



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

“Pruebas de Eficacia, Identidad y Composición de la Droga Cruda *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (ASTERACEAE)”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. GUADALUPE ESTHER ÁNGELES LÓPEZ



TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG AÑO: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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada (becaria 177427) para desarrollar mis estudios de doctorado.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos de CONACyT 99395 y DGAPA IN- 218-101.

Agradecer a mi comite tutor, los Doctores Francisco Hernández Luís y Enrique Ángeles Anguiano por todos sus valiosos comentarios para enriquecer esta tesis.

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito de tesis, así como sus valiosos comentarios y obervaciones.

A los Doctores Robert Bye y Edelmira Linares por proporcionarme el material vegetal para este proyecto.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación USAI de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo brindado para la determinación de espectros.

A la M. en C. Isabel Rivero Cruz y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez por su apoyo técnico en el desarrollo de esta tesis

Agradecer especialmente a la Dra. Rachel Mata Essayag, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por estar muy al pendiente del desarrollo de esta tesis.

JURADO

Presidente	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Alejandra Rojas Molina
Secretario	Dr. Francisco Hernández Luís

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS

Laboratorio 124, Conjunto E, Departamento de Farmacia

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

A mi mamá Tere, Padrinos, Familia, Amigos y a Fer
Muchas Gracias

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE ESPECTROS	X
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Criterios de Calidad, Eficacia y Seguridad de las Plantas Medicinales de Mayor Uso Popular: El Mejor Camino hacia su Regulación a Nivel Global	3
2.2. Antecedentes Etnobotánicos, Farmacológicos y Fitoquímicos de <i>Hofmeisteria schaffneri</i> (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae)	9
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
IV. HIPÓTESIS	16
V. METAS	17
VI. METODOLOGÍA	18
6.1. Material Vegetal de <i>H. schaffneri</i> (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae)	18
6.2. Preparación de Extractos y Aceite Esencial	19
6.2.1. Obtención del extracto orgánico	19

6.2.2. <i>Obtención del aceite esencial</i>	19
6.2.3. <i>Preparación del extracto acuoso</i>	20
6.3. Ensayos Biológicos	20
6.3.1. <i>Animales</i>	20
6.3.2. <i>Toxicidad aguda</i>	21
6.3.3. <i>Evaluación del efecto antinociceptivo</i>	22
6.3.3.1. <i>Evaluación del efecto antinociceptivo: modelo de estiramiento abdominal</i>	22
6.3.3.2. <i>Evaluación del efecto antinociceptivo: modelo de la placa caliente</i>	22
6.3.4. <i>Evaluación del efecto espasmolítico: modelo de tránsito intestinal</i>	23
6.3.5. <i>Evaluación del efecto antibacteriano y antifúngico: método de diluciones</i>	24
6.3.6. <i>Evaluación del efecto antiparasitario: ensayo in vitro de susceptibilidad.</i>	25
6.4. Pruebas Estadísticas	25
6.5. Síntesis de Derivados del Timol	26
6.5.2. <i>Preparación de ésteres de timilo</i>	26
6.5.3. <i>Acetato de timilo (26)</i>	27
6.6. Estabilidad de Ésteres	28
6.7. Desarrollo y Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Angelato de 8,9-Epoxy-10-Acetoxitimilo (8) de <i>H. schaffneri</i> por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	30
6.7.1. <i>Especificidad</i>	30

6.7.2. <i>Linealidad del sistema</i>	31
6.7.3. <i>Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)</i>	31
6.7.4. <i>Linealidad del método y exactitud</i>	32
6.7.5. <i>Precisión del método</i>	33
6.7.6. <i>Estabilidad</i>	33
6.8. Caracterización Anatómica de las Partes Aéreas	34
6.8.1. <i>Deshidratación, inclusión y cortes del material vegetal</i>	34
6.8.2. <i>Técnicas histoquímicas de tinción</i>	35
6.8.3. <i>Análisis de las preparaciones histológicas</i>	36
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1. Pruebas de Toxicidad y Eficacia	38
7.1.1. <i>Toxicidad aguda por método de Lorke</i>	38
7.1.2. <i>Evaluación del potencial antinociceptivo de extractos y compuestos en los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal</i>	39
7.1.3. <i>Determinación del efecto antinociceptivo de los derivados de timol sintetizados</i>	47
7.1.4. <i>Determinación del efecto antinociceptivo del ácido isovalérico</i>	49
7.1.5. <i>Determinación del efecto espasmolítico en extractos y aceite esencial</i>	52
7.1.6. <i>Determinación del efecto antimicrobiano y antifúngico</i>	57
7.1.7. <i>Determinación del efecto antiprotozoario</i>	61
7.2. Pruebas de Composición e Identidad	62
7.2.1. <i>Prueba de composición</i>	62
7.2.1.1. <i>Selectividad</i>	65

7.2.1.2. <i>Linealidad del sistema</i>	65
7.2.1.3. <i>Límite de detección y límite de cuantificación</i>	69
7.2.2.4. <i>Linealidad del método y exactitud</i>	69
7.2.2.5. <i>Precisión del método</i>	71
7.2.2.6. <i>Estabilidad</i>	73
7.3. Caracterización Anatómica de las Partes Aéreas	74
VIII. CONCLUSIONES	81
IX. BIBLIOGRAFÍA	83
X. ANEXO A	92
XI. ANEXO B	128
XII. ANEXO C	132

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos aislados de <i>H. schaffneri</i> .	12
Cuadro 2. Monoterpenos aislados de <i>H. schaffneri</i> .	13
Cuadro 3. Material vegetal.	18
Cuadro 4. Ésteres de timilo.	29
Cuadro 5. Evaluación de la toxicidad aguda en ratones por el método de Lorke.	39
Cuadro 6. Datos de los espectros de RMN ¹ H (300 MHz) y ¹³ C (100 MHz) de los productos 18-20 (CDCl ₃).	48
Cuadro 7. Estabilidad <i>in vivo</i> de ésteres derivados del timol utilizando esterasas de hígado de cerdo.	52
Cuadro 8. Efecto antimicrobiano de extractos y esencia de <i>H. schaffneri</i> .	60
Cuadro 9. Efecto antiprotozoario de extractos y esencia de <i>H. schaffneri</i> .	61
Cuadro 10. Resultados experimentales de la curva de calibración de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8) para evaluar la linealidad del sistema.	67
Cuadro 11. Resultados experimentales de la curva de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8) para evaluar del método y exactitud.	70
Cuadro 12. Resultados experimentales para evaluar la precisión (repetibilidad/precisión).	73
Cuadro 13. Resultados de la evaluación de estabilidad representados por Idil.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hofmeisteria schaffneri</i> .	10
Figura 2. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de estiramiento abdominal.	40
Figura 3. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	41
Figura 4. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	42
Figura 5. Efecto antinociceptivo del aceite esencial de <i>H. schaffneri</i> en el modelo de la placa caliente.	42
Figura 6. Efecto antinociceptivo del angelato de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8) en el modelo de la placa caliente.	43
Figura 7. Efecto antinociceptivo del angelato de la hofmeisterina III (12) en el modelo de la placa caliente.	44
Figura 8. Efecto antinociceptivo del angelato del isovalerato de timilo (13) e isobutirato de timilo (14) en el modelo de la placa caliente.	44
Figura 9. Comparación de la actividad antinociceptiva de 12 con los compuestos 13 y 14 a la dosis de 1 mg/Kg en el modelo de la placa caliente.	45
Figura 10. Efecto antinociceptivo del timol (11) en el modelo de la placa caliente.	45

