	20486496	0.05	13166605	0.5	50503742
1	0.075	29434432	0.075	18134232	0.75	82655821
2	0.075	28078166	0.075	21365723	0.75	87698176
3	0.075	29009834	0.075	20479330	0.75	92654469
4	0.075	29743109	0.075	20179265	0.75	90585606
5	0.075	29609618	0.075	20389517	0.75	87655827
6	0.075	30425251	0.075	20111330	0.75	92541836
1	0.1	39938151	0.1	27528356	1.0	125084200
2	0.1	39835982	0.1	27448269	1.0	124039531
3	0.1	37686700	0.1	29594407	1.0	129777044
4	0.1	38345159	0.1	31372859	1.0	124039531
5	0.1	37882226	0.1	27249374	1.0	120084320
6	0.1	39400432	0.1	30249750	1.0	127486860

**Tabla 10.** Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema de **6**, **1** y **7**.

Estadístico	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>7</b>
pendiente ( $b_1$ )	382161178.7	285812898.2	121935000.8
ordenada al origen ( $b_0$ )	-52342.79268	211437.3577	-2866389.711
coeficiente de correlación ( $r$ )	0.998	0.999	0.999
coeficiente de determinación ( $r^2$ )	0.950	0.975	0.976
IC ( $\beta_1$ )	$3.6 \times 10^8 - 4.0 \times 10^8$	$2.7 \times 10^8 - 3.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8 - 1.3 \times 10^8$

### 5.2.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación.

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables. Ambos parámetros se determinaron a partir de una curva de calibración utilizando una serie de diluciones preparadas a partir de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg/mL y cinco muestras blanco. Los valores de LD calculados fueron 1.24, 1.15 y 3.85  $\mu\text{g/mL}$  para el carvacrol (1), timol (6) y *p*-cimeno (7), respectivamente, y los LC fueron 3.45, 2.78 y 11.09  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

### 5.2.3.3 Linealidad del método y exactitud.

La linealidad del método se evaluó a partir de las curvas de calibración construidas a partir de tres diferentes concentraciones de los estándares que se adicionaron a la matriz de trabajo. En el caso de 1 y 6, las concentraciones se encontraban en el intervalo entre 0.01 y 0.1 mg/mL; y para 7 en un intervalo entre 0.1 y 1.0 mg/mL, que representan el 50–150% de los analitos ensayados.

En las **Tablas 11-13** se muestran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método. Los parámetros determinados en las curvas de regresión ajustada fueron  $3 \times 10^8x + 211437$  (1),  $4 \times 10^8x - 47331$  (6) y  $1 \times 10^8x - 3 \times 10^6$  (7). Estos resultados indican que el método desarrollado es lineal y cumple con los criterios de aceptación ( $b_0 = 0$ ,  $b_1 \neq 0$ ,  $r \geq 0.99$ ,  $r^2 \geq 0.98$  y  $CV_{y/x} \leq 3\%$ ) establecidos en la norma internacional ICHQ2R1 (2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las **Tablas 11-13**. Estos resultados para el carvacrol (1), timol (6) y *p*-cimeno (7) se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98-102%). Por lo tanto, el método es



lineal dentro del rango de concentraciones analizadas para los compuestos **1**, **6** y **7**. La pendiente calculada en los tres casos es diferente de cero y los coeficientes de determinación indican que el 99.8, 99.8 y 99.0 % de los datos, respectivamente, se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal.

**Tabla 11.** Resultados experimentales de la curva de calibración del carvacrol (**1**) para evaluar la linealidad y exactitud del método.

réplica	nivel	Concentración adicionada (mg/mL)	Área	Concentración adicionada (mg/mL)	recobro(%)
1	150	0.1	29580824	0.102	102.7
2	150	0.1	29244872	0.101	101.6
3	150	0.1	29450892	0.102	102.3
4	150	0.1	28903076	0.099	99.5
5	150	0.1	28556391	0.100	100.4
6	150	0.1	28640320	0.099	99.2
1	100	0.05	13484439	0.046	92.9
2	100	0.05	14269035	0.049	98.4
3	100	0.05	14872843	0.051	102.6
4	100	0.05	14330631	0.049	98.8
5	100	0.05	14269035	0.049	98.4
6	100	0.05	14733468	0.050	101.6
1	50	0.01	3039407	0.009	98.9
2	50	0.01	3029463	0.009	98.6
3	50	0.01	3059202	0.009	99.6
4	50	0.01	3061347	0.009	99.7
5	50	0.01	3064260	0.009	99.8
6	50	0.01	3094571	0.010	100.9

**Tabla 12.** Resultados experimentales de la curva de calibración del timol (**6**) para evaluar la linealidad y exactitud del método.

réplica	nivel	Concentración adicionada (mg/mL)	Área	Concentración adicionada (mg/mL)	recobro(%)
1	150	0.1	39195088	0.102	102.7
2	150	0.1	39037234	0.102	102.3
3	150	0.1	39360184	0.103	103.1
4	150	0.1	39215921	0.102	102.7
5	150	0.1	38224276	0.100	100.1
6	150	0.1	38768417	0.101	101.6
1	100	0.05	18985766	0.049	99.6
2	100	0.05	19310399	0.050	101.3
3	100	0.05	18927331	0.049	99.3
4	100	0.05	19127394	0.050	100.4
5	100	0.05	19014807	0.049	99.8
6	100	0.05	19533163	0.051	102.5
1	50	0.01	3730433	0.009	99.0
2	50	0.01	3836251	0.010	101.8
3	50	0.01	3753606	0.009	99.6
4	50	0.01	3863144	0.010	102.5
5	50	0.01	3856732	0.010	102.3
6	50	0.01	3834521	0.010	101.7

**Tabla 13.** Resultados experimentales de la curva de calibración del *p*-cimeno (7) para evaluar la linealidad y exactitud del método.

réplica	nivel	Concentración adicionada (mg/mL)	Área	Concentración adicionada (mg/mL)	recobro(%)
1	150	1.0	125046587	1.002	100.2
2	150	1.0	122426093	0.980	98.0
3	150	1.0	126499221	1.013	101.4
4	150	1.0	126090141	1.010	101.0
5	150	1.0	125525629	1.005	100.6
6	150	1.0	124550973	0.997	99.8
1	100	0.5	63727106	0.499	99.8
2	100	0.5	63586249	0.497	99.6
3	100	0.5	64503742	0.505	101.1
4	100	0.5	65123490	0.510	102.1
5	100	0.5	64883780	0.508	101.7
6	100	0.5	63977288	0.501	100.2
1	50	0.1	14995037	0.099	99.5
2	50	0.1	15252562	0.101	101.6
3	50	0.1	15242888	0.101	101.5
4	50	0.1	15142599	0.100	100.7
5	50	0.1	15152843	0.100	100.8
6	50	0.1	15222300	0.101	101.3

#### 5.2.3.4 Precisión.

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

La precisión del método analítico se determinó mediante diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetitividad), es decir, la fidelidad de los valores experimentales de un mismo parámetro medidos bajo idénticas condiciones experimentales, la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). Esta última se refiere a la fidelidad de los valores experimentales de una misma cuantificación medida bajo diferentes condiciones experimentales.

Los valores de DER calculados para **1**, **6** y **7** fueron de 1.5, 1.5 y 1.0, respectivamente, todos los resultados son menores que 2.0%, por lo tanto, el sistema es repetitivo. Finalmente, la reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de tres diferentes soluciones homogéneas que contenían a los analitos de interés. Este análisis se realizó por dos analistas en dos diferentes días. En todos los

casos, la DER fue menor al 1.5%. El conjunto de resultados descritos nos permiten concluir que el método desarrollado es preciso.

### 5.2.3.5 Cuantificación simultánea de marcadores.

Una vez validado el método analítico, se analizaron las concentraciones de los tres metabolitos presentes en las esencias preparadas por hidrodestilación a partir de los diferentes lotes de material vegetal. En general, en las esencias de *P. longiflora* la relación carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**) fue de 13:1 con valores promedios de  $736.6 \pm 6.59$  y  $56.9 \pm 0.39$  mg/g, respectivamente. El timol (**6**) no fue detectado en ninguno de los tres lotes de *P. longiflora* analizados. En contraste, en *L. graveolens*, el componente mayoritario fue el timol (**6**) [ $221.5 \pm 1.35$  mg/g], además se cuantificaron carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**) [ $164.7 \pm 0.67$  y  $149.2 \pm 0.87$  mg/g, respectivamente]. La relación de los tres productos fue de 1:0.7:0.5, respectivamente.

## 5.3 Análisis químico de la infusión.

El extracto orgánico obtenido a partir de la infusión de *P. longiflora* se sometió a una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió el aislamiento del carvacrol (**1**) y *p*-cimeno (**7**), así como, de las flavonas luteolina (**4**) y apigenina (**5**) como los principales componentes presentes en la infusión.

Con estos resultados fue posible establecer el perfil cromatográfico de la infusión mediante la técnica de CLAE. Este procedimiento permitió la identificación de las flavonas **4-5** y los terpenoides **1** y **7**, como los principales compuestos presentes (**Figura 24**). Las condiciones óptimas de separación fueron obtenidas en una fase reversa Hibar LiChrospher RP C18 utilizando como fase móvil un gradiente de CH<sub>3</sub>CN-agua (0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) [0–60 min: (8:92) → (1:1)]. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min. Utilizando estas condiciones analíticas, los picos correspondientes al carvacrol (**1**), *p*-cimeno (**7**), luteolina (**4**) y apigenina (**5**) representan el 15, 12, 29 y 12%, respectivamente, del total del área cuantificada en el cromatograma correspondiente. En el caso, de la infusión de *L. graveolens*, la apigenina se observó como el compuesto más abundante (85% del área

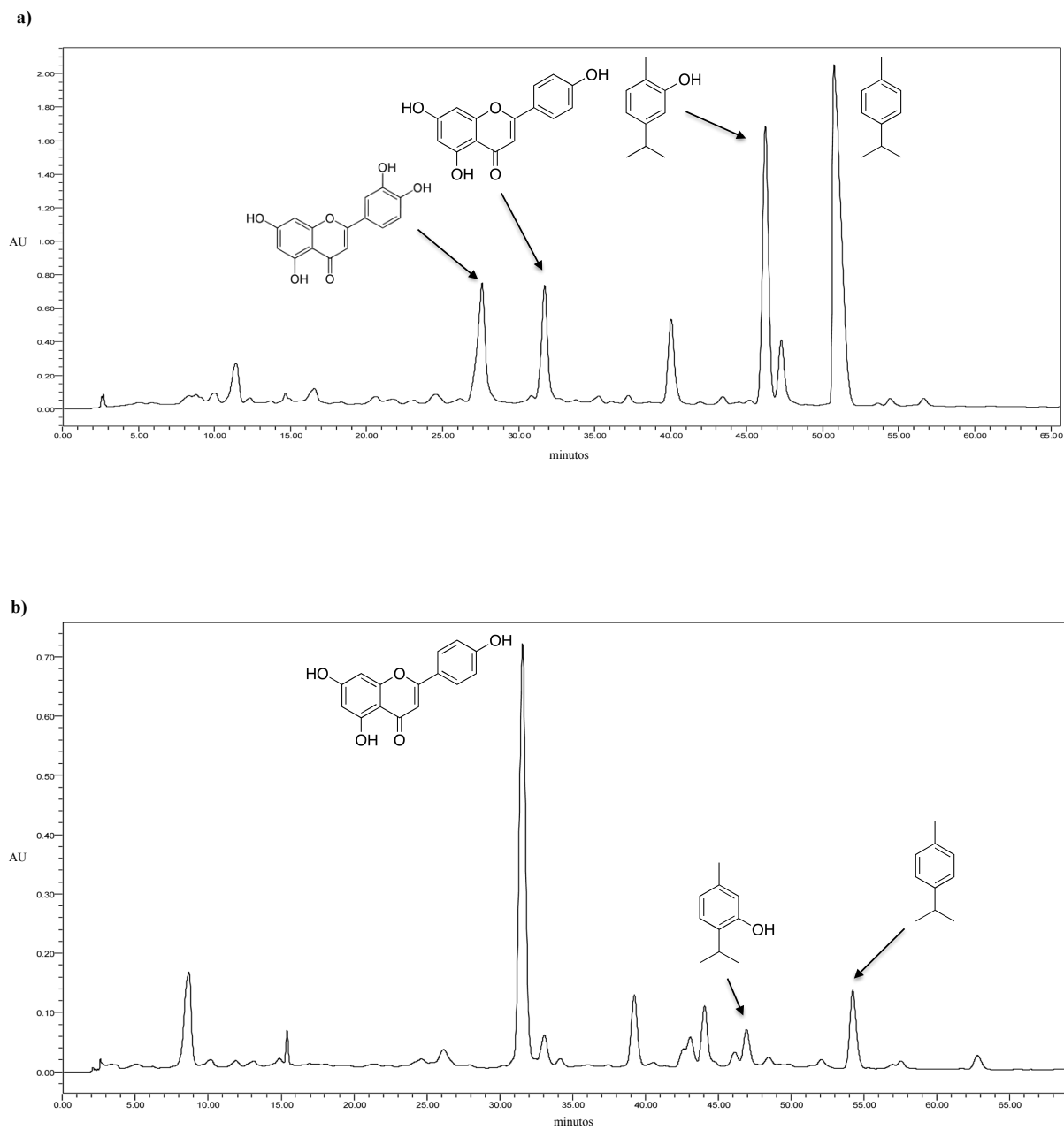
total). Todos los metabolitos se identificaron mediante la coelución con los compuestos de referencia aislados a partir de la misma especie y mediante la comparación de sus espectros de absorción en el ultravioleta y de sus tiempos de retención.

#### **5.4 Principales metabolitos secundarios presentes en los oréganos mexicanos.**

Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto orgánico se decidió realizar un estudio químico del extracto orgánico de *P. longiflora*, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección experimental. Este estudio permitió determinar que los ácidos ursólico y oleanólico son los productos mayoritarios, aunque también fue posible aislar los productos **1**, **6** y el ácido rosmarínico. Todos los compuestos aislados se identificaron por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con aquellas previamente descritas en la literatura.

#### **5.5 Correlación entre la composición química y las propiedades farmacológicas.**

La mayoría de los compuestos caracterizados en el aceite esencial e infusión de los oréganos estudiados son principios activos bien conocidos. De acuerdo con los estudios de eficacia preclínica realizados en el presente estudio, los principios antisépticos principales de los aceites e infusiones de los oréganos son el timol, el carvacrol, el *p*-cimeno y la flavona apigenina en el caso de *L. graveolens*, y el carvacrol, el *p*-cimeno, la luteolina y la apigenina, en el caso de *P. longiflora*. Los principios espasmolíticos e hipoglucemiante incluyen también a estos flavonoides y terpenoides (**Tabla 14**). En los siguientes párrafos se discutirá la correlación entre los estudios farmacológicos realizados por otros autores para los metabolitos mayoritarios y las propiedades farmacológicas atribuidas a las plantas.



**Figura 24.** Cromatograma de las infusiones de los oréganos mexicanos obtenidos por CLAE. **a)** *P. longiflora*; **b)** *L. graveolens*. Fase móvil: gradiente CH<sub>3</sub>CN-agua (0.2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) [0–60 min: (8:92) → (1:1)], velocidad de flujo 1.0 mL/min. Fase estacionaria: columna Hibar LiChrospher RP C18 (Merck, tamaño de partícula de 5 µm). Detección UV: 330 nm.

### 5.5.1 Monoterpenoides: timol, carvacrol y *p*-cimeno.

En el caso de los monoterpenoides timol y carvacrol se encuentran descritas varias revisiones que resumen sus principales propiedades terapéuticas, incluyendo antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, insecticidas, antinociceptivas, antitumorales, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, antivirales y espasmolíticas. En el caso del *p*-cimeno los estudios son más escasos y recientes (Ultee *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2004; Van Zyl *et al.*, 2006; Baser, 2008; Dudai, 2008; Mastelic *et al.*, 2008; Astani *et al.*, 2010; Guimaraes *et al.*, 2010).

Las propiedades más notables comprobadas para los monoterpenoides fenólicos (timol y carvacrol) son las antifúngicas y antibacterianas. Así, ambos compuestos inhiben el crecimiento de *Candida albicans* y hongos patógenos afectando la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa de estos organismos (Pauli, 2006). También han demostrado importantes efectos bactericidas contra microorganismos Gram positivo y Gram negativo, incluyendo a los patógenos orales *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus epidermidis* (Dorman y Deans, 2000). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de estos productos involucra el acarreamiento de protones desde el exterior hacia el interior de la membrana citoplasmática, alterando la estabilidad de la célula y con ello la muerte de la bacteria (Ultee *et al.*, 2002).

La propiedad antimicrobiana de los preparados de *P. longiflora* analizados en este estudio se explica debido a la presencia de los metabolitos secundarios de tipo monoterpenoide y flavonoide. Esta especie demostró la mejor eficacia como agente antiséptico; el mejor efecto de su aceite esencial en comparación al de *L. graveolens*, se puede deber al menor contenido de *p*-cimeno encontrado en el análisis por CLAE de ambas esencias.

En un estudio reciente se comprobó que el *p*-cimeno antagoniza el efecto antibacteriano del carvacrol y timol contra *S. mutans* (Botelho *et al.*, 2007). Este antagonismo explica también el mejor efecto antiséptico de la esencia de *P. longiflora* con respecto a la actividad de *L. graveolens* y compuestos puros como el carvacrol, el timol y el *p*-cimeno.

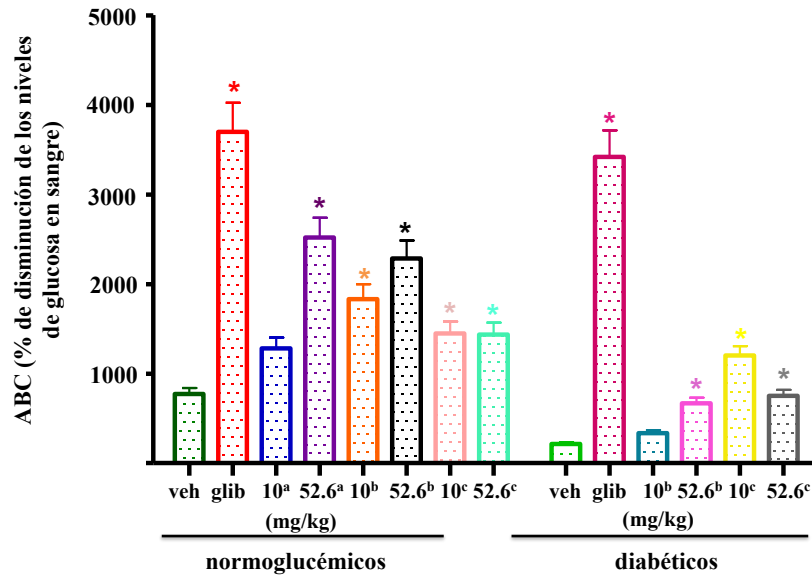
Por otra parte, el mecanismo mediante el cual estos productos ejercen su actividad espasmolítica aún no se encuentra definido. De manera general, algunos autores describen que **1** presenta un modo de acción similar al de su isómero estructural el timol (**6**), el cual involucra una respuesta de tipo bifásica con un modo de acción inespecífico y no competitivo, como antagonistas del ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Van Den Broucke y Lemli, 1980; 1982).

También existen reportes de la actividad antinociceptiva para este metabolito en el modelo de nocicepción de la formalina (Guimaraes *et al.*, 2010). Sin embargo, en este estudio no fue posible corroborar esta propiedad.

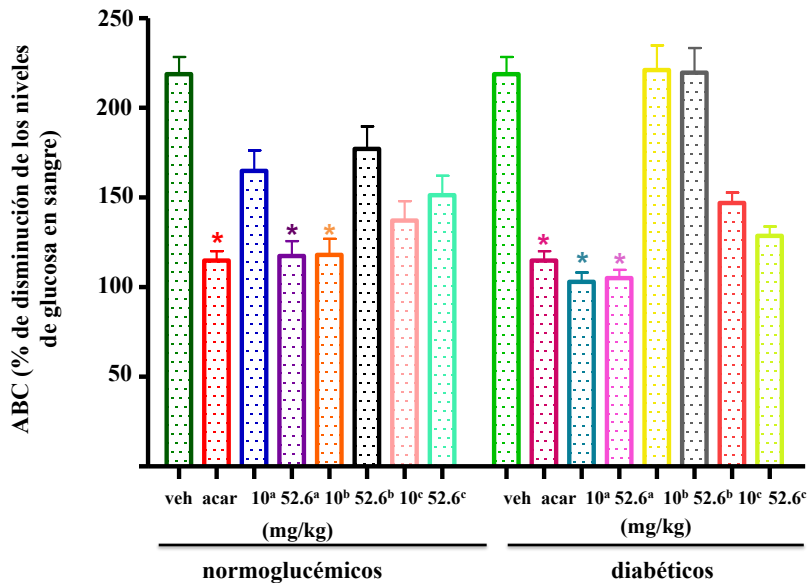
**Tabla 14.** Resumen de las actividades farmacológicas de los principales metabolitos identificados en los oréganos mexicanos.

compuesto	actividad biológica					
	antinociceptiva	antioxidante	antibacteriana	espasmolítica	antitumoral	antidiabética
carvacrol (1)						
ácido ursólico (2)						
ácido oleanólico (3)						
luteolina (4)						
apigenina (5)						
timol (6)						
<i>p</i> -cimeno (7)						

Finalmente, en el presente trabajo se evaluó el potencial antidiabético de los monoterpenoides **1**, **6** y **7**, utilizando los mismos modelos descritos para la evaluación de los preparados de estos oréganos. Al igual que los extractos orgánicos, los compuestos **1** y **7** sólo demostraron propiedades hipoglucemiantes moderadas a las dosis evaluadas (**Figura 25**) en ratones normales. En las pruebas de OSTT realizadas, solo el *p*-cimeno (**7**) presentó una acción antihiper glucémica importante ( $*p < 0.05$ , **Figura 26**). Sin embargo, como este producto es minoritario con relación a **1** y **6**, el efecto farmacológico que predomina en los preparados es el hipoglucémico.



**Figura 25.** Efecto agudo los marcadores **a)** *p*-cimeno, **b)** carvacrol y **c)** timol en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglicémicos y NAD-STZ-diabéticos. VEH: vehículo; GLIB: glibenclamida (10 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



**Figura 26.** Efecto de los marcadores **a)** *p*-cimeno, **b)** carvacrol y **c)** timol en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglicémicos y NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. VEH: vehículo; ACAR: acarbose (5 mg/kg). Los datos se expresan como área bajo la curva (ABC) de la disminución de los niveles de glucosa en sangre con respecto al tiempo. Cada barra representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



### **5.5.2 Flavonoides luteolina y apigenina.**

Los flavonoides caracterizados en la infusión de la planta podrían contribuir de manera importante en los efectos antibacterianos, antiinflamatorios y/o hipoglucemiantes caracterizados en la especie. En numerosos estudios farmacológicos reportados en la literatura se ha demostrado el potencial terapéutico de la luteolina como un importante agente quimiopreventivo, que inhibe el proceso de angiogénesis, induce la apoptosis en varios modelos animales y modula la actividad de las enzimas topoisomerasas I y II (Chakraborty y Majumder, 1988; Liu, 1989; Chowdhury *et al.*, 2002; López-Lázaro, 2009). Otros reportes describen el potencial de la luteolina como agente antihiper glucémico que disminuye la captación de glucosa en adipocitos. Por otra parte, Ong y colaboradores (2011) reportaron que el potencial antihiper glucémico de este polifenol se debe a la estimulación de la captación de glucosa en el músculo esquelético (GLUT-4) y a la inhibición de la enzima hepática G6Pasa, que desempeña un papel importante en el proceso de gluconeogénesis. Sin embargo, todos estos estudios se realizaron *in vitro* y no pueden correlacionarse con los efectos *in vivo* observados para las infusiones de ambos oréganos en el presente estudio. Por último, aunque no de interés para el presente estudio, cabe mencionar que este metabolito es un excelente agente antifibrótico (Cheng *et al.*, 2010).

### **5.5.3 Ácidos orgánicos: oleanólico y ursólico.**

La presencia de estos ácidos en las partes aéreas de *P. longiflora* están en armonía con las propiedades hipoglucemiantes del extracto orgánico de la planta. Estos ácidos regulan la secreción de insulina y glucógeno hepático estimulando la captación de glucosa, además de actuar como supresores del proceso de angiogénesis en pacientes con retinopatías no proliferativas (Liu, 1995; Skopinski *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007).

Otras propiedades de los ácidos que pueden correlacionarse con los usos de la planta son las antioxidantes, antitumorales, antifúngicas y antiinflamatorias (Huang *et*

*al.*, 2006; Baricevic *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

## 6. Conclusiones

a) Los estudios iniciales de toxicidad aguda de los extractos orgánicos de *P. longiflora* permitieron detectar que después de un período de almacenamiento los extractos son extremadamente tóxicos, efecto que debe ser señalado a los consumidores de la planta. Sin embargo, los preparados frescos de la planta, sean infusiones, extractos orgánicos o aceites esenciales, son inocuos de acuerdo a los criterios de Lorke, sugiriendo que los principios tóxicos se forman durante el almacenamiento. Cabe señalar, que los perfiles cromatográficos de los extractos frescos y almacenados son similares.

b) Los experimentos farmacológicos realizados a lo largo del proyecto, y que fueron seleccionados considerando los usos populares de la plantas, corroboraron a nivel preclínico las propiedades antiespasmódicas, antibacterianas e hipoglucemiantes de *Poliomntha longiflora* y *Lippia graveolens*.

c) El análisis químico de los distintos preparados de ambas plantas aunados a los ensayos farmacológicos permitieron corroborar que la composición y los principios activos son similares, y que los mismos poseen propiedades antiespasmódicas, antibacterianas e hipoglucemiantes. Todo ello justifica el uso de *P. longiflora* como un sustituto de *L. graveolens*.

d) Las evaluaciones del potencial antidiabético de los oréganos mexicanos, indican que ambas especies, así como, los productos **1**, **6** y **7** son agentes hipoglucémicos efectivos, sin embargo, carecen de propiedades antihiperoglucémicas. Por otro lado, los compuestos **2** y **3** con propiedades antihiperoglucémicas comprobadas no inciden de manera importante en la eficacia de las especies para el tratamiento de la diabetes, posiblemente por la existencia en las plantas de otras sustancias que antagonicen sus efectos, como **6** y **7**. Los resultados globales permiten sugerir que el uso de las infusiones de estas plantas no es recomendable para el tratamiento de la diabetes, hasta que se realicen ensayos más concluyentes en otras especies animales.

e) El análisis de los aceites esenciales de los oréganos mexicanos por CG-EM permitió establecer en todos los casos, a partir de los perfiles cromatográficos obtenidos,

un elevado porcentaje de los monoterpenoides oxigenados, **1** en *P. longiflora* y **6** en *L. graveolens*, característica que permite además diferenciar químicamente ambas especies. Además, estos principios activos y el *p*-cimeno (**7**) fueron seleccionados como entidades químicas para el desarrollo y la validación de un método analítico por CLAE de utilidad para el control de calidad de ambas plantas.

f) El análisis de los componentes volátiles mediante la técnica de microextracción sólida en fase gaseosa (HS-SPME), permitió la identificación en *P. longiflora*, del alfa-terpineno, el limoneno, el *p*-cimeno, el eucaliptol, el gamma-terpineno y el éter metílico de carvacrol como los componentes volátiles más abundantes, en tanto que en *L. graveolens* se identificaron al alfa-pineno, al *p*-cimeno, al eucaliptol y al beta-cariofileno como los principales componentes.

g) Finalmente, el presente trabajo doctoral constituye una aportación original al conocimiento químico y la eficacia preclínica de la especie *P. longiflora*, sustituto actual del orégano común, escasamente estudiada a la fecha. Los resultados generados permitirán integrar las monografías de ambas plantas cumpliendo así con el objetivo primordial del presente proyecto de tesis.

## 7. Perspectivas

a) Continuar con los estudios químicos sobre la especie cultivada de *P. longiflora* para establecer las diferencias en el contenido metabólico con respecto a la época de recolecta y las variaciones de tipo geográficas y ontogénicas.

b) Profundizar en los estudios sobre el posible modo de acción hiperglucémico de los extractos, esencias y compuestos puros de los oréganos mexicanos.

c) Caracterizar a los principios tóxicos del extracto orgánico almacenado.

d) Realizar la descripción microscópica de la especie mediante la realización de cortes histológicos de las partes aéreas de la planta con la finalidad de establecer las pruebas de identidad botánica necesarias para la elaboración de la monografía tipo OMS de los oréganos mexicanos.

e) Desarrollar y validar un método analítico por CLAE para cuantificar a las flavonas mayoritarias presentes en las infusiones de ambas plantas.

## 8. Referencias bibliográficas

- Alanís Flores, G., Alanís Fuentes, I., Calderón Vargas, E. Los oréganos de Nuevo León, México. *Planta*, **2008**, *6*, 16–17.
- Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, *99*, 325–348.
- Angeles-López, G., Pérez-Vásquez, A., Hernández-Luis, F., Déciga-Campos, M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, *131*, 425–432.
- Aguilar, I., Bye, R., Hersch, P. Raíz del manso. *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. ex Hemsl. (Asteraceae). Sentido Giratorio. México, **2010**.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., Rahman, M.M. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *Journal of Natural Products*, **2008**, *71*, 1427–1430.
- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E.N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., Lugo-Cervantes, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, **2010**, *50*, 585–590.
- Aranda, J., Silva, R., Franco, D. Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomntha longiflora* Gray) de la localidad infiernillo en el municipio de Higuera, N.L., México. *Revista Salud Pública y Nutrición*, **2009**, *10*, 1–8.
- Argueta, A., Cano, A., Rodarte, M.E. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. INI. México, **1994**, p 1786.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils. *Phytotherapy Research*, **2010**, *24*, 673–679.
- Astudillo, A., Hong, E., Bye, R., Navarrete, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytotherapy Research*, **2004**, *18*, 102–106.
- Aydin, S., Oztürk, Y., Beis, R., Hüsnu, K. Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity. *Phytotherapy research*, **1996**, *10*, 342–344.
- Barceló, A., Aedo, C., Rojapathak, S., Robles, S. The cost of diabetes mellitus tipo 2 in Latin America and the Caribbean. WHO, **2003**, *81*, 193.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, *46*, 446–475.
- Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A., Zupancic, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, *75*, 125–132.
- Baser, K.H.C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, **2008**, *14*, 3106–3119.
- Betz, J., Lyon, R., NguyenPho, A., Sander, L., Sharpless, K., Wise, S., Ziobro, G. Development of standard reference materials for the analysis of dietary supplements. *HerbalGram*, **2004**, *63*, 44–47.
- Bone, K. Standardized extracts: Neither poison nor panacea. *HerbalGram*, **2001**, *53*, 50–55.
- Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S., Brito, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2007**, *40*, 349–356.
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González, M., Mata, R. (*Z*)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*, **2011**, *74*, 314–320.

- Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology*, **2004**, *94*, 223–253.
- Cáceres, A., Álvarez, A.V., Ovando, A.E., Samayoa, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases I. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, **1991**, *31*, 193–208.
- Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramírez, O., Figueroa, L., Taracena, A.M., Samayoa, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders III. Confirmation of activity against enterobacterias of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **1993**, *38*, 31–38.
- Castillo, E. y Martínez, I. Manual de Fitoterapia. Elsevier Masson, España, **2007**, pp 116–125.
- Chakraborty, A.K. y Majumder, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1988**, *152*, 605–611.
- Chen, C.Y., Peng, W.H., Wu, L.C., Wu, C.C., Hsu, S.L. Luteolin ameliorates experimental lung fibrosis both in vivo and in vitro: implications for therapy of lung fibrosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, *58*, 11653–11661.
- Cho, S.O., Ban, J.Y., Kim, J.Y., Ju, H.S., Lee, I.S., Song, K.S., Bae, K., Seong, Y.H. Anti-ischemic activities of *Aralia cordata* and its active component, oleanolic acid. *Archives of Pharmacal Research*, **2009**, *32*, 923–932.
- Chowdhury, A.R., Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal*, **2002**, *366*, 653–661.
- Compadre, C.M., Robbins, E.F., Kinghorn, D. Volatile constituents of *Montana tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Medica*, **1982**, *53*, 495–496.
- Cristians, S., Guerrero-Analco, J.A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R. Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products*, **2009**, *72*, 408–413.
- Déciga-Campos, M., Rivero, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda, G., Angeles, G., Navarrete, A., Mata, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007a**, *110*, 334–342.
- Déciga-Campos, M., Palacios-Espinosa, F., Reyes-Ramírez, A., Mata, R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007b**, *114*, 161–168.
- Dimitrijevic, S., Mihajlovski, K., Antonovic, D., Milanovic-Stevanovic, M., Mijin, D. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chemistry*, **2007**, *104*, 774–782.
- Domínguez, X.A., Sánchez, H., Sánchez, M., Baldas, J.H., González, M.R. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica*, **1989**, *31*, 181–192.
- Dorman, H.J.D. y Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, **2000**, *88*, 308–316.
- Dos Santos, F.J.B., Lopes, J.A.D., Cito, A.M.G.L., De Oliveira, E.H., De Lima, S.G., Reis, F.D.A.M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*, **2004**, *16*, 504–506.
- Dudai, N. Optimization and improvement of phenolic monoterpenes production in oregano (*Origanum* spp). *Acta Horticulturae*, **2008**, *778*, 15–27.
- Engel, L. y Straus, S. Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. *Nature Reviews*, **2002**, *1*, 229–237.
- Ettre, L. y Kalasz, H. The story of Thin Layer Chromatography. *LCGC North America*, **2001**, *19*, 712–721.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). SSA, México, **2007**.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). SSA, México, **2001**.

- Figueroa, M., Rivero, I., Rivero, B., Bye, R., Navarrete, A., Mata, R. Constituents, biological activities and quality control parameters of the crude extract and essential oil from *Arracacia toluensis* var. multifida. *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, *113*, 125–131.
- Firth, R.G., Bell, P.M., Marsh, H.M., Hansen, I., Rizza, R.A. Postprandial hyperglycemia in patients with noinsulin-dependent Diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, **1986**, *77*, 1525–1532.
- Fisher, K. y Phillips, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, **2006**, *101*, 1232–1240.
- Flaster, T. y Lassiter, J. Quality control in herbal preparations: using botanical reference standards for proper identification. *HerbalGram*, **2004**, *63*, 32–37.
- Forestieri, A.M., Monforte, M.T., Ragusa, S., Trovato, A., Iauk, L. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. *Phytotherapy Research*, **1996**, *10*, 100–106.
- Ganong, W. Fisiología Médica. Decimoséptima edición. Manual Moderno, México, **2000**.
- Guimaraes, A., Oliveira, G., Melo, M., Cavalcanti, S., Antonioli, A., Bonjardim, L., Silva, F., Santos, J., Rocha, R., Moreira, J., Araujo, A., Gelain, D., Quintans-Junior, L. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, **2010**, *107*, 949–957.
- Henrickson, J. A new species of *Poliomintha* (Lamiaceae) from the Chihuahua desert region. *Sida*, **1982**, *9*, 290–292.
- Hernández, F. Historia natural de las plantas de la Nueva España. Obras completas tomos I y II. –1571–1576–. UNAM, México, **1959**.
- Hernández-Ávila, M. y Olaíz-Fernández, G. Diabetes and Mexico: a public health challenge. *Ciencia*, **2002**, *53*, 8–17.
- Huang, D., Ding, Y., Li, Y., Zhang, W., Fang, W., Chen, X. Anti-tumor activity of a 3-oxo-derivative of oleanolic acid. *Cancer Letters*, **2006**, *233*, 289–296.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2B *Validation of Analytical Procedures: Methodology*. Minister of Health, Canada, **1996**.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. ICH Q2R1 *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Minister of Health, European Union, Japan y USA, **2005**.
- Irving, R. A revision of the genus *Poliomintha*. *Sida*, **1972**, *5*, 8–22.
- Jiménez-Merino, F.A. Herbolaria Mexicana. Primera edición. Vacha. México, **2011**, p 346–347.
- Kalembe, D. y Kunicka, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, **2003**, *10*, 813–829.
- Kating, B.G. y Trevor, A.J. *Examination and Board Review. Pharmacology*, Appleton y Lange, 5<sup>th</sup> edition, Connecticut, USA, **1998**.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, **2001**, *53*, 597–652.
- Lecci, A., Santicioli, P. y Maggi, A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Current Opinion in Pharmacology*, **2002**, *2*, 630–641.
- Lecona-Urbe, S., Loarca-Piña, G., Arcila-Lozano, C., Cadwallader, K. Chemical characterization of *Lippia graveolensi* Kunth and comparison to *Origanum vulgare* and *Origanum laevigatum* “Herrenhaus”. *ACS Symposium Series*, **2007**, *946*, 45–55.
- Lee, J.J., Jin, Y.R., Lim, Y., Yu, J.Y., Kim, T.J., Yo, H.S., Shin, H.S., Yun, Y.P. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpenoid, induces rabbit platelet aggregation through a phospholipase C-calcium dependent signaling pathway. *Archives of Pharmacal Research*, **2007**, *30*, 210–214.
- Liang, Y-Z., Xie, P., Chan, K. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, **2004**, *812*, 53–70.