-
- Figura 11.** Efecto antinociceptivo de la hofmeisterina III (**12**), así como **12** (1 mg/Kg) + naloxona (1 mg/Kg) en el modelo de la placa caliente. 46
- Figura 12.** Efecto antinociceptivo del hexanoato (**22**), valerato de timilo (**24**) y acetato de timilo (**26**) en el modelo de la placa caliente. 49
- Figura 13.** Efecto antinociceptivo del ácido isovalérico (**22**) en el modelo de la placa caliente. 50
- Figura 14.** Efecto espasmolítico del extracto orgánico en el modelo de tránsito intestinal. 53
- Figura 15.** Efecto espasmolítico del extracto acuoso en el modelo de tránsito intestinal. 54
- Figura 16.** Efecto espasmolítico del aceite esencial en el modelo de tránsito intestinal. 54
- Figura 17.** Efecto espasmolítico de la hofmeisterina III (**12**) en el modelo de tránsito intestinal. 55
- Figura 18.** Efecto espasmolítico del timol (**11**) en el modelo de tránsito intestinal. 55
- Figura 19.** Efecto espasmolítico del 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (**8**) en el modelo de tránsito intestinal. 56
- Figura 20.** Efecto espasmolítico del isovalerato de timilo (**13**) en el modelo de tránsito intestinal. 56

Figura 21. Efecto espasmolítico del isobutirato de timilo (14) en el modelo de tránsito intestinal.	57
Figura 22. Cromatograma de la infusión de <i>H. schaffneri</i> .	64
Figura 23. Espectros de absorción al UV de la a) solución de referencia, b) matriz de trabajo y c) matriz de trabajo con solución de referencia.	66
Figura 24. Gráfica de la evaluación de la linealidad del sistema de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8).	68
Figura 25. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método y exactitud de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8).	70
Figura 26. (A). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm de un estoma anomocítico (E). (B). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm, tricomas multicelulares uniseriados (Tr).	75
Figura 27. (A). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm, dorsiventral, cámaras subestomáticas en cara abaxial y adaxial. (B). Fotomicrografía de hoja de tricomas glandulares(Tr).	75
Figura 28. (A). Fotomicrografía de hoja Tr, CJ, 9 µm, cavidades secretoras cerca del haz vascular (CS). (B). Fotomicrografía de hoja Tr, CJ, 9 µm, cavidad secretora con contenido (CS).	76
Figura 29. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, ANN, 13 µm, material ergástico (estiliodeo) en médula. (B). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 µm, elementos traqueales lignificados.	77

Figura 30. (A). Fotomicrografía de tallo Tr, Rj"O", 13 μm , haces 78 vasculares colaterales. (B). Fotomicrografía de tallo Tr, ANN, 13 μm , macroesclereidas. (C). Fotomicrografía de tallo Lg, ANN, 13 μm , felema de 5 capas.

Figura 31. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , elementos 79 traqueales lignificados con ornamentación puntuada. (B). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , elementos de vaso con ornamentación helicoidal (V). (C). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , felema.

Figura 32. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , contenido 80 parenquimático glucolipídico. (B). Fotomicrografía de tallo Lg, Rj "O", 13 μm , células medulares con glucolípidos.

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 8 (CDCl ₃)	93
Espectro 2. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 8	94
Espectro 3. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 11 (CDCl ₃)	95
Espectro 4. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 11	96
Espectro 5. RMN- ¹ H del compuesto 12 (CDCl ₃) 300MHz.	97
Espectro 6. RMN- ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 12 (CDCl ₃)	98
Espectro 7. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 12	99
Espectro 8. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 13 (CDCl ₃)	100
Espectro 9. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 13	101
Espectro 10. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 14 (CDCl ₃)	102
Espectro 11. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 14	103

Espectro 12. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 15 (CDCl ₃)	104
Espectro 13. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 15	105
Espectro 14. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 16 (CDCl ₃)	106
Espectro 15. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 16	107
Espectro 16. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 17 (CDCl ₃)	108
Espectro 17. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 17	109
Espectro 18. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 18 (CDCl ₃)	110
Espectro 19. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 18	111
Espectro 20. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 19 (CDCl ₃)	112
Espectro 21. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 19	113
Espectro 22. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 20 (CDCl ₃)	114

Espectro 23. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 20	115
Espectro 24. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 21 (CDCl ₃)	116
Espectro 25. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 21	117
Espectro 26. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 22 (CDCl ₃)	118
Espectro 27. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 22	119
Espectro 28. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 23 (CDCl ₃)	120
Espectro 29. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 23	121
Espectro 30. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 24 (CDCl ₃)	122
Espectro 31. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 24	123
Espectro 32. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 25 (CDCl ₃)	124
Espectro 33. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 25	125

Espectro 34. RMN- ¹ H (300MHz) y ¹³ C (75.5 MHz) del compuesto 26 (CDCl ₃)	126
Espectro 35. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 26	127

RESUMEN

La presente disertación doctoral, describe algunos parámetros de inocuidad, eficacia y calidad, de la especie medicinal *Hofmeisteria shaffneri*, utilizada para el tratamiento de desórdenes estomacales. Esta investigación se encuentra enfocada hacia la realización de la monografía científica de acuerdo a los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

En primer lugar, se determinó la toxicidad aguda potencial del extracto orgánico, infusión y aceite esencial mediante el método de Lorke. Los resultados permitieron comprobar, que el extracto es inocuo para ratones.

Con respecto a los parámetros de eficacia, se evaluaron diferentes efectos: el potencial antinociceptivo, espasmolítico y antimicrobiano.

El primer parámetro de eficacia evaluado, fue el potencial antinociceptivo. Los resultados demostraron que el extracto (177 y 562 mg/Kg, p.o. [vía oral]), la infusión (10 a 316 mg/Kg, p.o.), y el aceite esencial (1 y 17.7 mg/Kg, p.o.) de la planta, evaluados separadamente, poseen un efecto antinociceptivo significativo en el modelo de placa caliente. Sin embargo, el extracto no afectó la respuesta de los animales, con respecto al control en el modelo de estiramiento abdominal.

Debido a que no se observó actividad, en el modelo del estiramiento abdominal, los compuestos aislados de los extractos fueron evaluados, mediante el ensayo de la placa caliente. La hofmeisterina III (**12**, 0.316-17.7 mg/Kg, p.o) también presentó propiedades antinociceptivas importantes que disminuyen en

presencia de naloxona, lo cual indica que el efecto de este compuesto, puede estar mediado por uno o más receptores opioides.

El timol (**11**, 10- 562 mg/Kg) presentó un efecto antinociceptivo moderado y fue significativo sólo a la dosis de 100 mg/Kg. Por lo tanto, este compuesto es menos eficaz que el producto **12**; mientras el isovalerato (**13**) e isobutirato de timilo (**14**) (0.316-17.7 mg/Kg) fueron bastante activos. El efecto de **13** fue significativo con los tres tratamientos mientras que **14** fue activo a las dosis de 1 y 17.7 mg/Kg.

Para establecer, si la modificación estructural de una molécula líder podía mejorar su eficacia, se sintetizaron 12 análogos del compuesto **12**, (**13-26**). Los ésteres resultantes fueron evaluados en el modelo de la placa caliente. Los compuestos **18**, **19**, **20** y **22** fueron nuevas entidades químicas, siendo los compuestos **22**, **24** y **26** los únicos que presentaron actividad de los **12** compuestos sintetizados.