- Linares, E. y Bye, R.A. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, **1987**, *19*, 153–183.
- Liu, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, **1995**, *49*, 57–68.
- Liu, L.F. DNA topoisomerase poisons as anti tumor drugs. *Annual Review of Biochemistry*, **1989**, *58*, 351–375.
- Liu, D., Meng, Y., Juan, J. Recent advance in the study on derivatives of oleanolic acid and ursolic acid. *Chemistry Bulletin*, **2007**, *70*, 14–20.
- López-Lázaro, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, **2009**, *9*, 31–59.
- Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, **1983**, *54*, 275–287.
- Mahady, G.B. Global Harmonization of Herbal Health Claims. *The Journal of Nutrition*, **2001**, *131*, 1120S–1123S.
- Maron, D.M. y Ames, B.N. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, **1983**, *113*, 173–215.
- Martínez, M. Las plantas medicinales de México. Botas. México, **1989**.
- Morton, J.F. Atlas of medicinal plants of Middle America, vol. I. Ill.: Springfield. **1981**, p 745–750.
- Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, **1998**, *47*, 224–229.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poijak-Blazi, M., Borovic, S., Ivancic-Bace, I., Smrecki, V., Zarkovic, N., Brcic-Kostic, K., Vikić-Topic, D., Muller, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*, 3989–3996.
- Mata, R., Navarrete, A., Cristians, S., Hersch, P., Bye, R. Copalchi. *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC) Bullock (Rubiaceae). Sentido Giratorio. México, **2010**.
- Mueller, M., Lukas, B., Novak, J., Simoncini, T., Genazzani, A.R., Jungbauer, A. Oregano: a source for peroxisome proliferator-activated receptor G antagonists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, *56*, 11621–11630.
- Navarrete, A. y Mata, R. Cuachalalate. *Amphipterygium adstringens*. Sentido Giratorio. México, **2010**.
- Navarro, J. Fray. Historia Natural o Jardín Botánico. Primera edición. UNAM, IMSS, ISSSTE, México, **1992**, p. 146.
- Noriega, J.M. Historia de Drogas. México, **1902**.
- Nueva Farmacopea Mexicana. Sociedad Farmacéutica de México. Tercera edición. México, **1896**.
- Oh, C.J., Kil, I.S., Park, C.I., Yang, C.H., Park, J.W. Ursolic acid regulates high glucose-induced apoptosis. *Free Radical Research*, **2007**, *41*, 638–644.
- Ong, K.W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., Tan, B.K.H. Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, *133*, 598–607.
- Palacios-Espinosa, F., Déciga-Campos, M., Mata, R. Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, *118*, 448–454.
- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, **2001**, *76*, 201–214.
- Pauli, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Medicinal Research Reviews*, **2006**, *26*, 223–268.
- Prieto, J.M., Iacopini, P., Cioni, P., Chericoni, S. *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chemistry*, **2007**, *104*, 889–895.
- Rao, M.R., Palada, M.C., Becker, B.N. Medicinal and aromatic plants in agroforestry systems. *Agroforestry Systems*, **2004**, *61*, 107–122.

- Rastrelli, L., Caceres, A., Morales, C., De Simone, F., Aquino, R. Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry*, **1998**, *49*, 1829–1832.
- Reif, K., Sievers, H. y Steffen, J. The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials. A European perspective. *HerbalGram*, **2004**, *63*, 38–43.
- Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Ramos-Gómez, M., Rodríguez-Muñoz, M.E., Reynoso-Camacho, R., Rocha-Uribe, A., Roque-Rosales, M.R. Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Schauer) essential oil and mothers liquors. *Food Chemistry*, **2007**, *102*, 330–335.
- Saeedi, M. y Morteza-Semnani, K. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Origanum vulgare* L. *International Journal of Biology and Biotechnology*, **2007**, *4*, 259–265.
- Samuelsson, G. Assays for pharmacological activity: non-specific assays. En: Dey PM, Harborne, J.B., y Hostettman, K. editors. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA., **1991**, p. 261.
- Sarac, N., Ugur, A., Duru, M.E., Varol, O. Antimicrobial activity, antioxidant activity and chemical composition of *Origanum onites* L. and *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) ietswaart from Mugla (Turkey). *Acta Horticulturae*, **2009**, *826*, 397–404.
- Shen, Z.X. Recent research and developments in traditional Chinese medicine in China. En: Report of the Third Meeting of Directors of WHO Collaborating Centres for Traditional Medicine. WHO, Geneva, Switzerland, **1996**, 7–13.
- Shihari, T., Selvam, J.P., Aranganathan, S., Ramakrishna, D.S., Nalini, N. Escalation of circulatory antioxidants by oregano (*Origanum vulgare* L.) during 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Journal of Cell and Tissue Research*, **2008**, *8*, 1405–1410.
- Skopinski, P., Szafilik, J., Duda-Krol, B., Nartowska, J., Sommer, E., Chorostowska-Wynimko, J., Demkow, U. y Skopinska-Rozewdka, E. Suppression of angiogenic activity of sera from diabetic patients with non-proliferative retinopathy by compounds of herbal origin and sulindac sulfone. *International Journal of Molecular Medicine*. **2004**, *14*, 707–711.
- Srinivasan, K. y Ramarao, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian Journal of Medical Research*, **2007**, *125*, 451–472.
- Tan-No, K., Nijima, F., Nakagawasai, O., Sato, T., Satoh, S., Tadano, T. Development of tolerance to the inhibitory effect of loperamide on gastrointestinal transit in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2003**, *20*, 357–363.
- Ulku, N., Baykan, S., Ozturk, B., Apaydin, S., Tuglular, I. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja thymbra* L. essential oil. *Pharmaceutical Biology*, **2006**, *44*, 585–591.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **2002**, *68*, 1561–1568.
- United States Pharmacopeia (USP). USP–NF 32, USA, **2008**.
- Van Den Broucke, C.O. y Lemli, J.A. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 1. *Planta Medica*, **1980**, *38*, 317–321.
- Van Den Broucke, C.O., y Lemli, J.A. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 2. *Planta Medica*, **1982**, *45*, 188–190.
- Van Del Dool, H. y Kratz, P.D. A generalization of the index system including linear temperatura programmed partition chromatography. *Journal of Chromatography*, **1963**, *11*, 463–471.
- Van Zyl, R.L., Seatlholo, S.T., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *Journal of Essential Oil Research*, **2006**, *18*, 129–133.
- Waizel, S. y Waizel, J. Algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, **2009**, *54*, 145–171.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. CRC Press, Boca Ratón, FL., **2008**.

- Wang, T., Shao, J.W., Guo, Y.H. Research in progress of the mechanisms underlying the antitumor activity of ursolic acid. *Pharmaceutical Biotechnology*, **2008**, *15*, 148–151.
- Wang, X., Ye, X.L., Liu, R., Chen, H.L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.D., Wang, Z., Li, W.L., Hai, C.X. Antioxidant activities of oleanolic acid *in vitro*: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chemico Biological Interactions*, **2010**, *184*, 328–337.
- Webb, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, **2003**, *27*, 201–206.
- Wha, T. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. En *Bioactive Natural Products*, **1993**, 441–457.
- Williamson, M.E., Ukpako, T.D., Evans, J.F. Pharmacological methods in phytotherapy research. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. New York, USA; John Wiley and Sons; **1996**.
- Wogiatzi, E., Gougoulas, N., Papachatzis, A., Vagelas, I., Chouliaras, N. Chemical composition and antimicrobial effects of greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, **2009**, *23*, 1322–1324.
- World Health Organization. WHO *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*. Regional Office for the Western Pacific, Manila, **1993**.
- World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. World Health Organization, Geneva, **1999**.
- World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization, Geneva, **2000a**.
- World Health Organization. Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial. World Health Organization, Geneva, **2000b**.
- World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 2. World Health Organization, Geneva, **2003**.
- World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 3. World Health Organization, Geneva, **2007**.
- World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 4. World Health Organization, Geneva, **2009**.
- World Health Organization. WHO Monographs on medicinal plants commonly used in the newly independent states (NIS). World Health Organization, Geneva, **2010**.
- World Health Organization. The world medicines situation 2011. Traditional Medicines: global situation, issues and challenges. World Health Organization, Geneva, **2011**.
- Ximénez, F. Cuatro Libros de la Naturaleza. Oficina tipográfica de la secretaría de Fomento. México, **1888**, p. 176.
- Zhang, W., Hong, D., Zhou, Y., Zhang, Y., Shen, Q., Li, J., Hu, L., Li, J. Ursolic acid and its derivative inhibit protein tyrosine phosphatase 1B, enhancing insulin receptor phosphorylation and stimulating glucose uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, *10*, 1505–1512.
- Zheng, W. y Wang, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, *49*, 5165–5170.

# **Anexos**

## Participación en congresos

Nombre de la reunión: 7<sup>th</sup> Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF

Nombre del Trabajo: Chemical composition of the essential oils of three Mexican oreganos species

Fecha: Agosto de 2008

Lugar: Atenas, Grecia

Nombre de la reunión: 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy

Nombre del Trabajo: Simultaneous determination of carvacrol, thymol and *p*-cymene in Mexican oreganos by HPLC

Fecha: Junio de 2009

Lugar: Honolulu, Hawaii

Nombre de la reunión: 9<sup>th</sup> Annual Oxford Conference on the Science of Botanicals (ICSB)

Nombre del Trabajo: Comparative analysis of the essential oils of two Mexican oreganos

Fecha: Abril de 2010

Lugar: Oxford, Mississippi

Nombre de la reunión: 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy

Nombre del Trabajo: Chemical analysis and pharmacological activities of the essential oils of the Mexican oreganos *Lippia graveolens* and *Poliomintha longiflora*

Fecha: Julio de 2010

Lugar: Tampa, Florida

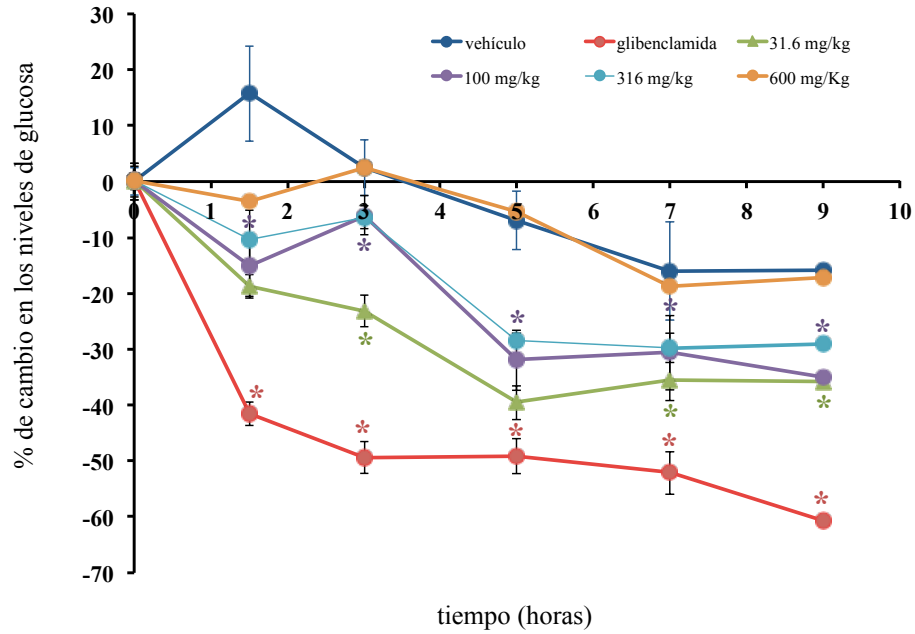
Nombre de la reunión: 52<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy

Nombre del Trabajo: Chemical composition and hypoglycemic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* infusions

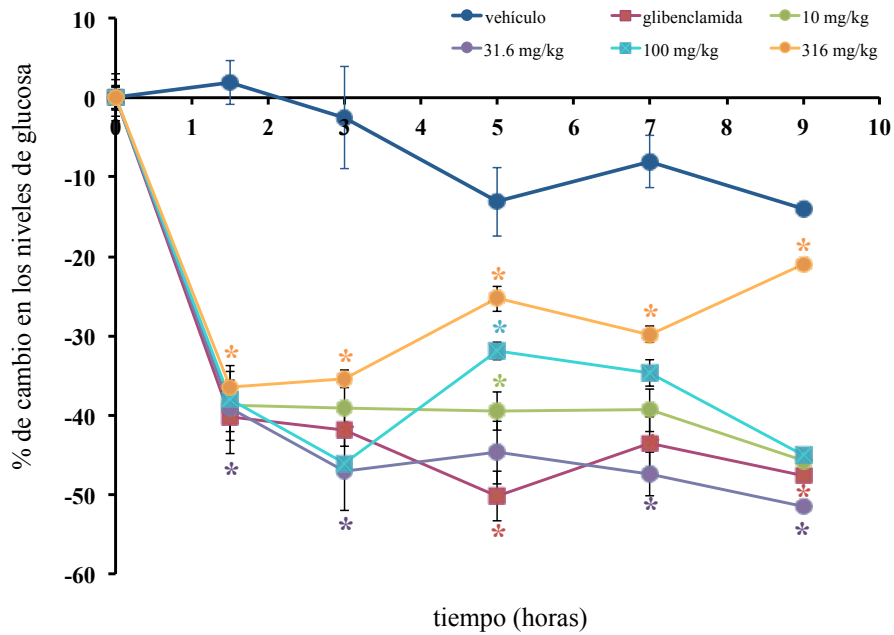
Fecha: Julio de 2011

Lugar: San Diego, California

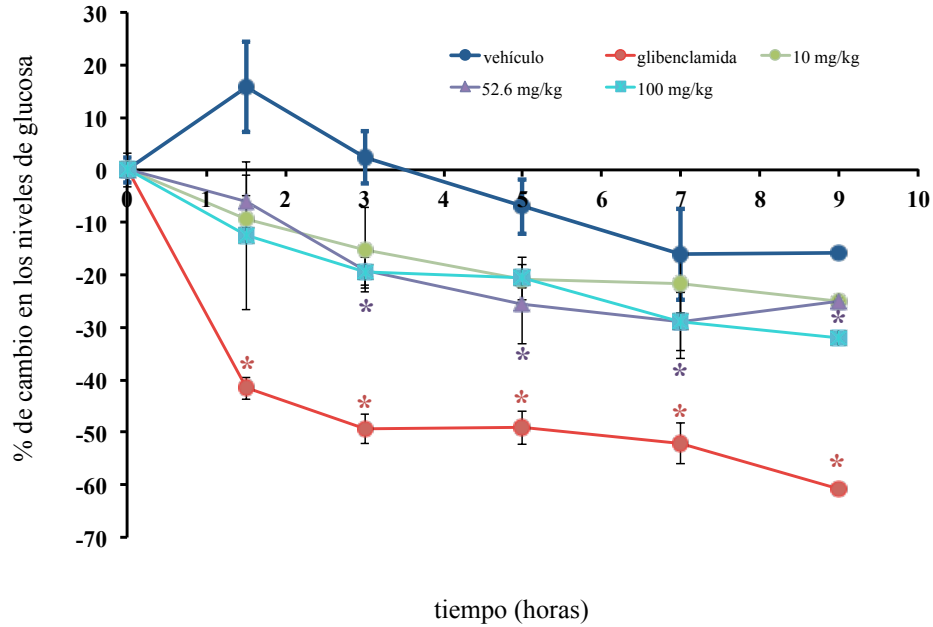
## Gráficas del curso temporal de la evaluación del efecto antidiabético



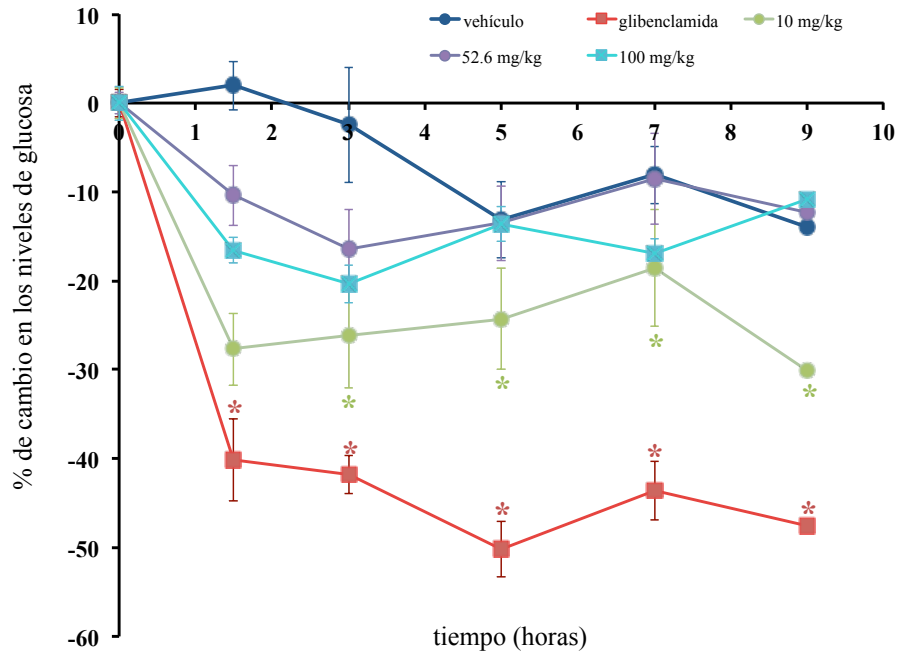
Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



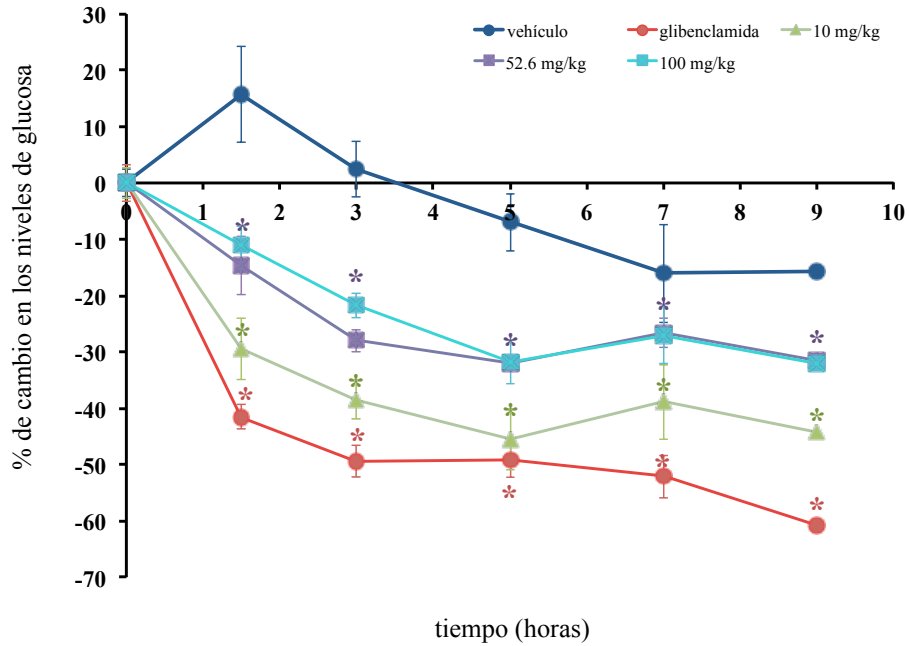
Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



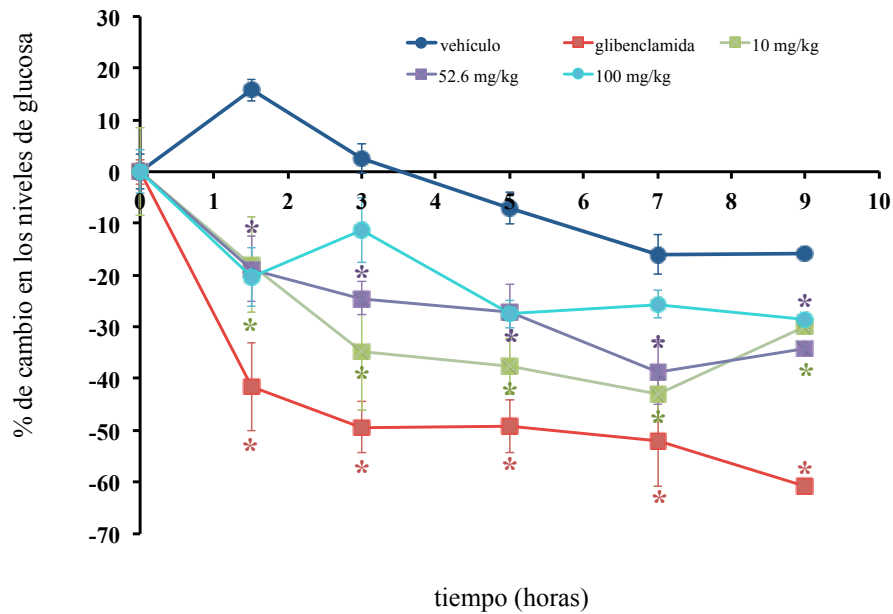
Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVIA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVIA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

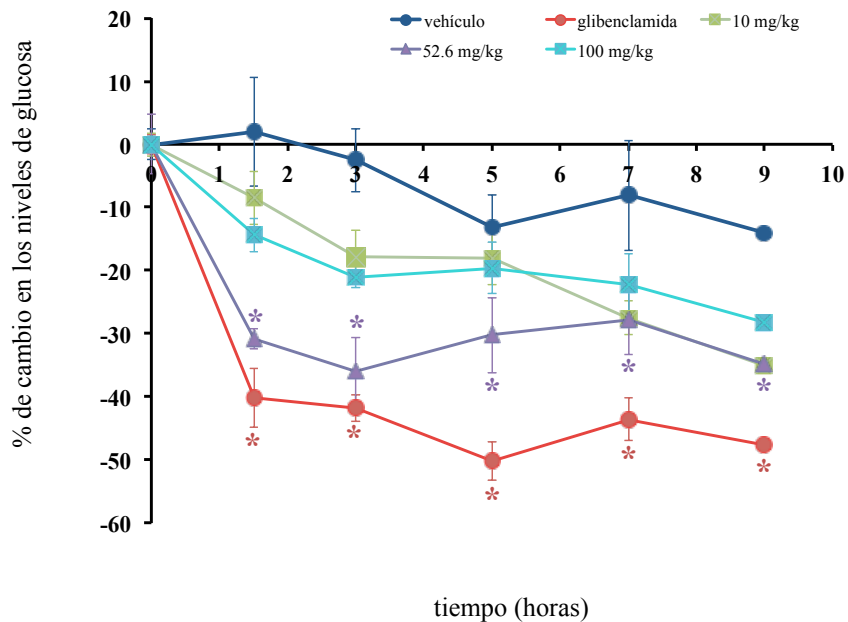


Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

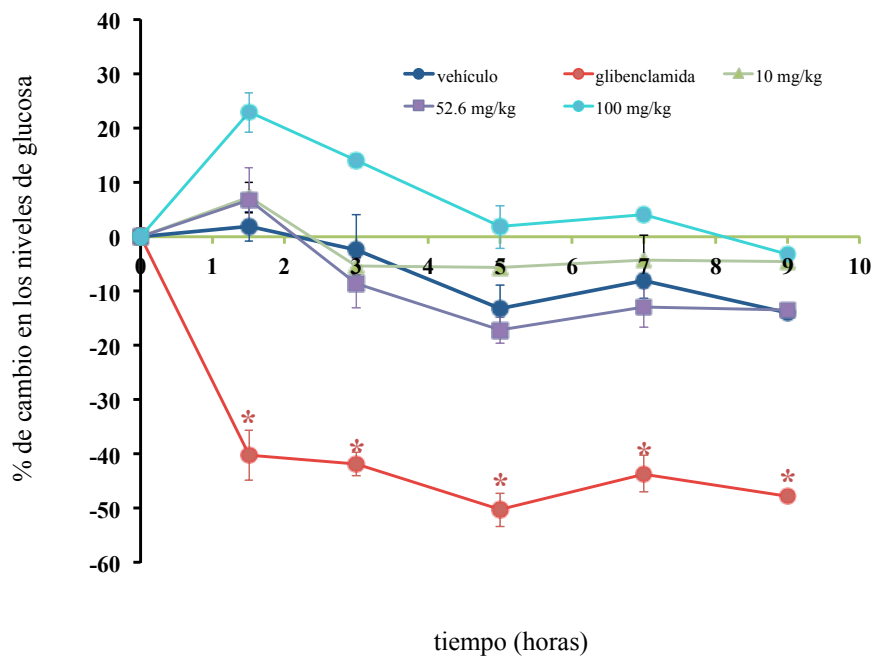


Efecto agudo de la infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

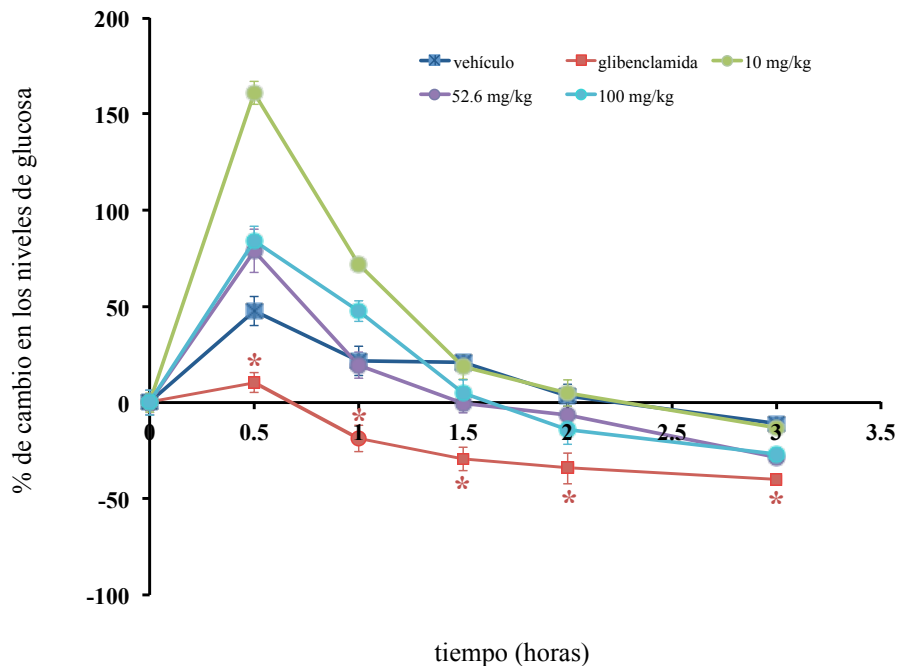




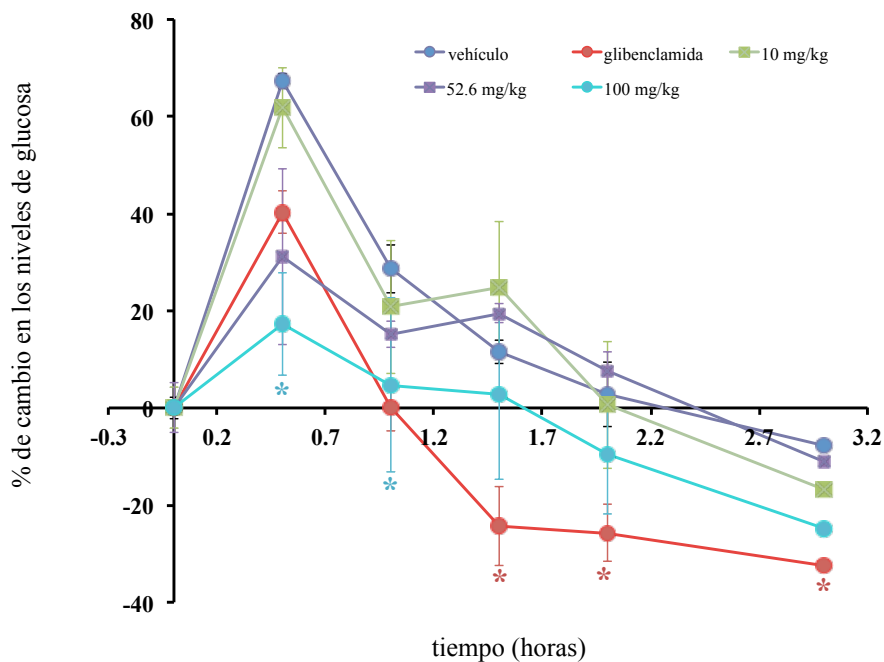
Efecto agudo del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



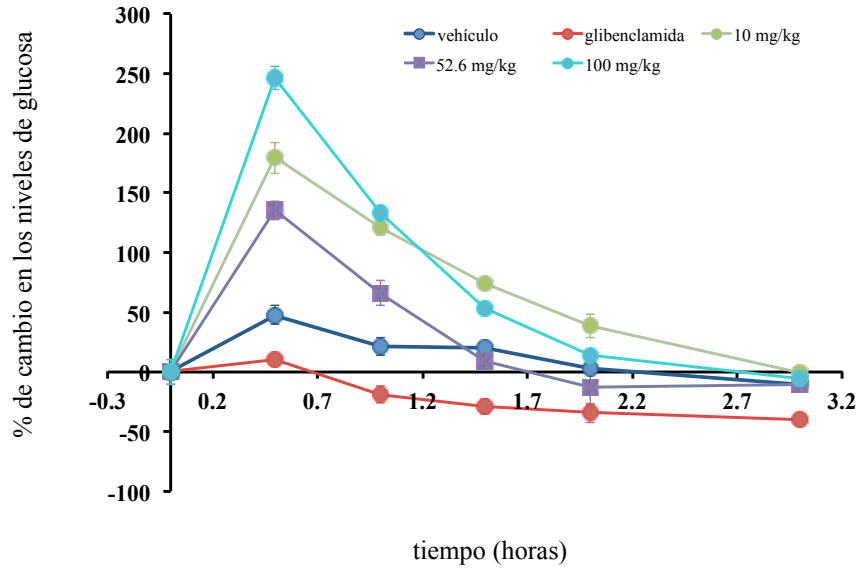
Efecto agudo de la infusión de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



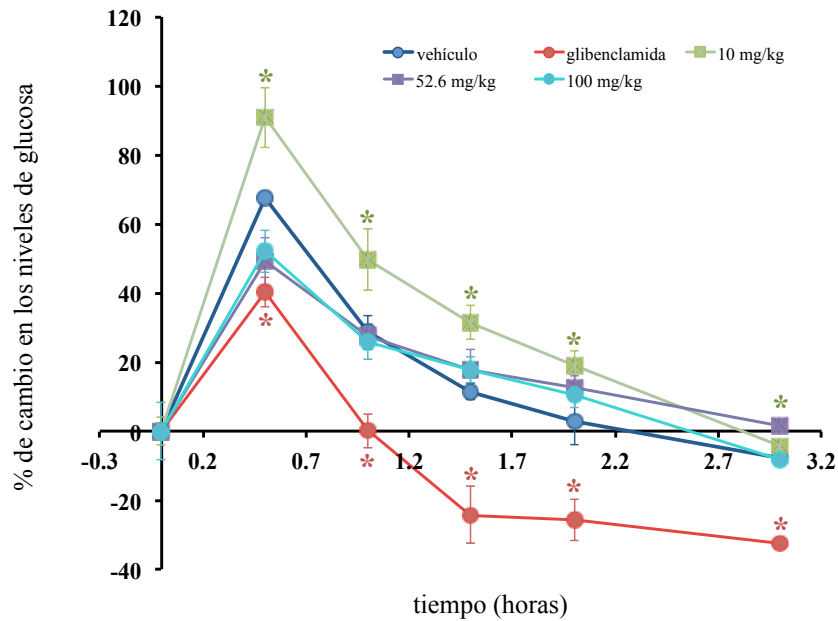
Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



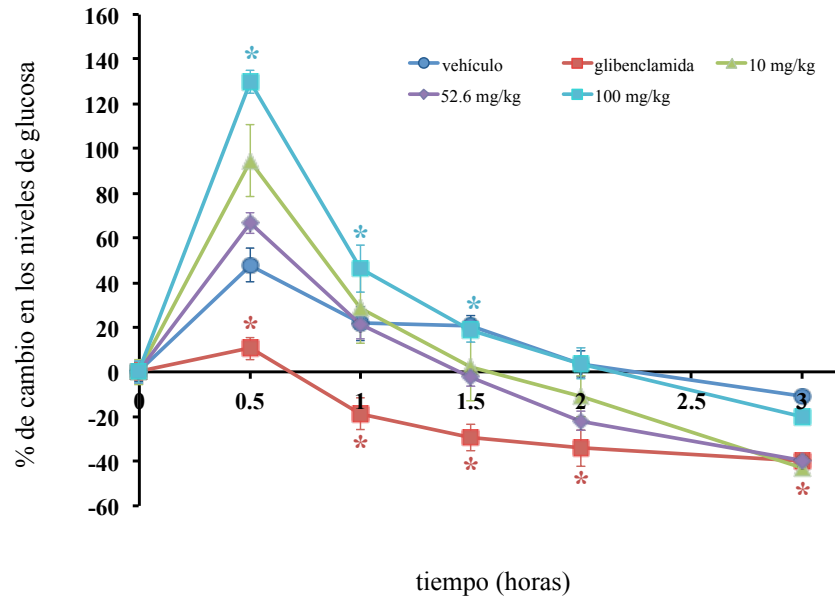
Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



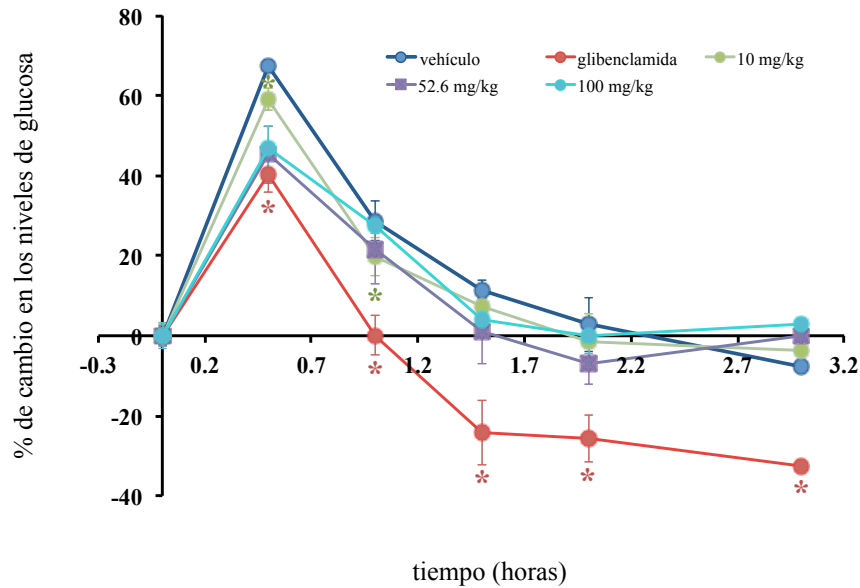
Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