De manera adicional, se realizaron pruebas de estabilidad, pues no se observó una clara relación estructura actividad. Por tal motivo, se evaluaron los compuestos **12-15** frente a esterasas de hígado de cerdo y en plasma de ratón; los resultados indicaron que el compuesto **12** presentó la mejor estabilidad, congruente con su mejor eficacia.

Una vez determinado el potencial antinociceptivo se evaluó el potencial espasmolítico de distintos preparados de la droga cruda, el cuál resultó ser significativo en todos los extractos evaluados.

Los compuestos principales fueron evaluados para determinar su potencial espasmolítico. Así, **12** (17.7 - 31.6 mg/Kg) presentó un efecto que fue significativo a partir de la dosis de 17.7 mg/Kg; **11** (17.7- 100 mg/Kg) fue activo a partir de la dosis de 56.2 mg/Kg; el 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (**8**), **13** y **14** (5.6 - 31.6 mg/Kg), fueron eficaces a partir de la dosis de 31.6 mg/Kg (**8**) y de 5.6-17.7 mg/Kg en el caso de **13** y **14**. Por lo tanto, el efecto espasmolítico detectado en la infusión y aceite esencial es debido a los compuestos **8**, **13** y **14**.

El último parámetro de eficacia realizado fue el potencial antimicrobiano. Los extractos y aceite esencial se evaluaron contra bacterias Gram positivo y negativo, además de una levadura. Los resultados obtenidos indicaron, que el extracto orgánico es inactivo; mientras que el aceite esencial y la infusión resultaron ser activos únicamente contra bacterias Gram positivo.

Los compuestos **8** y **13** presentaron una actividad mayor a la del timol (**11**) contra *S. aureus* (CMI = 32 y 64 µg/mL) y *B. subtilis* (CMI = 64 y 32 µg/mL) y fueron inactivos contra *C. albicans*. Sin embargo **12**, el componente mayoritario de los aceites y el extracto orgánico fueron inactivos contra todos los microorganismos evaluados. El compuesto **9** (CMI = 128 µg/mL), uno de los componentes de la infusión, también demostró una actividad antifúngica comparable a la del timol (**11**) (MIC = 192 µg/mL). Los compuestos **4-6** y **14** evaluados contra bacterias Gram positivo y *Candida albicans* no presentaron una actividad significativa. Cabe señalar que la evaluación de extractos y compuestos contra *E. histolytica* y *G. lamblia* no presentaron actividad alguna a las concentraciones evaluadas.

Se desarrolló un método analítico para cuantificar el contenido de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8) presente en la infusión de *H. schaffneri*. El método resultó ser lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones desarrollado. Los resultados globales del estudio de *H. schaffneri* permitirán integrar la primera monografía tipo OMS de esta importante especie vegetal.

ABSTRACT

The present work was undertaken to determine several safety and efficacy parameters of *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae), a medicinal plant highly valued for the treatment of stomachaches and infectious diseases in Central Mexico. This investigation is part of the research conducted to generate a scientific monograph following the World Health Organization (WHO) criteria.

In the first place, acute toxicity was established in mice according to the Lorke procedure. For this purpose, a CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract, an essential oil and an infusion were evaluated. None of the preparations were toxic to mice because the LD₅₀ was higher than 5000 mg/Kg.

The antinociceptive, spasmolytic and antimicrobial effects of different preparations and compounds of the plants were assessed in different animal models. These activities were selected considering the popular uses of the plant.

The antinociceptive effect was established using the writhing and hot plate tests. The results indicated an important antinociceptive effect of the CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract (177 and 562 mg/Kg), essential oil (1 and 17.7 mg/Kg), and infusion (10 to 316 mg/Kg) when tested in the hot plate model.

The main components of the plant were also evaluated in hot plate test Hofmeisterin III (**12**, 0.316-17.7 mg/Kg) showed an outstanding antinociceptive

effect, which was partially blocked by naloxone (1 mg/Kg, i.p), suggesting that its mode of action involved the opioid receptors (μ , κ , δ).

Thymyl isovalerate (**13**) and thymyl isobutyrate (**14**) (**13** and **14**, 0.316-17.7 mg/Kg) were also active. Thymol (**11**, 10-562 mg/Kg), however, was less effective than **12-14**.

In order to establish if structural modification of **12** could improved its antinociceptive effect, twelve analogs were synthetized. These compounds also were assessed in the hot plate test. Compounds **18**, **19**, **20** y **22** were new chemical structures; only **22**, **24** and **26** showed antinociceptive action.

Considering that the stability of drugs in biological systems plays an important role in their activity and that degradation of drug esters in biological matrices is mainly attributed to their hydrolysis by esterases, the stability in vitro of the most active, (**12-14**) and one inactive (**15**) thymyl esters was assessed during 24 hours. The stability study was qualitatively performed measuring the susceptibility to hydrolysis **12-15** in the presence of commercial pig liver estearase solutions in two buffers (pH 7.4 and 5.0) as well as in mouse plasma at 37°C. Only compound **12** was stable during the first hour of the experiment. On the whole, the results indicated that the better antinociceptive activity of compound **12** could be partially due to a better stability.

The spasmolytic effect of the extract and compounds was established using the intestinal transit test. The infusion, essential oil and compounds 8-9-epoxy-

10acetoxithymyl (**8**), thymyl isovalerate (**13**) and thymyl isobutyrate (**14**) (**8**, **13**, **14**, 5.6 - 31.6 mg/Kg) were active.

The different extracts and compounds of the plant were evaluated against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*) and a yeast (*Candida albicans*). The results indicated that CH₂Cl₂-MeOH (1:1) extract was inactive, while the infusion and essential oil were effective against Gram-positive bacteria. Compounds **8** and **13**, had better activity than thymol (**11**) against *S. aureus* (MIC = 32 and 64 µg/mL, respectively) and *B. subtilis* (MIC = 64 and 32 µg/mL, respectively), however, no antifungal effect was observed against *C. albicans*. Nevertheless, hofmeisterin III (**12**), the main compound of essential oil and organic extract, was inactive against the microorganisms evaluated. Compound **9** showed better activity (MIC = 128 µg/mL) than thymol (**11**, 192 µg/mL).

Compound **8**, one of the active compounds of the plant, was chosen for the development and validation of an HPLC-dual method suitable for quality control of the crude drug. The method used a gradient elution to achieve separation via a Hibar® RT LiChrospher® 100 C₁₈ column. The LOD (limit of detection) values were 0.06 µg/mL and the LOQ (limit of quantification) 0.19µg/mL, respectively. The method showed good interday precision (%RSD: 0.66%).

Altogether, the results of the present study will be useful for the elaboration of the first WHO monograph of this important medicinal species.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (Heinrich *et al.*, 2006).

Los procedimientos de la medicina tradicional, varían en gran medida de un país a otro y de una región a otra, pues reciben la influencia de factores como la cultura, la historia y las actitudes e ideas personales. En muchos casos, su teoría y aplicación son muy diferentes a la medicina convencional. La utilización a lo largo del tiempo, la experiencia transmitida de generación en generación, junto con sus muchos procedimientos, ha demostrado la inocuidad y la eficacia de la medicina tradicional, pero se necesitan investigaciones científicas que aporten pruebas suplementarias al respecto. En la investigación y evaluación de la medicina tradicional, se deben respetar los conocimientos y la experiencia obtenidos en la larga historia de uso de procedimientos establecidos.