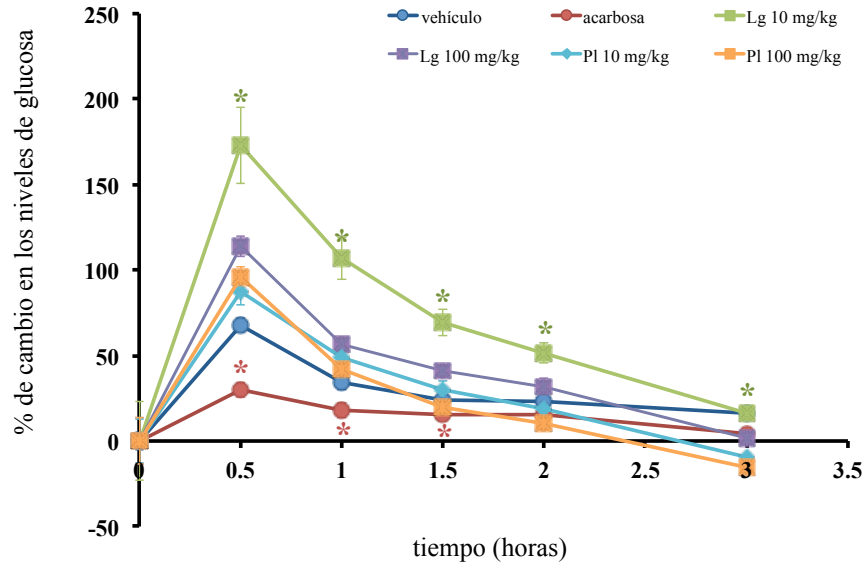
Efecto de la infusión de las partes aéreas de *P. longiflora* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba *t* de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



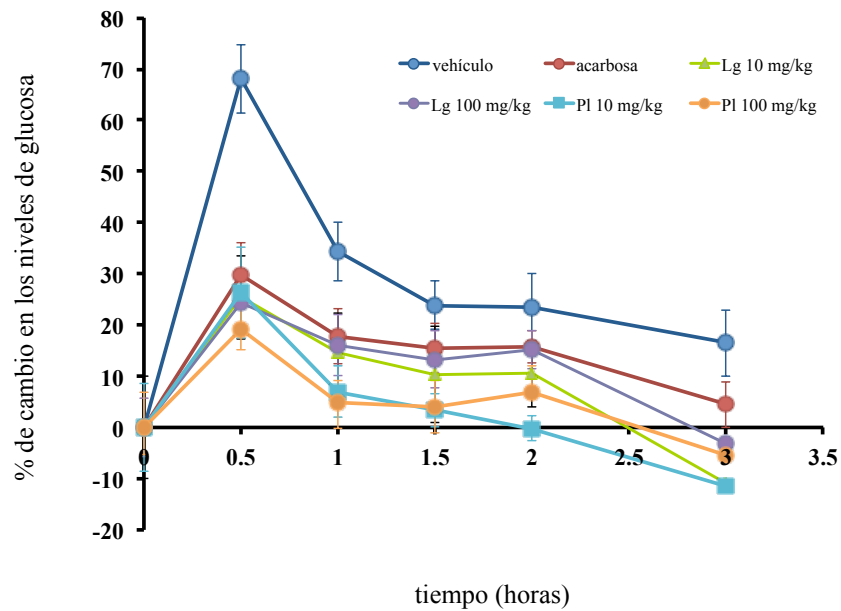
Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



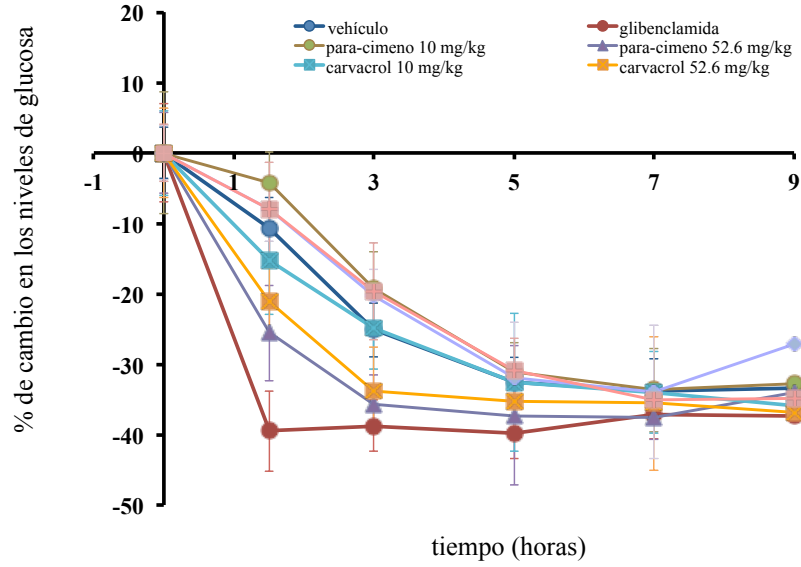
Efecto del extracto orgánico de las partes aéreas de *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la glucosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



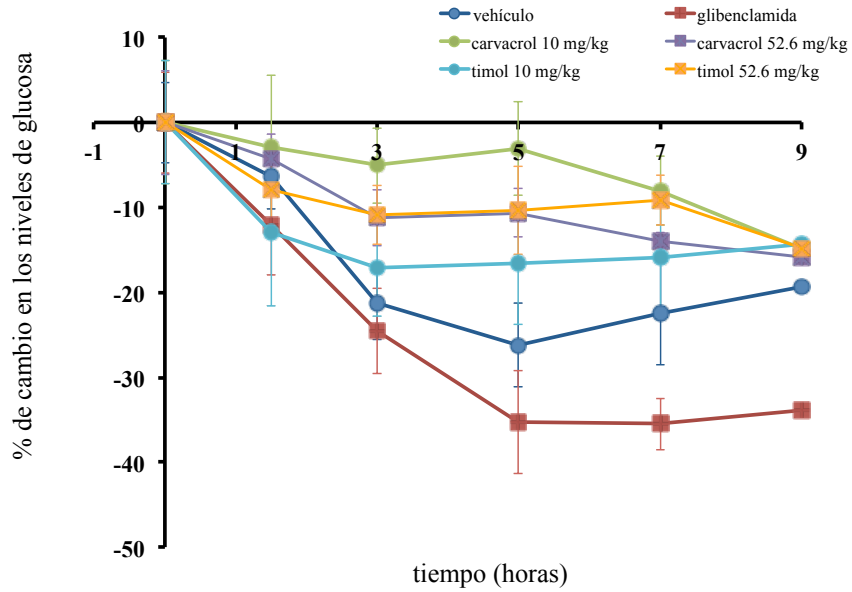
Efecto de las infusiones de las partes aéreas de *P. longiflora* y *Lippia graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



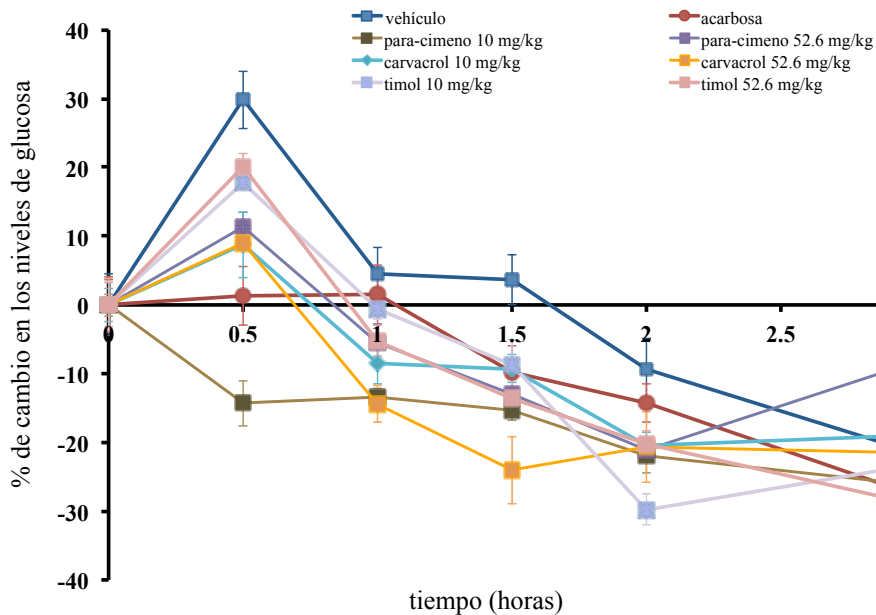
Efecto de las infusiones de las partes aéreas de *P. longiflora* y *L. graveolens* en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVVA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



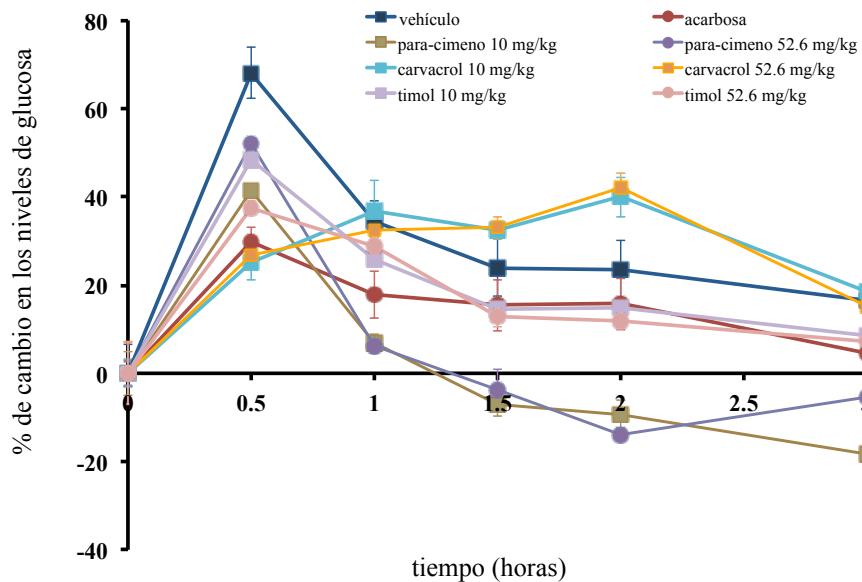
Efecto agudo de los marcadores en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVIA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



Efecto agudo de los marcadores en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVIA seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



Efecto de los marcadores en los niveles de glucosa sanguínea en ratones normoglucémicos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.



Efecto de los marcadores en los niveles de glucosa sanguínea en ratones NAD-STZ-diabéticos utilizando el modelo de tolerancia a la sacarosa oral. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.E.M ( $n = 8$ ). La diferencia estadísticamente significativa ( $*p < 0.05$ ) se determinó mediante un ANADEVa seguido de una prueba  $t$  de Dunnet comparando cada valor con el grupo control (vehículo) a ese mismo tiempo.

# Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils

Isabel Rivero-Cruz, Georgina Duarte, Andrés Navarrete, Robert Bye, Edelmira Linares, and Rachel Mata

**Abstract:** In the present study, we reported a comparative analysis of the chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained from 2 Mexican oreganos, *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens*. The gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) profiles of the oils showed high amounts of oxygenated monoterpenes, mainly carvacrol (% [mg/100 g dry matter]) (18.36 [459.0] in *P. longiflora* and 13.48 [164.7] in *L. graveolens*). In addition, these oils contained marked quantities of *p*-cymene (14.09 [352.2] and 7.46 [37.3], respectively),  $\beta$ -caryophyllene oxide,  $\beta$ -caryophyllene, and carvacrol acetate. Headspace analyses of the leaves of both species using different coated fibers revealed that  $\gamma$ -terpinene, eucalyptol, and *p*-cymene were the principal light volatile components. Chromatographic fingerprints and a suitable analytical method for quantifying the main components of both essences were established using high-performance liquid chromatography (HPLC) as analytical tool. The essential oils of both species were not toxic in the acute toxicity studies in mice performed according to the Lorke procedure ( $DL_{50} > 5000$  mg/kg). The oils and the major constituents, carvacrol and *p*-cymene, displayed a moderate *in vitro* antibacterial activity, with minimum inhibitory concentration values ranging from 128 to 512  $\mu$ g/mL. In addition, these samples demonstrated a marginal antispasmodic activity *in vivo* and provoked a concentration-dependent inhibition of the carbachol- and histamine-induced contractions using the isolated guinea-pig ileum preparation. In particular, *p*-cymene exerts good selective inhibitory activity on the carbachol-induced contractions ( $IC_{50} = 9.85$   $\mu$ g/mL).

**Keywords:** carvacrol, eucalyptol, *Lippia graveolens* Kunth, *p*-cymene, *Poliomintha longiflora* A. Gray, thymol

**Practical Application:** The analytical methods using GC-MS and HPLC techniques will be useful for establishing quality control as well as preclinical pharmacological and toxicological parameters of the crude drug *P. longiflora*, which is widely used as substitute of *L. graveolens* for medicinal and flavorings purposes. This overall information will be also useful for elaborating scientific and pharmacopoeic monographs of this very Mexican medicinal plant.

## Introduction

European oreganos, *Origanum vulgare*, *O. onites*, and *Coridohymus capitatus*, are considered the most important spices commercialized for culinary purposes in Mediterranean countries and elsewhere. These plants are also worldwide valued for their medicinal properties as antibacterial, antispasmodic, analgesic, antioxidant, sedative, antiparasitic, chemopreventive, and antidiabetic agents (Prieto and others 2007; Mueller and others 2008; Shihari and others 2008). Most of the chemical studies carried out on *O. vulgare* have been focused on the essential oil, which contains thymol, carvacrol,  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ -pinene, and *p*-cymene, as major components (Saedi and Morteza-Semnani 2007; Loizzo and others 2009; Musa and Chalchat 2009; Ozhan and others 2010). In Mexico, several species

regarded as oreganos make up a plant complex consisting of aromatic woody-based herbs or shrubs in various genera of the Lamiaceae (Calamintha, Hedeoma, Hyptis, Mesosphaerum, Monarda, Origanum, Plectranthus, and Poliomintha) and Verbenaceae (Lantana and Lippia) families, as well as a few species in the Asteraceae (Brickellia) and Fabaceae (Dalea) families. Two popular Mexican oreganos are *Lippia graveolens* Kunth (Syn: *L. berlandieri* Schauer) and *Poliomintha longiflora* A. Gray. The former is an erect shrub common in arid zones, from central Mexico to northern Central America, while the latter is a spindly shrub restricted to arid north-central Mexico. Records of the popularity of the culinary and medicinal uses of *P. longiflora* date back to the mid-19th century and continue to the present day. The culinary and medicinal uses of *L. graveolens* have been registered since the early 18th century (Calpouzos 1954; Morton 1981). The dried foliage and inflorescences of both species are used as a condiment for a variety of Mexican dishes and are exported around the world for flavoring pizzas and sausages. The most common medicinal applications of Mexican oreganos include the treatment of respiratory and digestive ailments (Argueta and others 1994). Thus, an infusion of the leaves and flowers of *L. graveolens* or *P. longiflora* is used as an expectorant and to alleviate asthma, bronchitis, and

MS 20101074 Submitted 9/22/2010, Accepted 11/9/2010. Authors Rivero-Cruz, Duarte, Navarrete, and Mata are with Facultad de Química, Univ. Nacional Autónoma de México, México DF, Coyoacán, 04360, México. Authors Bye and Linares are with Inst. de Biología, Univ. Nacional Autónoma de México, México DF, Coyoacán, 04360, México. Direct inquires to author Mata (E-mail: rachel@servidor.unam.mx).

\*\*Taken in part from the PhD thesis of I. Rivero-Cruz.



coughs; it is also drunk for treating diarrhea, indigestion, liver obstruction, stomachache, menstrual and muscle-skeletal disorders, general infections, and diabetes (Gregg 1848; Compadre and others 1982; Cáceres and others 1991, 1993; Forestieri and others 1996). Nowadays, *P. longiflora* is used as substitute of *L. graveolens* for medicinal and culinary purposes.

Some chemical studies carried out on *L. graveolens* extracts and essential oil resulted in the identification of several monoterpenes including thymol and carvacrol (Figure 1), sesquiterpenes, aromatics acids, and flavanones (Domínguez and others 1989; Zamora-Martínez and others 1992; De Vincenzi and others 1995; Yousif and others 2000; Senatore and Rigano 2001; Turgut and Silva 2005; Calvo-Irabien and others 2009). Furthermore, the anti-inflammatory and antibacterial properties of the plants have been extensively demonstrated. In contrast, the pharmacological and chemical properties of *P. longiflora* have received scarce attention. To the best of our knowledge, the only work published so far described the chromatographic identification of 2 flavonoids, luteolin and hispidulin, and a few aromatic acids including vanillic, caffeic, and rosmarinic acids. In the same study, the antioxidant activity of an aqueous extract of the plant was demonstrated (Zheng and Wang 2001). In this context, the present work was conducted in order to (1) determine the potential antispasmodic and antibacterial actions, chemical composition, and active principles of the essential oil of *P. longiflora*; and (2) to develop an analytical methods using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC) to identify and quantify, respectively, the most important components of the plant. Altogether, the results of these studies will be useful for establishing quality control and preclinical pharmacological parameters for the elaboration of the scientific and pharmacopoeic monographs of this very Mexican medicinal plant. For comparative purposes, *L. graveolens* was also investigated.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

All HPLC grade solvents were purchased from Honeywell Burdick & Jackson (Morristown, N.J., U.S.A.). Carvacrol,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, camphene,  $\alpha$ -myrcene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene,  $\alpha$ -terpineol, eucalyptol, *p*-isopropylbenzyl alcohol, 3,4-dimethoxystyrene, thymol, *p*-cymene,  $\beta$ -caryophyllene, germacrene D, eugenol, (*E*)- $\beta$ -damascone, (*E*)-jasmone, carbachol chloride, histamine dihydrochloride, *n*-alkane [C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>] standard, sodium bicarbonate, sodium chloride, calcium chloride, *D*-(+)-glucose, sodium dihydrogenphosphate, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and magnesium sul-

fate were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka Chemicals (St. Louis, Mo., U.S.A.).