Pese a su existencia y su utilización continua, durante muchos siglos, a su popularidad y gran difusión, durante el pasado decenio, la medicina tradicional no está oficialmente reconocida en la mayoría de los países. En consecuencia, la educación, la capacitación y la investigación en ese sector, no han recibido la

atención y el apoyo que merecen. La cantidad y la calidad de los datos sobre la inocuidad y la eficacia de los fitopreparados distan mucho de ser suficientes, para satisfacer los criterios necesarios con vistas a apoyar su utilización a escala mundial. La falta de datos de investigaciones, se debe no sólo a las políticas de asistencia sanitaria, sino también a la falta de una metodología de investigación adecuada o aceptada para evaluar la medicina tradicional.

La situación en México es similar a la de otros países y conviene observar que aunque hay datos, tanto publicados como inéditos, sobre las investigaciones relativas, a los recursos vegetales de la medicina tradicional, es necesario fomentar más estudios sobre la calidad, la inocuidad y la eficacia de las especies medicinales de mayor uso y comercialización. *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae), objeto de este trabajo, es una de estas plantas; indudablemente el establecimiento de sus parámetros de eficacia, seguridad y calidad, incidirán en el uso racional de la misma.

II. ANTECEDENTES

2.1. Criterios de Calidad, Eficacia y Seguridad de las Plantas Medicinales de Mayor Uso Popular: El Mejor Camino hacia su Regulación a Nivel Global

Desde el inicio de las civilizaciones, la humanidad ha encontrado en los productos naturales (animales, vegetales y minerales) el remedio para combatir las enfermedades y preservar la salud. El mejor testimonio de esta aseveración es el legado de la medicina tradicional de las culturas egipcia, china, inca, azteca y maya entre otras, preservado gracias a la transmisión oral.

Actualmente, el uso de los remedios vegetales se ha intensificado notablemente a nivel global; se estima que existen alrededor de 70, 000 plantas curativas y que aproximadamente entre un 70-95 % de la población mundial utiliza un sistema alternativo basado en plantas medicinales (OMS, 2011). En los países industrializados ha resurgido el uso de la herbolaria medicinal, debido al creciente interés por las terapias alternativas. Este interés se puede deber a muchos factores, tales como: la ineficiencia de la medicina convencional (e.g. efectos adversos y terapia inefectiva), abuso y/o uso incorrecto de los fármacos sintéticos dando como resultado problemas terapéuticos así como la idea equivocada de que los “productos naturales” no son peligrosos (Rates, 2001).

Por lo tanto, el reino vegetal es una fuente importante de agentes terapéuticos, bien sea de medicamentos alópatas o de productos fitoterapéuticos de las más diversas categorías. De tal forma, que los productos naturales y sus derivados representan más del 50 % del total de fármacos utilizados en la medicina convencional; de estos, las plantas superiores contribuyen en no menos de un 25 % del total. Durante los últimos 40 años, al menos una docena de fármacos muy potentes han sido obtenidos de plantas (Gurib-Fakim *et al.*, 2006).

En la actualidad, la mayoría de países tienen leyes que regulan de alguna forma el consumo de productos herbolarios medicinales (materias primas y derivados). Sin embargo, estas varían en gran medida de un país a otro y de una región a otra, pues reciben la influencia de factores como la cultura e historia. Además, la medicina tradicional no está oficialmente reconocida en la mayoría de los países. En consecuencia, la educación, la capacitación y la investigación en ese sector no han recibido la atención y el apoyo que merecen. La cantidad y la calidad de los datos sobre la inocuidad y la eficacia de la medicina tradicional distan mucho de ser suficientes para satisfacer los criterios necesarios con vistas a apoyar su utilización a escala mundial.

La falta de datos de investigación se debe no sólo a las políticas de asistencia sanitaria, sino también a la falta de una metodología de investigación adecuada o aceptada para evaluar la medicina tradicional. También conviene observar que aunque en varios países hay datos tanto publicados como inéditos sobre las investigaciones relativas a la medicina tradicional, se deben fomentar más las

investigaciones sobre la inocuidad y la eficacia y se debe mejorar la calidad de las investigaciones.

Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los medicamentos herbarios y, en consecuencia, ayudar a los organismos nacionales de reglamentación, las organizaciones científicas y a los encargados de la elaboración de estos productos, bien sean pequeños o grandes productores. Tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados, se debe facilitar a los consumidores y los dispensadores de asistencia sanitaria información actualizada y autorizada sobre las propiedades beneficiosas y los posibles efectos nocivos de todos los medicamentos herbolarios.

El aseguramiento de la calidad de los preparados herbolarios y las materias primas es sin duda un prerrequisito para la posterior evaluación de su eficacia e inocuidad. Normalmente bastaría con hacer referencia a una monografía de la farmacopea, sin embargo, en el caso de estos productos en la mayoría de los casos la información no existe. Por lo tanto, se deben generar monografías con el mismo formato que en una farmacopea oficial.

Aunque el empleo prolongado de una sustancia suele dar testimonio de su inocuidad es necesario la investigación de la posible toxicidad de los productos herbolarios, ya que en muchos casos se ha encontrado posibilidades antes insospechadas de toxicidad sistemática, carcinogenicidad y teratogenicidad.

Además, algunos productos utilizados durante un largo periodo, pueden haber generado riesgos toxicológicos crónicos que hayan pasado inadvertidos. Si no se puede documentar la utilización tradicional prolongada o si hay dudas sobre la inocuidad del producto, se presentarán datos sobre la toxicidad.

En el caso de los medicamentos tradicionales, los requisitos para probar la eficacia dependerán del uso tradicional. En el del tratamiento de trastornos leves o con indicaciones inespecíficas, se puede justificar que los requisitos para probar la eficacia sean algo menos estrictos, teniendo en cuenta la antigüedad del uso tradicional. Esas mismas consideraciones son aplicables a la utilización profiláctica. Se tendrán en cuenta las experiencias sobre casos individuales registradas en los informes de médicos, profesionales de medicina tradicional o pacientes tratados. En los casos en que no se haya determinado la utilización tradicional, se requerirán pruebas preclínicas y clínicas apropiadas.

Entre los documentos relacionados con la eficacia, seguridad y aseguramiento de la calidad de plantas medicinales y derivados que ha publicado la OMS, con el propósito de facilitar a sus países miembros la tarea de investigar y regular sus recursos vegetales más importantes, se describen a continuación:

El manual “Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials”, una colección de procedimientos y pruebas recomendadas para la determinación de la identidad, la pureza y la calidad de plantas medicinales, publicado en 1998. En 2007, la OMS publicó una nueva guía complementaria a la anterior, “WHO

Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues". En 1999, esta misma organización editó las primeras 28 monografías de plantas medicinales ampliamente utilizadas alrededor del mundo. Posteriormente, en los años 2003, 2007 y 2009, se publicaron dos volúmenes adicionales con 30, 31 y 28 monografías, respectivamente (WHO, 2003, 2007 y 2009); finalmente, en el año 2010 se publicaron 13 monografías nuevas y 17 actualizaciones de monografías anteriores (WHO, 2010). Cada monografía contiene información científica valiosa sobre el control de calidad, eficacia e inocuidad de las plantas. A partir de esta iniciativa de la OMS, muchas instituciones gubernamentales del sector salud de sus países miembros han tratado de establecer los criterios que garanticen la seguridad, la eficacia y la calidad de los productos herbolarios medicinales de mayor consumo en cada región (De Smet, 2002; OMS, 2002).

Las recomendaciones de la OMS han sido bien aceptadas en países como China e India, los cuales tienen sistemas de salud integradores, y en la comunidad Europea. En esta última región, principalmente en Alemania, el 50% de los productos medicinales vegetales son vendidos bajo una prescripción médica (Rates, 2001). En Latinoamérica, donde los sistemas de salud son tolerantes, la investigación destinada a establecer la eficacia, la seguridad y la calidad de las plantas medicinales es escasa, y las herramientas para la regulación de estos productos son prácticamente nulas.