### Plant materials

The aerial parts of *P. longiflora* were collected in Sierra de Real de Catorce, San Luis Potosi, Mexico on November 2005 (PL-batch 1) and November 2006 (PL-batch 2). Voucher specimens were deposited at the Natl. Herbarium (MEXU); Bye & Linares 33919 and 33925, respectively). A 3rd sample, PL-batch 3, was provided from a local producer in the State of Coahuila, Mexico on November 2007. One batch of *L. graveolens* (LG-batch 1) was purchased in La Bola Market, Mexico City, Mexico on August 2008, and the 2nd (LG-batch 2) was collected in Zapotitlan de Salinas, Puebla, Mexico in October 25, 2009; a voucher specimen (Cristian-98) was deposited in the Science School Herbarium (FCME), UNAM.

### Preparation of the essential oil

Essential oils from *P. longiflora* (PL-batches 1 and 3) or *L. graveolens* (LG-batches 1 and 2) were extracted from air-dried and ground leaves by steam distillation for 1.5 h using a modified Clevenger-type apparatus. The distillations were performed in triplicate. Samples were stored in amber bottles at  $-4^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### Gas chromatography (GC) and GC-MS

**Gas chromatography.** Essential oils were analyzed by GC-MS using an Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with a LECO time of flight mass spectrometer detector (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, Calif., U.S.A.) and DB-5 capillary column (10 m  $\times$  0.18 mm  $\times$  film thickness 0.18  $\mu\text{m}$ ). Oven temperature gradually rose from 40 to 260  $^{\circ}\text{C}$  at 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , held for 20 min, and finally raised to 340  $^{\circ}\text{C}$  at 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  for 20 min isothermally. Injector temperature was set at 300  $^{\circ}\text{C}$ . Helium was the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Diluted samples were injected (2  $\mu\text{L}$ ) in the split mode (ratio 1:20). Compounds were identified by co-injection of the sample with standard samples when available, and by comparing their spectral data with those from the NIST Mass Spectral Library (December 2005).

**Gas chromatography-mass spectrometry.** Essential oils were analyzed under the same conditions as above described by GC, using an Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with a LECO MS-TOF in the electron impact mode (70 eV). Injector and MS transfer line temperatures were set at 200 and 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectively.

The components were identified by calculating their linear retention indexes by co-injection of the sample with a solution containing the homologous series of *n*-alkanes C<sub>8</sub> to C<sub>24</sub> (Van Den Dool and Kratz 1963; Adams 2007) and by comparison of their mass spectra with those of standard library data (NIST) of the GC-MS system and literature data (Adams 2007). The GC-MS analysis results are shown in Table 1. All determinations were performed in triplicate.

**Headspace volatile compounds analysis.** Volatile compounds of *P. longiflora* (PL-batch 1) and *L. graveolens* (LG-batch 2) were separated and identified using solid-phase microextraction (SPME) system (Yousif and others 2000; Rubiolo and others 2006). One centimeter long poly(dimethylsiloxane)-coated fibers (Table 2 and 3; 100  $\mu\text{m}$ ; Supelco Technology, St. Louis, Mo., U.S.A.) were used for this analysis. The fibers were conditioned in a GC injection port at 250  $^{\circ}\text{C}$  for 2 h, prior to use. The extraction procedure was conducted as follows: the sample phases containing 500 mg of dried material, 75 mg of NaCl, and 5 mL

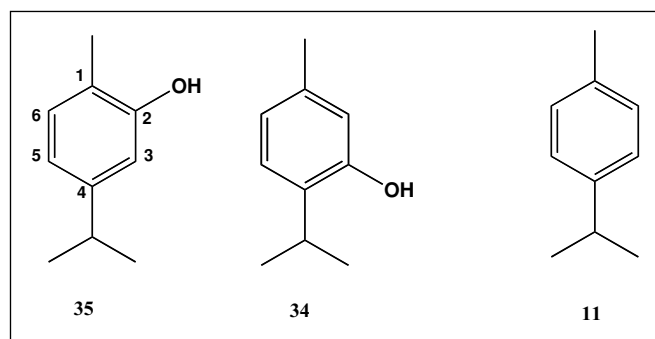


Figure 1—Structures of the major constituents of Mexican oreganos essential oils: *p*-cymene (11), thymol (34), and carvacrol (35).

of distilled water were placed on suitable vials; then, the needles of the SPME device were pierced through the septum of the vials to the headspace during 10 min at room temperature. Once the equilibrium was reached, the fibers were withdrawn into the needle and transferred to the injection port of the GC. The needle of the SPME device penetrated the septum of the GC inlet and the fibers exposed for subsequent chromatographic analysis using an Agilent 6890N series gas chromatograph equipped with a

LECO MS-TOF instrument (Agilent Technology). The analyses were performed by triplicate.

**HPLC with photodiode array detection.** HPLC analyses were conducted on a Waters 2487 HPLC instrument consisting of a quaternary pump with a degasser, manual injector, UV/Vis dual detector, and Empower 2 software (Waters, Milford, Mass., U.S.A.). All analyses were carried out on a reversed-phase Synergi Hydro-RP (250 × 4.60 mm I.D.; Phenomenex Inc., Torrance, Calif., U.S.A.) column. An isocratic elution (flow rate

**Table 1—Volatile compounds identified by GC-MS analyses from *P. longiflora* and *L. graveolens* essential oils.**

Nr*	Compound	RI <sup>a</sup>		Percent of each component				Method of identification <sup>b</sup>
		PL	LG	PL (batch 1)	PL (batch 3)	LG (batch 1)	LG (batch 2)	
				Hydrocarbons				
1	Tricyclene	915			0.03			MS, RI
2	$\alpha$ -thujene	920	920	0.16	1.97	0.25	0.13	MS, RI
3	$\alpha$ -pinene	926	926	0.06	1.39	0.29	0.85	MS, RI
4	Camphene	941	941	0.22	1.50	0.13	0.38	MS, RI
5	Sabinene	965	965		0.27	1.83	0.10	MS, RI
6	$\beta$ -pinene	969	969	0.10	0.60	0.51	0.30	MS, RI
7	$\alpha$ -myrcene	985	985	0.32	4.79	1.20	1.07	MS, RI
8	$\alpha$ -phellandrene	1003	1003	0.08	0.51	0.06	1.73	MS, RI
9	$\alpha$ -terpinene	1012	1012	0.74	2.06	3.89	4.52	MS, RI
10	<i>m</i> -cymene	1022	1022	1.40	4.61	0.96	1.13	MS, RI
11	<i>p</i> -cymene	1023	1023	15.12	14.09	7.46	5.70	MS, RI, std
12	cyclohexene, 4-ethenyl-1,4-dimethyl	1028			0.59			MS, RI
13	$\beta$ -phellandrene	1034			1.57			MS, RI
14	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocymene	1045			4.80		1.82	MS, RI
15	$\gamma$ -terpinene	1057	1057	2.57	6.31	3.89	0.78	MS, RI
16	<i>D</i> -elemene	1372		0.08				MS, RI
17	Bicicloelemene	1378			0.06			MS, RI
18	$\beta$ -caryophyllene	1415	1415	4.57	3.34	6.29	6.05	MS, RI, std
19	( <i>E</i> )- $\beta$ -farnesene	1441	1441		1.25	1.39		MS, RI
20	Opposita-4,15-(11)-diene	1424			0.07			MS, RI, std
21	Germacrene D	1470	1470	0.16	0.14	0.96	0.10	MS, RI, std
22	Germacrene A	1508		0.22	0.01			MS, RI
23	( <i>Z</i> )- $\gamma$ -bisabolene	1513		0.59	0.12			MS, RI
24	$\alpha$ -ionene	1518		0.02				MS, RI
25	$\alpha$ -cadinene	1534					0.16	MS, RI
26	$\alpha$ -calacorene	1537		0.04				MS, RI
				Alcohols				
27	Eucalyptol	1027	1027	0.24		16.84	10.17	MS, RI
28	( <i>Z</i> )-sabinene hydrate	1068			0.52	0.40	0.33	MS, RI
29	( <i>E</i> )-piperitol	1179			0.18		0.19	MS, RI
30	$\alpha$ -fenchol	1100			1.57			MS, RI
31	$\alpha$ -terpineol		1178			7.62	1.84	MS, RI
32	Thymol methyl ether	1229	1229	0.08		2.44	1.34	MS, RI, std
33	1-acetoxy-4-ethylbenzene	1238	1238	7.06	0.60			MS, RI
34	Thymol		1278			13.73		MS, RI, std
35	Carvacrol	1310	1310	10.20	18.36	13.48	12.55	MS, RI, std
36	<i>p</i> -isopropylbenzyl alcohol	1345			4.88			MS, RI
37	3,4-dimethoxystyrene	1351		0.24	0.03			MS, RI
38	Eugenol	1372	1372	0.14		0.93		MS, RI, std
39	6-methyl-3,4-xyleneol	1379		12.81				MS, RI
40	Carvacrol acetate	1378	1378	12.81	1.41	0.69		MS, RI, std
41	$\beta$ -caryophyllene oxide	1578	1578	11.97	5.53	7.06		MS, RI, std
42	Spathulenol		1600			1.11	0.41	MS, RI
43	$\alpha$ -alasken-8-ol	1603		0.68	0.63			MS, RI
44	humulene oxide		1626				0.73	MS, RI
45	$\alpha$ -cadinol		1643				1.40	MS, RI
				Ketones				
46	$\gamma$ -octanolide	1196	1196		0.35	5.69		MS, RI
47	Piperitenone	1355		5.41				MS, RI
48	3,3,6-trimethyl-1,5-heptadien-2-one	1356			6.17			MS, RI
49	( <i>E</i> )-jasmone	1396			4.52			MS, RI
50	( <i>E</i> )- $\beta$ -damascone	1399		0.32				MS, RI
51	10-methyldecalin-2,7-dione	1530		0.08				MS, RI
				Aldehydes				
52	Cyclohexenal 4-(1-methylethenyl)	1322		11.27	4.88			MS, RI
	Total identified			99.9	99.9	99.2	99.0	

\*The peak number corresponds to the number in Figure 2. <sup>a</sup>LRI of the compounds determined on a DB-5 column. <sup>b</sup>MS = mass spectrum; LRI = linear retention index; std = external injection of the reference compound in GC-MS.

of 1.0 mL/min) was used with the mobile phase consisted by MeCN (A) and water (B) (55:45) in 60 min. The injection volume was 20  $\mu$ L in all cases, the detection was at 265 nm, and the column was kept at room temperature throughout the analyses. Under the conditions described, the retention times ( $R_T$ ) of thymol, carvacrol, and *p*-cymene were found to be 14.43, 16.07, and 46.41 min, respectively.

All tested solutions were prepared by adding 1 mL of MeCN to 0.2 mg of the essential oil of *P. longiflora* (PL-batches 1 and 3) or *L. graveolens* (LG-batch 1). Samples were filtered through Teflon filters (0.45 mm) prior to injection of an appropriate aliquot (20  $\mu$ L). The stock standard solution for the calibration curves of carvacrol, thymol, and *p*-cymene were prepared by stepwise dilution of the stock solution with MeCN at 5 concentration levels within the range of 0.5 to 5.0, 0.5 to 5.0, and 5.0 to 50.0 mg/mL, respectively. Three analyses were performed for each concentration. The linearity of the system, the least square line, and the correlation coefficient were calculated from calibration curves using the software Origin 8.0 (Origin Labs, Mass., U.S.A.) from peak areas versus compound concentrations (ICH 2005). Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for thymol, carvacrol, and *p*-cymene were determined at signal-to-noise (S/N) ratios of 3 and 10, respectively.

The linearity of the method was tested by recovery, assaying independently 3 amounts equivalent to 50 (ca. 0.01 mg), 100 (ca. 0.05 mg) or 150% (ca. 0.1 mg) for thymol and carvacrol, and 50 (ca. 0.1 mg), 100 (ca. 0.5 mg) or 150% (ca. 1.0 mg) for *p*-cymene. At each level thymol, carvacrol, and *p*-cymene were added simultaneously to the essential oil of *L. graveolens*. Each sample was injected twice and analyzed according to the method previously described. The repeatability and the interday intermediate preci-

sion of 6 identical samples were analyzed according to the above-described method on 2 different days and by 2 different analysts by triplicate. The standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated for each day. Finally, method accuracy was established by analyzing different concentrations of the 3 samples (0.01, 0.05, and 0.1 mg of both carvacrol and thymol) or (0.1, 0.5, and 1.0 mg of *p*-cymene) by triplicate. All compounds were added simultaneously to the essential oil and analyzed according to the method previously described. The mean percentage recovery for carvacrol, thymol, and *p*-cymene were found to be between 98 and 102% by means of Fisher's *F*-test (ICH 2005).

### Antibacterial activity determination

*Bacillus subtilis* [ATCC6633], *Staphylococcus aureus* [ATCC25923], *Escherichia coli* [ATCC10536], *Salmonella typhi* [ATCC9992], and *Pseudomonas aeruginosa* [ATCC27853] were used for microbial susceptibility tests. Microorganisms were cultured on nutrient agar before determination of minimum inhibitory concentration (MIC) (lowest concentration at which no growth was observed) values. Mueller–Hinton broth (MBH; Difco, Detroit, Mich., U.S.A.) containing 59.5 and 66.0 mg/L of CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>, respectively, was used for bacterial growth. Overnight cultures of each strain were made up in 0.9% saline solution to give a final inoculum density of  $5 \times 10^{-5}$  CFU/mL by comparison with a 0.5 MacFarland turbidity standard. Ampicilline (reference antibiotic) or test samples (essential oils from PL-batch 1 and LG-batch 1, thymol, carvacrol, and *p*-cymene) were dissolved in 125  $\mu$ L DMSO and then diluted in 875  $\mu$ L MHB to give a starting concentration of 200  $\mu$ g/mL and 1024  $\mu$ g/mL, respectively. Using 96-well microtiter plates, 125  $\mu$ L of MHB was dispensed into wells 1 to 11; then, 125  $\mu$ L of the test sample or antibiotic was dispensed into well 1 and serially diluted across the plate, leaving well 11 empty for the growth control. The final volume was dispensed into well 12 which being free of MHB or inoculums served as the sterile control. Finally, the bacterial inoculums (125  $\mu$ L) were added to wells 1 to 11, and the plate was incubated at 37 °C for 18 h. A DMSO control was also

**Table 2—Headspace volatile compounds identified from *P. longiflora* leaves by head space-HS-SPME using CAR/PDMS and PDMS-coated fibers.**

Peak nr*	Compound	RI <sup>a</sup>	Area (%) <sup>b</sup>	
			CAR/PDMS	PDMS
1	$\alpha$ -thujene	920		0.3
2	$\alpha$ -pinene	926		
3	Camphene	941		
4	$\alpha$ -sabinene	965		0.2
5	$\beta$ -pinene	969		
6	$\alpha$ -myrcene	985	3.0	
7	$\alpha$ -phellandrene	1003	1.9	2.3
8	D-2-carene	1000		0.4
9	$\alpha$ -terpinene	1012	2.3	0.4
10	<i>p</i> -cymene	1023	58.4	66.5
11	Limonene	1025		7.3
12	Eucalyptol	1027	4.5	
13	$\gamma$ -terpinene	1057		5.9
14	( <i>Z</i> )-sabinene hydrate	1068		2.6
15	<i>p</i> -cymenene	1075		1.1
16	Terpinen-4-ol	1164		0.5
17	$\alpha$ -terpineol	1176		0.3
18	Carvacrol methyl ether	1226		6.6
19	1-acetoxy-4-ethylbenzene	1238	1.10	
20	Bornyl acetate	1270		0.4
21	Carvacrol	1310	14.5	6.2
22	Carvacrol acetate	1378	0.4	
23	$\beta$ -caryophyllene	1415	0.5	0.2
24	Aromadendrene	1443		0.2
25	Germacrene D	1470		0.5
26	Germacrene A	1508		0.5

\*The peak number corresponds to the number in Figure 3. <sup>a</sup>LRI of the compounds determined on a DB-5 column. <sup>b</sup>The percentages were calculated from the GC-flame ionization detector (FID) chromatograms.

**Table 3—Headspace volatile compounds identified from *L. graveolens* leaves by head space-HS-SPME using CAR/DVB/PDMS and PDMS-coated fibers.**

Peak nr*	Compound	RI <sup>a</sup>	Area (%) <sup>b</sup>	
			CAR/DVB/PDMS	PDMS
1	$\alpha$ -pinene	926	4.8	18.7
2	$\beta$ -pinene	969	3.3	
3	$\alpha$ -myrcene	985		1.9
4	$\alpha$ -phellandrene	1003		2.3
5	<i>p</i> -cymene	1023	4.5	15.1
6	Eucalyptol	1027	2.6	17.0
7	$\gamma$ -terpinene	1057	1.1	14.2
8	( <i>Z</i> )-sabinene hydrate	1068	4.8	2.8
9	Camphor	1123	1.7	2.0
10	Terpinen-4-ol	1164	2.8	2.3
11	Carvacrol methyl ether	1226	5.2	2.6
12	Carvacrol	1310	1.0	
13	Carvacrol acetate	1378		0.7
14	$\beta$ -caryophyllene	1415	14.5	16.2
15	Aromadendrene	1443	7.2	0.2
16	Germacrene D	1470	5.1	0.3
17	Germacrene A	1508		0.3
18	Longipinene oxide	1565		0.2

\*The peak number corresponds to the number in Figure 4. <sup>a</sup>LRI of the compounds determined on a DB-5 column. <sup>b</sup>The percentages were calculated from the GC-flame ionization detector (FID) chromatograms.

included. All MIC's values were determined by triplicate. The MIC was determined as the lowest concentration at which no growth was observed. A methanol solution of MTT (5 mg/mL) was used to detect bacterial growth by a color change from yellow to blue (Appendino and others 2008).