En el caso específico de México, las plantas medicinales han constituido desde siempre un recurso importante para el alivio de enfermedades. Las plantas medicinales no solamente se han utilizado en el medio indígena y área rural, también en zonas urbanas. Al igual que en otros países de América Latina, México comercializa de manera no regulada muchas especies vegetales medicinales, bajo la creencia de que son inocuas. Aún más, muchos de los productos derivados de estas especies no son sujetas a estudios de control de calidad, por lo que en muchas ocasiones los usuarios consumen productos de baja o nula calidad o adulterados. A pesar de ello, hasta ahora no se han realizado de manera rigurosa monografías de las plantas medicinales comúnmente utilizadas en nuestro país.

A partir del año 2001, la Secretaría de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) teniendo como objetivo “Establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de este tipo de productos y su uso adecuado” (FHEUM, 2001). Sin embargo, el número de monografías de especies vernáculas e introducidas resultó insuficiente, por la sencilla razón de que no se contaba con la información científica adecuada para su integración.

En consecuencia, un grupo de investigadores nacionales inició un proyecto académico para la elaboración de monografías científicas de tipo OMS de plantas medicinales mexicanas selectas, en el cual se encuentra enmarcado el presente

trabajo. El proyecto pretende integrar los parámetros de eficacia preclínica, inocuidad y calidad de varias especies medicinales, incluyendo *Hofmeisteria schaffneri*, una planta ampliamente utilizada en el Valle de México para tratar padecimientos gastrointestinales y que constituye el eje central de este trabajo de investigación.

Nuestro grupo de trabajo ha publicado tres monografías científicas de plantas medicinales de México: *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate), *Hintonia latiflora* (Copalchi) e *Iostephane heterophylla* (Raíz del manso).

2.2. Antecedentes Etnobotánicos, Farmacológicos y Fitoquímicos de *Hofmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Asteraceae)

La familia Asteraceae, constituye un grupo de plantas distribuidas por todo el mundo y se conocen aproximadamente 25,000 especies. (Alvarenga *et al.*, 2001). En México, su distribución geográfica es alrededor de 380 géneros y 3,000 especies reconocidas (Heinrich *et al.*, 1998).

Debido a su amplia distribución en México esta familia es muy importante en las prácticas médicas tradicionales. De tal forma que el uso medicinal de muchas especies de la familia se encuentra documentado, tanto en el Códice Florentino compilado por Fray Bernardino de Sahagún, así como en el Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis realizado por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano.

Muchas otras especies endémicas han surgido como medicinales en épocas recientes, fruto de las investigaciones etnobotánicas del siglo pasado. Tal es el caso, de *Hoffmeisteria schaffneri* (A.Gray) King & Robinson (Bye y Linares, 2001, comunicación personal). La especie *H schaffneri* (Figura 1) se distribuye en los estados de Jalisco y San Luis Potosí y se cultiva ampliamente en el Centro del País, donde se conoce comúnmente como ámbar.

La planta es un arbusto que habita en ambientes húmedos y cálidos, crece en las grietas de las rocas, en filtraciones y salientes húmedas y la mayoría de las veces en las orillas de los arroyos, florece entre los meses de febrero y abril (Bye y Linares, 2006).



Figura 1. *Hofmeisteria schaffneri*

En la medicina popular de México, la planta se utiliza para el tratamiento de heridas y la infusión de sus hojas sola, o acompañada con toronjil (*Agastache mexicana*), se emplea como agua de uso contra padecimientos del tracto

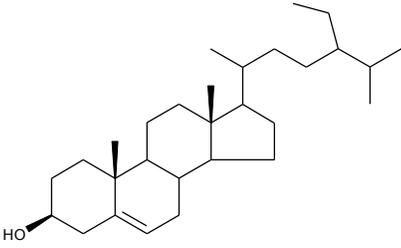
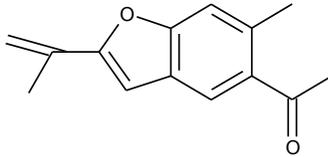
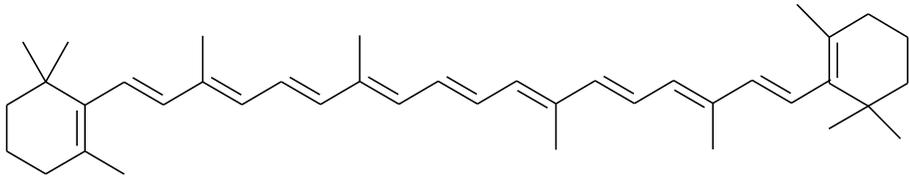
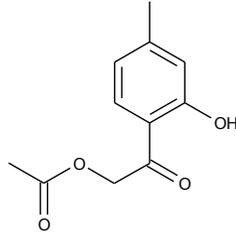
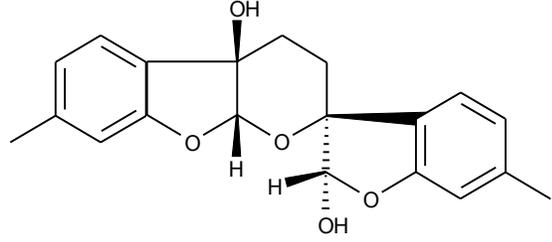
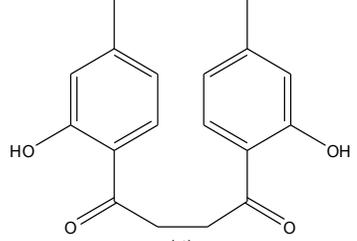
gastrointestinal como el vómito, la diarrea y el dolor de estómago (Mendoza-Castelán *et al.*, 1997; Bye y Linares, 2006).

Un estudio preliminar de un extracto fitotóxico preparado a partir de las partes aéreas de la planta permitió el aislamiento y la caracterización del β -sitosterol (**1**), el β -caroteno (**2**), la euparina (**3**), el acetato de 2-(2'-hidroxi-4'-metilfenil)-2-oxo-etilo (**4**) y el 3',4',4a',9a'-tetrahidro-6,7'-dimetilespiro [benzofuran-3(2H),2'-pirano[2,3-b] benzofurano]-2,4a'-diol (**5**) (Pérez-Vásquez *et al.*, 2005). (**Cuadro 1**). En ese estudio se estableció que los compuestos **4** y **5** poseen una notable actividad fitotóxica contra *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. En ese trabajo también se describió una síntesis formal del producto **4**.