### Pharmacological studies

All animal experiments were handled according to the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international guidelines on care and use of laboratory animals. Furthermore, clearance for conducting the studies was taken from the Ethics Committee for the Use of Animals in Pharmacological and Toxicological Testing, Facultad de Química, UNAM, which in turn is coordinated by UNAM Central Committee of Ethics for Animal Care and Handling. The sample size ( $n$ ) of 8 animals for each test group was justified on the basis of preliminary experiments. Imprinting control region (ICR) male mice (*Mus domesticus*; Harlan Laboratories, Mexico City, Mexico) weighing between 20 and 25 g were used in the experiment. All groups were fed a standard rodent diet *ad libitum* with free access to water.

**Acute toxicity studies in mice.** The essential oils (PL-batch 1 and LG-batch 1) were suspended in vehicle (Tween 80, 0.2% in saline solution). Mice were treated in 2 phases: In the 1st one, intragastric doses of 10, 100, and 1000 mg/kg of samples were administered. In the 2nd, mice were treated with doses of 1600, 2900, and 5000 mg/kg (Lorke 1983). In both phases, mice were observed daily (14 d) for mortality, toxic effects, and/or changes in behavioral pattern. At the end of the experiments, the animals were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber and the internal organs inspected for any damage.

**Gastrointestinal motility test.** The effect of the samples on the intestinal motility in mice was evaluated using the procedure of Tan-No and coworkers (Tan-No and others 2003). Samples (essential oils from PL-batch 1 and LG-batch 1) or pure compounds (carvacrol and *p*-cymene, 1 to 316 mg/kg) were suspended in 0.5% Tween 80 and orally administered. Loperamide (8 mg/kg, p.o.) was given to animals in the reference group while control animals received 0.5% Tween 80 at 0.1 mL/10 g. Fifteen minutes after drug administration, the animals were orally treated with 0.3 mL of charcoal meal (10% charcoal in a 5% gum acacia suspension). After 20 min, all animals were sacrificed by cervical dislocation and the entire length of the small intestine, from the pylorus to the caecum, was removed carefully. The distance travelled by the charcoal plug in the intestine (*PGT1*) and the total length of the intestine (*PGT2*) was measured for each mouse. Percentage of charcoal advance in the intestine was calculated using the following formula:

$$(PGT1 - PGT2/PGT1) \times 100,$$

where *PGT1* is the percent of gastrointestinal transit in the saline- or vehicle-treated group and *PGT2* is the percent of gastrointestinal transit in the sample-treated group (Tan-No and others 2003). Results are showed as the mean  $\pm$  SD of 8 separate experiments.

**Isolated guinea-pig ileum test.** The *in vitro* spasmolytic activity was performed according to a procedure previously described (Figuroa and others 2007). Briefly, 100  $\mu$ L of the samples at final concentrations of 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, and 1000  $\mu$ g/mL, dissolved in 20% DMSO in water were incubated at 37 °C with the guinea pig ileum preparations. All responses were recorded during 10 min. The antispasmodic activity of the

samples (essential oils from PL-batch 1 and LG-batch 1, carvacrol, and *p*-cymene) was assessed by their ability to prevent the contractions induced by a submaximal concentration of carbachol ( $1 \times 10^{-4}$  M) and histamine ( $1 \times 10^{-3}$  M). Ipratropium bromide and diphenhydramine hydrochloride were used as positive controls. The concentration causing 50% of inhibition (IC<sub>50</sub>) was obtained from each concentration-response curve (Figuroa and others 2007). Results are showed as the mean  $\pm$  SD of 8 separate experiments.

### Statistical analysis

Origin 8.0 software was used for statistical analysis of all data. All observations were expressed as mean  $\pm$  SEM. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Data analysis was performed by one-way analysis of variance followed by Duncan's test.

## Results and Discussion

### Chemical composition

To determine the chemical composition of the essential oils of Mexican oreganos, conventional GC-MS analyses were performed. The results are presented in Table 1 and Figure 2. The yields of the essential oils obtained from *P. longiflora* and *L.*

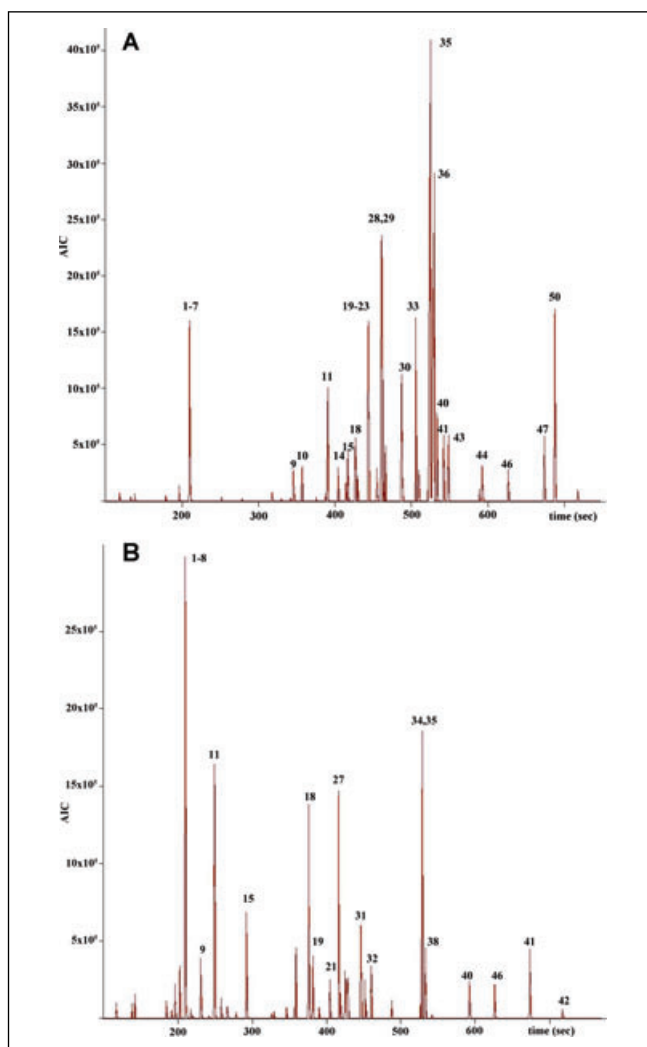


Figure 2—Typical GC chromatogram of the essential oil from (A) *P. longiflora* and (B) *L. graveolens* dried leaves.



*graveolens* were  $1.67 \pm 0.06$  and  $0.33 \pm 0.004$  (w/w, dry matter), respectively. Thirty-one, 36, 25, and 24 chemical constituents, representing 99.9, 99.9, 99.2, and 99.0% of the total content, were identified in *P. longiflora* (batches 1 and 3) and *L. graveolens* (batches 1 and 2), respectively. These analyses revealed that the most important feature of the oils was the presence of a high percentage of oxygenated monoterpenes, mainly carvacrol (10 to 18 [459.0 mg/100 g, dry matter], in *P. longiflora* and 13.48 [164.7 mg/100 g, dry matter] in *L. graveolens*) (Figure 2). In addition, both oils contained significant amounts of  $\beta$ -caryophyllene oxide (7% to 11%) along with several monoterpene hydrocarbons such as *m*-cymene (1% to 4%), *p*-cymene (5% to 15%), and  $\beta$ -caryophyllene (3% to 6%). The most important differences observed between *L. graveolens* and *P. longiflora* essential oils composition were the following: *L. graveolens* has higher quantities of eucalyptol (approximately 13%), thymol methyl ether (approximately 2.0%), and thymol (approximately 12.5%) while *P. longiflora* possesses only carvacrol ranging between 10 and 18% as major component. On the other hand, *P. longiflora* contains considerable amounts of 6-methyl-3,4-xyleneol (12%), carvacrol acetate (1% to 12%), and cyclohexenal 4-(1-methylethenyl) (4% to 11%) (Table 1), which were absent in the essential oil from *L. graveolens*. These differences will be useful to differentiate both Mexican oregano species, although further analyses of *P. longiflora* are required in order to rule out ontogenic, seasonal, and geographical variations (Russo and others 1998; Lecona-Urbe and others 2007).

Next, headspace analyses (Table 2 and 3; Figure 3 and 4) of *P. longiflora* and *L. graveolens* using carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), carboxen/divinylbenzene/polydimethylsiloxane (CAR/DVB/PDMS), and PDMS-coated fibers were carried out as complementary for determining the principal light volatile components of these species. The best results were obtained with the nonpolar PDMS-coated fiber. In the case of *P. longiflora*,  $\alpha$ -terpinene, limonene, *p*-cymene, eucalyptol,  $\gamma$ -terpinene,

carvacrol methyl ether, and carvacrol were identified as the principal components. On the other hand, *L. graveolens* contained  $\alpha$ -pinene, *p*-cymene, eucalyptol, and  $\beta$ -caryophyllene as the major light volatiles. It is important to point out that the classical analysis by GC-MS of a hydrodistilled essential oil cannot be directly compared with a headspace study because the basic principles of the 2 approaches are completely different (Rubiolo and others 2006). In the present investigation, the results indicated that the main volatiles as detected by both techniques were uniform, although they did not provide quantitative correlations. Therefore, headspace analysis can be used as an alternative to the classical GC-MS analysis of the essential oil to rapidly characterize the main volatile components of both oreganos. On the whole, the results revealed that the essential oils of *L. graveolens* and *P. longiflora* showed similar chemical composition and that the major components of *P. longiflora* oil are almost the same to those previously reported for several *Origanum*-related species, which also possessed carvacrol as the major component (Lecona-Urbe and others 2007; Saeedi and Morteza-Semnani 2007).

To our knowledge, this is the first report on the chemical composition of *P. longiflora* essential oil while the composition of *L. graveolens* volatiles was previously described using both the headspace technique (Yousif and others 2000) and conventional GC-MS analyses (Senatore and Rigano 2001; Vernin and others 2001; Turgut and Silva 2005; Calvo-Irabien and others 2009). In the study by Yousif and others (2000), the *Lippia* analyzed was purchased from a local wholesale market in Surrey, B.C, but it was originally produced in and imported from the United States; the sample contained 24 volatiles being the major components  $\beta$ -myrcene,  $\alpha$ -terpinene,  $\gamma$ -terpinene, *p*-cymene, and thymol with little amount of carvacrol; the proportion of the last 2 compounds was approximately 10:1. In contrast, the conventional GC analysis of 4 samples of *L. graveolens*, 1 from El Salvador (Vernin and others 2001), 1 Guatemala (Senatore and Rigano 2001), and 2 from Mexico (Turgut and Silva 2005; Calvo-Irabien and others 2009),

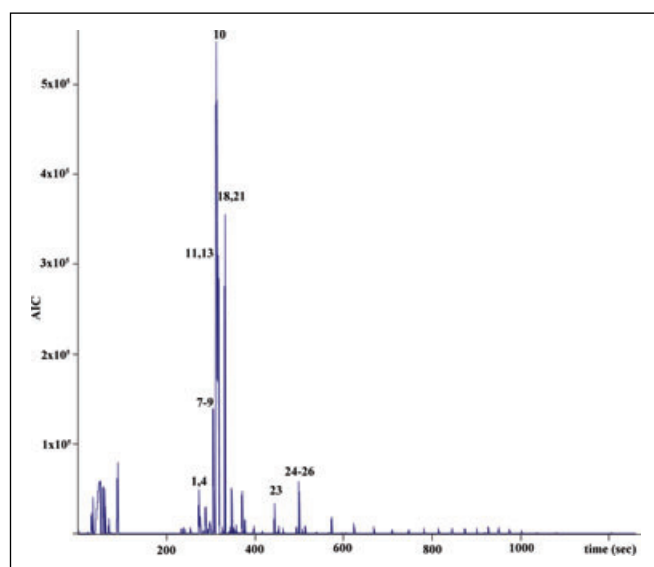


Figure 3—Typical GC chromatogram of the light volatile components from *P. longiflora* leaves extracted and collected by headspace procedure. Peaks:  $\alpha$ -thujene (1);  $\alpha$ -sabinene (4);  $\alpha$ -phellandrene (7); D-2-carene (8);  $\alpha$ -terpinene (9); *p*-cymene (10); limonene (11);  $\gamma$ -terpinene (13); (*Z*)-sabinene hydrate (14); *p*-cymenene (15); terpinen-4-ol (16);  $\alpha$ -terpineol (17); carvacrol methyl ether (18); bornyl acetate (20); carvacrol (21);  $\beta$ -caryophyllene (23); aromadendrene (24); germacrene D (25); germacrene A (26).

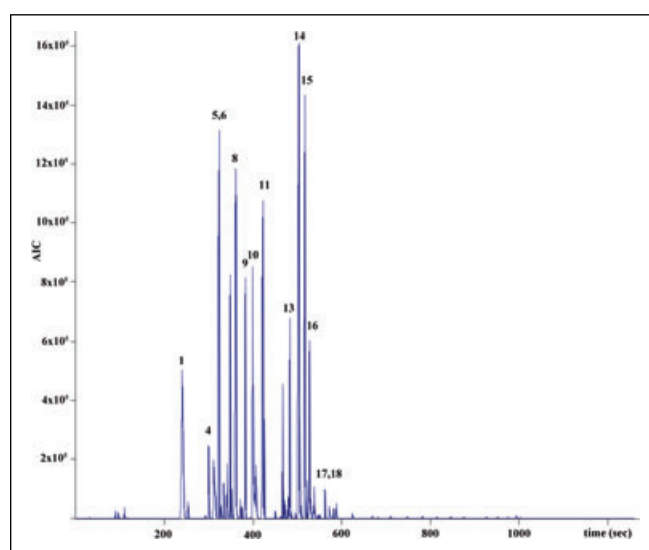


Figure 4—Typical GC chromatogram of the light volatile components from *L. graveolens* leaves extracted and collected by headspace procedure. Peaks:  $\alpha$ -pinene (1);  $\alpha$ -myrcene (3);  $\alpha$ -phellandrene (4); *p*-cymene (5); eucalyptol (6);  $\gamma$ -terpinene (7); (*Z*)-sabinene hydrate (8); camphor (9); terpinen-4-ol (10); carvacrol methyl ether (11); carvacrol acetate (13);  $\beta$ -caryophyllene (14); aromadendrene (15); germacrene D (16); germacrene A (17); longipinene oxide (18).

showed higher content of carvacrol and lower amounts of thymol. The diverse geographical origin of the samples analyzed as well as seasonal variation could explain the differences with respect to the samples of *L. graveolens* analyzed in the present investigation.

### Quantitative analysis of the essential oils

A suitable HPLC method was developed to quantify simultaneously the 3 major components of the oils of Mexican oreganos. The optimal HPLC separation conditions were achieved with a reversed-phase Synergi Hydro-RP column and a mixture of MeCN-water (55:45) (Figure 5). For *P. longiflora*, the peaks corresponding to carvacrol and *p*-cymene possess an area of 91.1% and 2.7%, respectively, of the total peak area quantified. In the case of *L. graveolens*, thymol, carvacrol, and *p*-cymene have an area of 36.4, 19.0, and 15.3%, respectively. Since these chromatographic profiles were not equivalent, HPLC fingerprints of the essential

oils of *P. longiflora* and *L. graveolens* could be also a criterion to distinguish between both species.