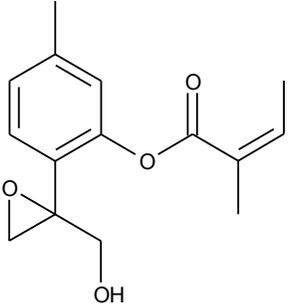
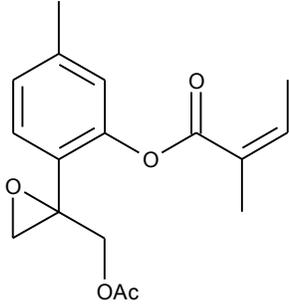
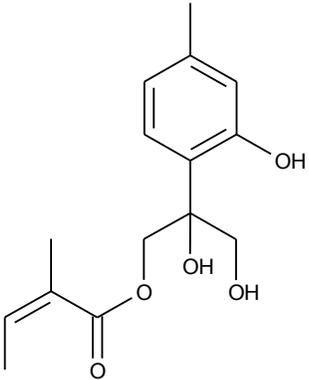
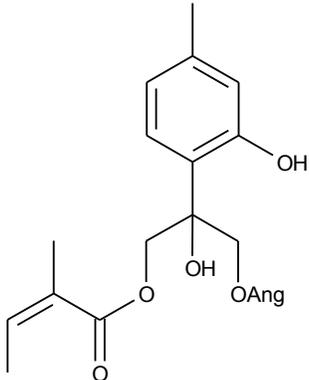
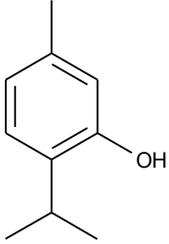
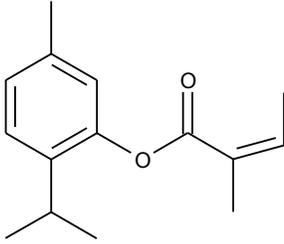
Posteriormente, Pérez-Vásquez *et al.*, 2008 describieron el aislamiento de ocho monoterpenoides (**Cuadro 2**). Los productos **6-10** se obtuvieron de la infusión de la planta en tanto que el **4** se obtuvo a partir de un extracto orgánico. Todos estos terpenoides presentaron propiedades fitotóxicas contra las malezas antes mencionadas.

Cabe mencionar que el género *Hofmeisteria* incluye 10 especies adicionales, *H. crassifolia*, *H. dissecta*, *H. fasciculata*, *H. filifolia*, *H. gentryi*, *H. laphamioides*, *H. pluriseta*, *H. sinaloenses*, *H. standleyi*, *H. urenifolia*.

Cuadro 1. Compuestos aislados de *H. shaffneri*.

 <p>(1)</p>	 <p>(3)</p>
 <p>(2)</p>	
 <p>(4)</p>	
 <p>(5)</p>	
 <p>(6)</p>	

Cuadro 2. Monoterpenos aislados de *H. schaffneri*.

 <p style="text-align: center;">(7)</p>	 <p style="text-align: center;">(8)</p>
 <p style="text-align: center;">(9)</p>	 <p style="text-align: center;">(10)</p>
 <p style="text-align: center;">(11)</p>	 <p style="text-align: center;">(12)</p>

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La especie vegetal *H. schaffneri*, se comercializa ampliamente en los mercados de San Luís Potosí y Valle de México para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (Castelán *et al.*, 1997; Bye y Linares, 2006) sin embargo, a la fecha no se cuenta con información científica, relacionada con su inocuidad y eficacia. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación, tiene por objetivo primordial, generar algunos parámetros de eficacia e inocuidad preclínicas y algunos criterios de calidad de la droga cruda derivada de *Hofmesiteria schaffneri*, con la finalidad de establecer su monografía tipo OMS que incidirá en el uso racional de esta especie medicinal.

Para el cumplimiento del objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer la toxicidad aguda, en ratones de acuerdo con el método de Lorke, de extractos preparados a partir de las partes aéreas de la planta en estudio con el propósito de comenzar los estudios de inocuidad.
2. Determinar el potencial antinociceptivo del extracto, la infusión, el aceite esencial y los compuestos puros utilizando los modelos de la placa caliente y el estiramiento abdominal, con la finalidad de corroborar de manera parcial la eficacia de esta planta en las prácticas médicas alternativas de México.

3. Iniciar los estudios, del mecanismo de acción antinociceptivo de los compuestos, que resultasen activos en las evaluaciones biológicas.
4. Establecer la eficacia, como agentes antiespasmódicos, de los extractos y el aceite esencial preparados a partir de las partes aéreas utilizando la prueba de tránsito intestinal.
5. Establecer el potencial antiprotozoario y antimicrobiano, de los extractos y aceite esencial derivados de la planta mediante pruebas de susceptibilidad contra los protozoos *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* y una batería de microorganismos Gram positivo y negativo.
6. Establecer los principios activos de la planta mediante la realización de estudios químicos y farmacológicos apropiados.
7. Determinar los compuestos marcadores de la especie y los perfiles cromatográficos de la infusión, aplicando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
8. Establecer una prueba de composición mediante la CLAR que permita cuantificar el contenido de principios activos y/o marcadores de la planta en estudio.

IV. HIPÓTESIS

Los usos populares de la especie *H. schaffneri* sugieren la presencia en la planta de principios antinociceptivos, espasmolíticos, antiprotozoarios y antibacterianos. La presencia del timo, con propiedades espasmolíticas y antibacterianas demostradas previamente refuerza algunos aspectos de la hipótesis planteada.

V. METAS

1. Difundir los resultados de la investigación, mediante la publicación de artículos en revistas de prestigio y la presentación de trabajos en foros nacionales e internacionales.
2. Integración de la información científica, generada en este proyecto y la existente, para la elaboración de las monografías tipo OMS y farmacopéicas de la especie, objeto de estudio.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Material Vegetal de *H. schaffneri* (A. Gray) King & Robinson (Asteraceae)

Las partes aéreas de *Hofmeisteria schaffneri* fueron recolectadas en distintas épocas y lugares. En el **Cuadro 3** se indican las diferentes colectas incluyendo el número de referencia (voucher) con el que se depositaron en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología.

Cuadro 3. Material vegetal.

Material Vegetal (Partes Aéreas)	Fecha, Lugar de Colecta y Cantidad	Clasificación Botánica	Número de Referencia
Extracto orgánico e Infusión	Noviembre 2002. San Luís Potosí. (4Kg)	Bye & Linares	31018
Aceite esencial I	Estado de México. Mayo de 2006 (1Kg)	E. Linares	2021
Aceite esencial II	Estado de México. Agosto de 2006 (1Kg)	E. Linares	1846
Aceite esencial III	Estado de México. Octubre de 2006 (1Kg)	E. Linares	1736
Aceite esencial IV	Estado de México. Enero de 2007 (1Kg)	Bye & Linares	34962
Infusión (Párametros de calidad)	Estado de México. Octubre de 2010 (1.5Kg)	Bye & Linares	2678

6.2. Preparación de Extractos y Aceite Esencial

6.2.1 Obtención del extracto orgánico

El extracto orgánico se obtuvo a partir de las partes aéreas desecadas (750 g) y maceradas con una mezcla de $\text{CH}_2\text{-Cl}_2\text{-MeOH}$ (1:1) durante 14 días a temperatura ambiente. Después de la filtración, el extracto se concentró *in vacuo* para obtener 172 g de un residuo de color verde (FHEUM, 2001).

6.2.2. Obtención del aceite esencial

El procedimiento para todos los lotes fue el siguiente: las partes aéreas secas del material vegetal (500 g), cortadas de manera manual se sometieron a un proceso de hidrodestilación durante 3 h utilizando un aparato tipo Clevenger. Al cabo de este tiempo, el residuo de la condensación (aceite esencial y agua) se separaron mediante extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 (2 L por 3). Después de destilar el disolvente, se obtuvieron 0.4 g de aceite esencial. El aceite fue almacenado a 4 °C (FHEUM, 2001).

6.2.3. Preparación del extracto acuoso

Las partes aéreas secas (900 g) se maceraron con agua hirviendo (25 L) durante 30 min. El extracto acuoso resultante se sometió a un proceso de reparto con CH₂Cl₂ (25 mL x 3). La fase orgánica resultante se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrado *in vacuo* para obtener un residuo café (3.43 g) (FHEUM, 2001).