Next, the HPLC method was fully validated according to Intl. Conference on Harmonization (ICH) guidelines (ICH 2005). The linearity of the system was tested in the concentration range between 0.5 to 5.0 mg/mL for both thymol and carvacrol, and 5.0 to 50.0 mg/mL for *p*-cymene, and was found to be linear ( $r^2 = 0.998, 0.999, \text{ and } 0.999$ , respectively) in the concentration range used. The CV was less than 0.35% at each concentration level analyzed. LOD values were 1.24, 1.15, and 3.85  $\mu\text{g/mL}$  for carvacrol, thymol, and *p*-cymene, respectively, whereas the LOQ values were 3.45, 2.78, and 11.09  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The linearity of the method was tested by recovery assay. The linear regression equation for carvacrol, thymol, and *p*-cymene were found to be  $y = 3 \times 10^8x + 211437$ ,  $y = 4 \times 10^8x - 47331$ , and  $y = 1 \times 10^8x - 3 \times 10^6$ , respectively. The recovery ranges for the 3 standards were expressed as the concentration detected as a percentage of the

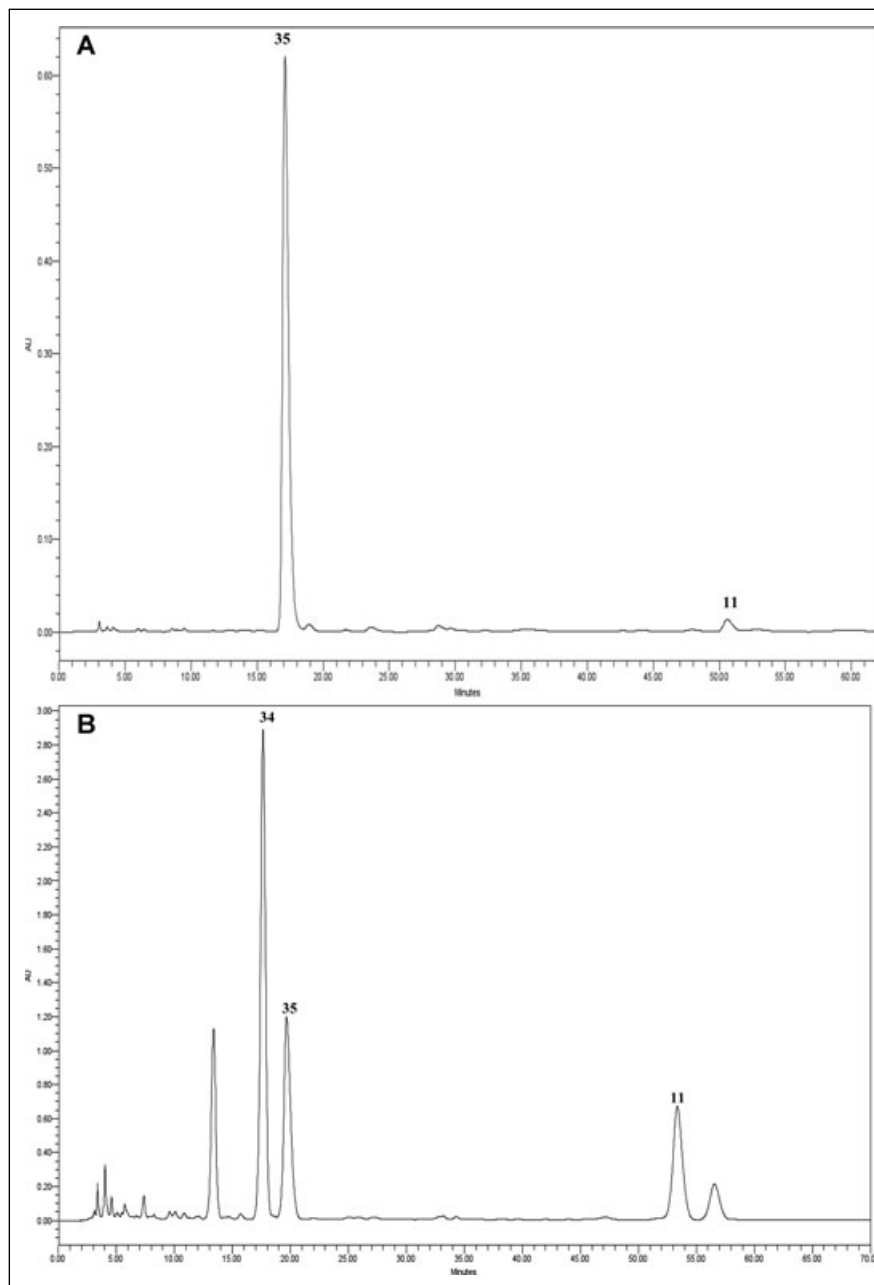


Figure 5—HPLC chromatogram of essential oil from (A) *P. longiflora* and (B) *L. graveolens* dried leaves.

expected concentration and were found to be 98.8 to 100.9, 100.5 to 102.0, and 100.2 to 100.9%, respectively (Table 4). The reproducibility and repeatability of the analytical method were evaluated in terms of the intermediate precision by analyzing 3 replicates of 6 samples of stock solution (2.5 mg/mL) in 2 different days. The relative SD (RSD;  $n = 6$ ) was calculated for each sample evaluated. The results indicated that their chromatographic pattern were similar showing in each case the presence of the major peaks. The CV values for accuracy were less than 2.0, 2.0, and 1.5% for carvacrol, thymol, and *p*-cymene, respectively. Subsequently, the major active principles from Mexican oreganos oils were quantified, and carvacrol and *p*-cymene were found in a ratio of 13:1 ( $736.6 \pm 6.59$  and  $56.9 \pm 0.39$  mg/g, dry matter, respectively) in the 3 batches of *P. longiflora* analyzed. Thymol was not detected in this species. In contrast, the most abundant compound in *L. graveolens* was thymol with a mean concentration of  $221.5 \pm 1.35$  mg/g, dry matter, along with carvacrol ( $164.7 \pm 0.67$  mg/g, dry matter) and *p*-cymene ( $149.2 \pm 0.87$  mg/g, dry matter).

### Acute toxicity and antibacterial activity

The important toxic effect displayed by the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1) extract of *P. longiflora* when tested by the Lorke method encouraged us to establish the potential toxicity of the essential oil from both oreganos using the same approach (Déciga-Campos and others 2007). In contrast to the extract, the oil of *P. longiflora* was not toxic to mice (LD<sub>50</sub> > 5000 mg/kg); on the other hand, neither the extract nor the essential oil of *L. graveolens* affected the animals when tested in a wide range of doses (10 to 5000 mg/kg); in both cases the LD<sub>50</sub>'s were higher than 5000 mg/kg.

The potential antimicrobial effect of the essential oils of *P. longiflora* and *L. graveolens* was assessed against an appropriated battery of Gram-negative and Gram-positive microorganisms according to the MTT microplate procedure (Appendino and others 2008). The MIC values determined are shown in Table 5. In general, the microorganisms were less sensitive to *L. graveolens* while the essential oils of *P. longiflora* exerted a marginal activity against *S. aureus* (MIC 128 µg/mL) and *B. subtilis* (MIC 128 µg/mL). The major components displayed moderate antimicrobial action with MICs ranging from 128 to 1024 µg/mL for all microorganisms tested, and these results are in agreement with previously reported data for thymol, carvacrol, and *p*-cymene (Ultee and others 2002; Burt 2004). The better antimicrobial activity of the essential oil of *P. longiflora* can thus be related with its higher content of carvacrol, which was more active than thymol and *p*-cymene against all microorganisms tested.

### *In vivo* and *in vitro* spasmolytic activities of the essential oils

The use of Mexican oreganos for treating gastrointestinal complaints prompted us to assess their effects in gastrointestinal motility

**Table 4—Recovery studies for thymol, carvacrol, and *p*-cymene.**

Sample	Compound	Spiked (mg/mL)	Recovery (%) <sup>a</sup>
<i>L. graveolens</i>	Carvacrol	0.01	99.6 (0.80)
	Thymol	0.01	101.1 (1.4)
	<i>p</i> -cymene	0.1	100.9 (0.79)
<i>L. graveolens</i>	Carvacrol	0.05	98.8 (1.4)
	Thymol	0.05	100.5 (1.2)
	<i>p</i> -cymene	0.5	100.8 (1.0)
<i>L. graveolens</i>	Carvacrol	0.1	100.9 (1.4)
	Thymol	0.1	102.0 (1.0)
	<i>p</i> -cymene	1	100.2 (1.2)

<sup>a</sup>Average recovery (%) is expressed as the mean of 6 determinations, and the RSD is shown in parenthesis

using both *in vivo* and *in vitro* models. Thus, oral administration of the essential oil of *P. longiflora* (10, 31.6, 52.6, 100, and 316 mg/kg) to mice shows a marginal dose-dependent inhibition of the gastrointestinal transit (GIT) (Table 6). The highest inhibition of the intestinal motility was attained with the treatment of 316 mg/kg that retarded intestinal transit by 22.3%. In contrast, the oil of *L. graveolens* at a dose of 200 mg/kg caused a significant dose-dependent inhibition on the intestinal movement retarding charcoal transit by 46.5% and its comparable with those of the positive control loperamide (GIT = 48.9%).

Regarding the pure compounds, the activity of *p*-cymene was only investigated and compared with that of carvacrol, which as thymol has shown spasmolytic action (Astudillo and others 2004). Thus, *p*-cymene and carvacrol reduced intestinal transit by 24.6% and 22.9%, respectively. These effects, although moderate were significant. Altogether, these results contributed to explain the antispasmodic effect of the oils of *P. longiflora* and *L. graveolens*.

Next, in order to obtain additional information about the antispasmodic properties of Mexican oreganos, a series of *in vitro* experiments were performed. In these trials, the effect of the oils and *p*-cymene on carbachol- and histamine-induced guinea-pig ileum contractions was assessed. The results of the pharmacological testing revealed that both oils provoked a concentration-dependent inhibition of the tone and amplitude of the guinea pig ileum induced contractions. The smooth-muscle inhibitory effect provoked by *L. graveolens* on both carbachol- and histamine-induced

**Table 5—Antibacterial activity of the essential oils, thymol, carvacrol, and *p*-cymene obtained from Mexican oreganos.**

Strain	MIC (µg/mL)				
	EOPI <sup>a</sup>	EOLg <sup>b</sup>	carvacrol	<i>p</i> -cymene	thymol
<i>B. subtilis</i>	128	512	128	1024	256
<i>S. aureus</i>	128	512	128	1024	512
<i>E. coli</i>	256	512	128	512	1024
<i>S. typhi</i>	256	512	128	512	1024
<i>P. aeruginosa</i>	512	NA	128	512	1024

<sup>a</sup>Essential oil of *P. longiflora* batch 1.

<sup>b</sup>Essential oil of *L. graveolens* batch 1.

All MIC values were determined in triplicate, and ampicillin was used as a positive control. NA = not active.

**Table 6—Effect of carvacrol, *p*-cymene, and essential oils from *L. graveolens* and *P. longiflora* on gastrointestinal transit in mice.**

Treatment	Dose (mg/kg) p.o.	Charcoal meal advance (%)	Inhibition (%)
Control	—	82.59 ± 5.13	—
EOPI	10	81.35 ± 3.02	1.50
	31.6	81.07 ± 2.98	1.84
	52.6	80.84 ± 1.81	2.12
	100	75.09 ± 4.54	9.08
	316	64.19 ± 1.89	22.27
EOLg	10	75.80 ± 3.67	8.22
	31.6	70.20 ± 3.01	15.00
	100	63.43 ± 5.25	23.19
Carvacrol	200	44.14 ± 1.60	46.55
	1	63.63 ± 3.77	22.95
	10	69.61 ± 2.67	15.71
	31.6	75.80 ± 3.67	8.22
	100	80.84 ± 1.81	2.11
<i>p</i> -cymene	300	81.35 ± 1.28	1.50
	1	62.30 ± 2.81	24.57
	10	66.61 ± 3.10	19.34
	31.6	78.60 ± 2.42	4.83
	100	79.28 ± 1.62	4.01
Loperamide	8	42.20 ± 5.83	48.90

Values are mean ± SEM ( $n = 8$ ).

contractions ( $IC_{50} = 19.9 \pm 3.1$  and  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively) were higher than that of *P. longiflora* ( $IC_{50} = 45.7 \pm 2.3$  and  $48.1 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$  for carbachol and for histamine, respectively) in agreement with the *in vivo* results. Next, the spasmolytic activity of *p*-cymene was corroborated *in vitro* and compared with that of carvacrol. *p*-Cymene showed a selective action inhibiting only the contractions induced by carbachol ( $IC_{50} = 9.85 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ ) in contrast to carvacrol that was able to reduced the contractions elicited by both carbachol ( $IC_{50} = 12.12 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$ ) and histamine ( $IC_{50} = 29.51 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$ ). The results obtained for carvacrol were consistent with those previously observed by several authors (Viana and others 1981; Van Den Broucke and Lemli 1980, 1982; Cabo and others 1986; Astudillo and others 2004). On the other hand, the results reported by Van Den Broucke and Lemli (1980, 1982) for *p*-cymene contrasted with ours which clearly demonstrated that this compound selectively inhibited guinea pig-carbachol induced contractions with the same efficacy as carvacrol.

## Conclusions

In summary, the results of this work showed that the essential oils of Mexican oreganos possess similar chemical composition although *P. longiflora* tends to accumulate carvacrol and *L. graveolens* thymol and carvacrol. These variations could be useful for differentiating both species. A suitable HPLC method was developed to quantify simultaneously the major components of Mexican oreganos, which indeed will be useful for quality control purposes of both plants. The method developed could be also useful for quality control purposes of European oreganos. The spasmolytic activity demonstrated in this study for *L. graveolens* and *P. longiflora* showed a good correlation with their medicinal use for the treatment of gastrointestinal complaints. The chemical composition of *L. graveolens*'s essential oil further supports its noted spasmolytic action since both thymol and carvacrol possess spasmolytic action. The effect of *P. longiflora*, however, is due to the presence of carvacrol and *p*-cymene; if both compounds act synergistically remains an open question. Altogether, the chemical and pharmacological information obtained in the present investigation for *P. longiflora* explained its use as substitute of *L. graveolens* for culinary and medicinal purposes.

## Acknowledgments

This work was supported by grants of Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA, IN-218110) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 99395). The authors wish to thank for the technical assistance of Araceli Pérez-Vasquez, Marisela Gutiérrez, Margarita Guzmán, and Rosa Isela del Villar. I.R. acknowledges fellowship the grant PASPA from DGAPA. The authors are indebted to Sol Cristians for his valuable observations.

## References

- Adams RP. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectroscopy Chicago, Ill.: Allured Publishing Corp.
- Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 71:1427–30.
- Argueta A, Cano A, Rodarte ME. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México: INI. 1786 p.
- Astudillo A, Hong E, Bye R, Navarrete A. 2004. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytother Res* 18:102–6.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int J Food Microbiol* 94:223–53.
- Cabo J, Crespo GME, Jiménez J, Zarzuelo A. 1986. The spasmolytic activity of various aromatic plants from the Province of Granada. I. The activity of the major components of their essential oils. *Plantas Medicinales et Phytotherapie* 20:213–8.
- Cáceres A, Álvarez AV, Ovando AE, Samayoa BE. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases I. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol* 31:193–208.
- Cáceres A, Fletes L, Aguilar L, Ramírez O, Figueroa L, Taracena AM, Samayoa B. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders III. Confirmation of activity against enterobacterias of 16 plants. *J Ethnopharmacol* 38:31–8.
- Calvo-Irabien LM, Yam-Puc JA, Dzib G, Escalante-Erosa F, Peña-Rodríguez LM. 2009. Effect of postharvest drying on the composition of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) essential oil. *J Herbs, Spices and Medicinal Plants* 15:281–7.
- Calpouzos L. 1954. Botanical aspects of oregano. *Econ Bot* 8:222–33.
- Compadre CM, Robbins EF, Kinghorn D. 1982. Volatile constituents of *Montana tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Med* 53:495–6.
- Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Casteñeda-Corral G, Angeles-López G, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 110:334–42.
- De Vincenzi M, Mailetto F, Dessi MR. 1995. Monographs on botanical flavouring substances used in foods Part IV. *Fitoterapia* 66:203–10.
- Domínguez XA, Sánchez H, Sánchez M, Baldas JH, González MR. 1989. Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med* 31:181–92.
- Figueroa M, Rivero I, Rivero B, Bye R, Navarrete A, Mata R. 2007. Constituents, biological activities and quality control parameters of the crude extract and essential oil from *Arracacia toluensis* var. multifida. *J Ethnopharmacol* 113:125–31.
- Forestieri AM, Monforte MT, Ragusa S, Trovato A, Iauk L. 1996. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. *Phytother Res* 10:100–6.
- Gregg J. 1848. Catalogue of plants with notes. St. Louis, Mo.: Missouri Botanical Garden [herbarium specimen: 1848:313 GH]. 105 p.
- Lecona-Urbe S, Loarca-Piña G, Arcila-Lozano C, Cadwallader K. 2007. Chemical characterization of *Lippia graveolens* Kunth and Comparison to *Origanum vulgare* and *Origanum laevigatum* "Herrenhaus". *ACS Symposium Series* 946:45–55.
- Loizzo M, Menichini F, Conforti F, Tundis R, Bonesi M, Saab AM, Statti GA, de Cindio B, Houghton PJ, Menichini F, Frega NG. 2009. Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chem* 117:174–80.
- Lorke D. 1983. A new approach to partial acute toxicity testing. *Arch Toxicol* 54:275–87.
- Morton JE. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America, vol. I. Ill.: Springfield, p 745–50.
- Mueller M, Lukas B, Novak J, Simoncini T, Genazzani AR, Jungbauer A. 2008. Oregano: a source for peroxisome proliferator-activated receptor g antagonists. *J Agric Food Chem* 56:11621–30.
- Musa M, Chalchat JC. 2009. Chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil of *Origanum saccatum* L. *J Food Safety* 29:617–28.
- Ozhan G, Baydar H, Erbas S. 2010. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents, and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *J Sci Food Agric* 90:205–9.
- Prieto JM, Iacopini P, Cioni P, Chericoni S. 2007. *In vitro* activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. *Food Chem* 104:889–95.
- Rubiolo P, Belliaro F, Cordero Ch, Liberto E, Sgorbini B, Bicchi C. 2006. Headspace-solid-phase microextraction fast GC in combination with principal component analysis as a tool to classify different chemotypes of chamomile flower-heads (*Matricaria recutita* L.). *Phytochem Anal* 17:217–25.
- Russo M, Galletti G, Bocchini P, Carnacini A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J Agric Food Chem* 46:3741–6.
- Saeedi M, Morteza-Semnani K. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Origanum vulgare* L. *Int J Biol Biotech* 4:259–65.
- Senatore F, Rigano D. 2001. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour and Frag J* 16:169–71.
- Shihari T, Selvam JP, Aranganathan S, Ramakrishna DS, Nalini N. 2008. Escalation of circulatory antioxidants by oregano (*Origanum vulgare* L.) during 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *J Cell T Res* 8:1405–10.
- Tan-No K, Nijijima F, Nakagawasi O, Sato T, Satoh S, Tadano T. 2003. Development of tolerance to the inhibitory effect of loperamide on gastrointestinal transit in mice. *Eur J Pharm Sci* 20:357–63.
- Turgut N, Silva R. 2005. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions. *J App Hort* 7:20–2.
- Ultee A, Bennis MHJ, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microb* 68:1561–8.
- Van Den Broucke CO, Lemli JA. 1980. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 1. *Planta Med* 38:317–31.
- Van Den Broucke CO, Lemli JA. 1982. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. Part 2. *Planta Med* 45:188–90.
- Van Den Dool H, Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr* 11:463–71.
- Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2005. Tripartite International Conference on Harmonisation Text (ICH). Geneva, Switzerland: ICH Tech. Coordination.
- Vernin G, Lageot C, Gaydou EM, Parkanyi C. 2001. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from el Salvador. *Flavour Fragr J* 16:219–26.
- Viana GSB, Matos FF, Araujo WL, Matos FJA, Craveiro AA. 1981. Essential oil of *Lippia grata*: pharmacological effects and main constituents. *Quarterly J Crude Drug Res* 19:1–10.
- Yousif AN, Durance TD, Scaman CH, Girard B. 2000. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air, and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *J Food Sci* 65:926–30.
- Zamora-Martínez MC, Nieto de Pascual C. 1992. Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. *J Ethnopharmacol* 35:229–57.
- Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165–70.