6.3. Ensayos Biológicos.

6.3.1. Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa ICR (25-30g), obtenidos de Harlan México A.C. Los animales se mantuvieron a $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 70 - 80% y un ciclo de 12 h de luz/oscuridad. Todos los animales tuvieron un periodo de adaptación de 4 días antes del experimento y permanecieron 12 h sin alimento con acceso libre al agua (*ad libitum*) antes de la evaluación.

Los experimentos se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y a las recomendaciones realizadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para Pruebas Farmacológicas y Toxicológicas de la Facultad de Química, UNAM, coordinado

por el Comité Central de Ética para Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio, UNAM. Todos los animales fueron sacrificados en cámara de CO₂, excepto en la evaluación del efecto espasmolítico, en el cual se llevó a cabo mediante dislocación cervical después del experimento.

6.3.2. Toxicidad aguda

El experimento constó de dos fases de evaluación; en la primera fase el extracto se administró por vía oral a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg, dependiendo del número de muertes se seleccionaron las dosis para la segunda fase de acuerdo al método de Lorke (Lorke, 1983).

Antes de la administración de los extractos los animales fueron observados cuidadosamente para conocer su conducta normal. Para cada dosis se utilizaron tres animales, con un grupo control al cual sólo se le administró el vehículo. El parámetro a determinar es el número de muertes por cada dosis (Lorke, 1983).

Después de la administración, los ratones se observaron durante la primera hora. A todos los animales se les realizó la necropsia, con la finalidad de examinar de manera macroscópica la morfología general de los órganos como corazón, intestino, hígado, pulmón y riñón.

6.3.3. Evaluación del efecto antinociceptivo

El efecto antinociceptivo se evaluó en los modelos de estiramiento abdominal y en placa caliente ampliamente descritos (Williamson *et al.*, 1996).

6.3.3.1. Evaluación del efecto antinociceptivo: modelo de estiramiento abdominal

La prueba de nocicepción se realizó utilizando como sustancia nociva una solución de ácido acético (0.6 %) por vía intraperitoneal. La dipirona 100 mg/kg (DIP, control positivo), el vehículo (VEH) y el extracto orgánico (31.6, 100 y 316 mg/kg), se administraron por vía oral 30 minutos antes del estímulo algésico. Inmediatamente después de la administración del ácido acético, se contó el número de estiramientos que el tratamiento provocó en cada ratón, a intervalos de 5 min por un periodo de media hora (Williamson *et al.*, 1996).

6.3.3.2. Evaluación del efecto antinociceptivo: modelo de la placa caliente

Se utilizó una placa caliente Panlab a una temperatura constante de 55 °C. Los animales se colocaron en un cilindro de acrílico sobre la superficie caliente y se observó la respuesta (lamada de patas traseras, levantamiento de las patas traseras

o salto fuera del cilindro) al estímulo; el tiempo transcurrido entre la colocación de los ratones en la placa y la respuesta al estímulo se denomina latencia. El tiempo de corte fue de 30 seg, es decir, si los ratones no presentan la respuesta antes de 30 segundos, se retira el cilindro de la placa para evitarle una lesión. Los ratones se colocaron en el cilindro 30, 60, 90, 120 y 150 minutos después de la administración de los tratamientos (Williamson, 1996). La administración de morfina (3.16 y 5 mg/Kg, **MOR** vía intraperitoneal), vehículo (**VEH**), extractos (10 - 562 mg/Kg) y compuestos (0.1, 0.316, 1, 3.16 y 17.7 mg/Kg) bajo la forma de una suspensión con 2% tween 80 en solución salina se realizó por vía oral (p.o.).

6.3.4. Evaluación del efecto espasmolítico: modelo de tránsito intestinal

Los ratones se trataron por vía oral con los extractos, las esencias, los compuestos puros (1 - 31.6 mg/Kg) o los controles. Después de 15 minutos de la administración de los tratamientos a base de los preparados de la planta o controles (positivo y blanco), se administró, también por vía oral carbón activado (3% en suspensión de goma acacia al 5%); 20 minutos después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical con la finalidad de extraer y diseccionar el intestino delgado y así medir el porcentaje de avance del carbón (Williamson *et al.*, 1996; Astudillo *et al.*, 2004). Como control positivo se empleó atropina (**ATR**, 3.16 mg/Kg) y loperamida (**LOP**, 5.6 mg/Kg); el blanco consistió de una suspensión de Tween 80 (2 %) en solución salina (0.9 % de NaCl).

6.3.5. Evaluación del efecto antibacteriano y antifúngico: método de diluciones

El efecto antibacteriano se determinó contra una batería de bacterias tanto Gram + (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) como Gram - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*), así como la levadura *Candida albicans*, utilizando el método de microdilución (Schwalbe *et al.*, 2007; Chérigo *et al.*, 2009). Se evaluaron los extractos, esencias y compuestos puros a diferentes concentraciones (1024-2 µg/mL). Se emplearon placas de 96 pozos en las cuales se colocó medio de cultivo (Caldo Müller-Hinton con ajuste catiónico de 10 mg/L y 20 mg/L de Ca²⁺ y Mg²⁺ en el caso de bacterias y Medio RPMI-1640 con L-glutamina sin bicarbonato de sodio NaHCO₃, regulado con ácido morfolino propano sulfónico MOPS 0.164M, ajustado a un pH de 7 en el caso de la levadura) Como controles, se utilizaron la ampicilina para las bacterias y el fluconazol para la levadura.

Finalmente, se incubó a 37°C por 24h para bacterias y a 35°C por 48h para las levaduras; al cabo de este tiempo, se determinó visualmente si existe crecimiento o no de los microorganismos. Los resultados se expresan en concentración mínima inhibitoria (CMI).

6.3.6. Evaluación del efecto antiparasitario: ensayo de susceptibilidad

Entamoeba histolytica se cultivó en el medio TYI-S-33 suplementado con suero de bovino al 10% y *Giardia lamblia* se cultivó en medio TYI-S-33 suplementado con suero de ternera al 10%. Los parásitos empleados en los ensayos se encontraban en fase logarítmica de crecimiento. Se evaluaron los extractos, el aceite esencial y los compuestos puros a las concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL. Cada concentración se ensayó por triplicado. Los tubos con la muestra incorporada se inocularon con los parásitos apropiados de *E. histolytica* y *G. lamblia*. Las muestras se incubaron a 37°C durante 48 horas. Cada prueba incluyó metronidazol como control positivo y un blanco (medio de cultivo, DMSO y trofozoitos). Transcurrido el tiempo de la incubación, 50 µL de cada tubo se subcultivó en medio fresco y el número final de parásitos sobreviviente se determinó por cuenta directa al microscopio (Navarrete-Vázquez *et al.*, 2003; Calzada, 2006).

6.4. Pruebas Estadísticas

Se utilizó la prueba estadística ANADEVIA 95% (análisis de variancia), seguida de la prueba *post hoc* Dunnett ($P < 0.05$) (Tallarida y Leonard, 1979). En el experimento del efecto antinociceptivo, cada barra representa la media del ABC

(área bajo la curva, latencia de respuesta por minuto (segundos * minuto)) \pm e.e de n=6 animales; y en el experimento del efecto espasmolítico cada barra representa el % de avance de carbón activado ($[\text{longitud de avance de carbón activado en intestino delgado} / \text{longitud total de intestino delgado}] * 100$) \pm e.e de n=6 animales.

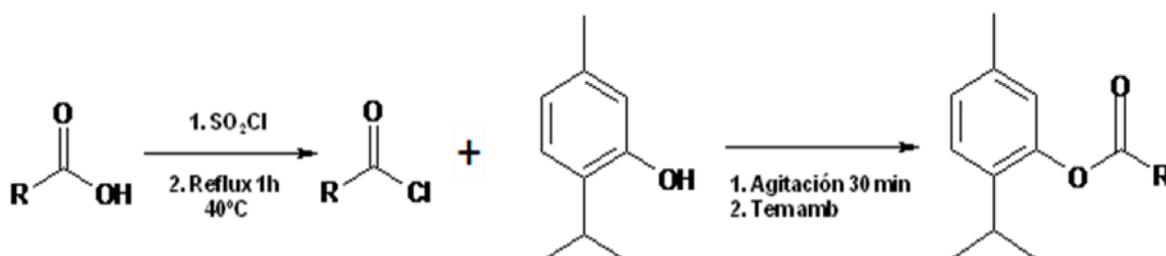
6.5. Síntesis de Derivados del Timol

Cloruro de tionilo (2.5 mL; 0.034 mol) fue agregado gota a gota a una solución del ácido carboxílico correspondiente (0.002 mol) en CH_2Cl_2 (1 mL) que se encontraba en agitación. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1 h. En todos los casos, el exceso de cloruro de tionilo fue destilado y el producto resultante se utilizó para preparar los ésteres.

6.5.2. Preparación de ésteres de timol

A una mezcla en agitación de timol (0.5 g; 0.003 mol) y NaOH aq 10 % (4.5 mL), se agregó gota a gota el cloruro de ácido previamente obtenido. En cada caso, la mezcla de reacción se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Cada mezcla de reacción se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) mediante un proceso de reparto. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró *in vacuo*; el producto crudo se purificó utilizando cromatografía en columna abierta [gel de sílice, Hexano - AcOEt (98:2)] (**Cuadro 4**). El compuesto **23** se obtuvo como un

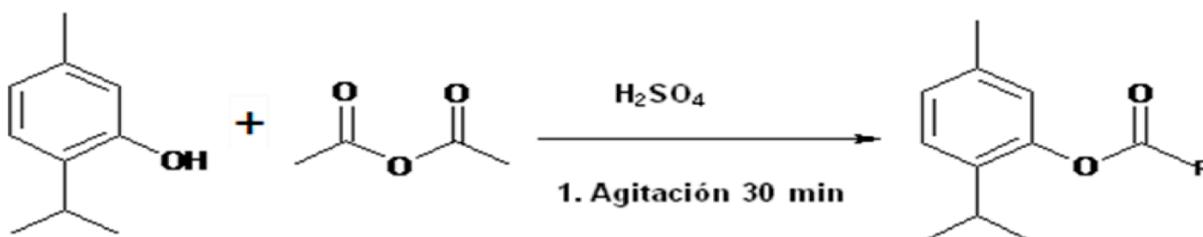
aceite incoloro con un rendimiento de 72%. Los otros compuestos sintetizados **13-22** y **24-25**, se obtuvieron como aceites amarillos con los siguientes rendimientos: 46, 61, 50, 41, 48, 65, 41, 35, 62, 71, 45 y 52%, respectivamente. Las propiedades espectroscópicas de los compuestos **13-17**, **21**, **24** y **25** fueron idénticas a los descritos anteriormente (Mathela *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 1988; Paolini *et al.*, 2005, 2007; Schmitz *et al.*, 1979; Rice y Coats, 1994; Viana *et al.*, 1981; Ateeque *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 2008, respectivamente). Los compuestos **9**, **10**, **11** y **13** resultaron nuevas entidades químicas (ANEXO A).



6.5.3. Acetato de timilo (26).

En un matraz redondo de 50 mL, se mezclaron timol (0.5 g; 0.003 mol), anhídrido acético (1.5 mL; 0.015 mol) y ácido sulfúrico (0.1 mL; 0.001 mol); la mezcla se agitó durante 45 min. Al cabo de este tiempo, el producto se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró *in vacuo*. El residuo fue purificado por cromatografía en columna abierta [gel de sílice; Hexano- AcOEt (98:2)], para generar un aceite de color amarillo (72% de rendimiento) (**Cuadro 4**). Sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas

fueron idénticas a las previamente reportadas por Viana *et al.* (1981) y Ateeque *et al.* (2002) (ANEXO A).

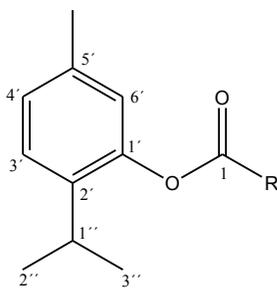


6.6. Estabilidad de Ésteres

La estabilidad de los ésteres frente a una estearasa (2 mg suspendidos en 10 mL de agua destilada) de hígado de cerdo se determinó utilizando el procedimiento descrito por Schlacher *et al.* (1998). La actividad enzimática fue cualitativamente corroborada con el monitoreo de la producción de 4-nitrofenol (amarillo), a partir del 4-nitrofenil acetato (4-NFA, incoloro) (Innocenti *et al.*, 2008). La solución stock, se preparó en fresco utilizando 4-NFA (0.1mM) y una mezcla de acetonitrilo-agua (1:99). Para el análisis, 10 μ L de buffer de acetatos (pH = 5) o buffer de fosfatos (pH = 7), 100 μ L (0.1 mM) del compuesto de prueba o control (4-NFA, 1 mM) y 10 μ L de enzima preparada, se adicionaron a tubos Eppendorf (Jewell *et al.*, 2007). Las mezclas de reacción resultantes se agitaron durante 1 h a 37 °C. En todos los casos, las pruebas se realizaron por triplicado, las cuales fueron inmediatamente analizadas utilizando cromatografía en capa fina [gel de sílice, Hexano - AcOEt (8:2)] para detectar la presencia de **11**. Para cada compuesto, el

procedimiento utilizando periodos de incubación de 4.5 y 24 h. Finalmente, este mismo experimento fue repetido utilizando plasma de ratón en lugar de esterasa de hígado de cerdo.

Cuadro 4. Esteres de timilo.



Compuesto	R	Compuesto	R
13		20	
14		21	
15		22	
16		23	
17		24	
18		25	
19		26	-CH ₃

6.7. Desarrollo y Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Angelato de 8,9-Epoxy-10-Acetoxitimilo (8) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

La validación del método analítico se realizó con base en los criterios establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos y Temas Relacionados (EURACHEM, 1998) y por la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C. (2002). El cromatógrafo utilizado fue un Waters 2487 con un detector dual y los resultados se analizaron con el programa de Waters. Los parámetros de validación se describen a continuación.

6.7.1. Especificidad

La especificidad del método analítico se realizó mediante el registro de los espectros de absorción, en el rango de longitudes de onda (λ) del ultravioleta (UV) de tres muestras diferentes: una correspondiente al estándar (1.25 mg/mL); la segunda, la matriz de trabajo (1 mg/mL), y la última, a la matriz de trabajo enriquecida con el estándar de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8). Esta última se preparó mezclando 50 μ L de matriz de trabajo y 50 μ L de la solución estándar de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8) a una concentración de 2.5 mg/mL.

6.7.2. Linealidad del sistema

Para evaluar la linealidad del sistema se construyó una curva de calibración de acuerdo al siguiente procedimiento: 5 mg de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8) se disolvieron en 2 mL de ACN (2.5 mg/mL). A partir de la solución anterior, se prepararon las disoluciones que contenían entre 0.0625 y 2.5 mg/mL del estándar a cuantificar. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico del estándar de seis réplicas, se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución.

El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se comparan con los siguientes criterios: ordenada al origen ($b_0 = 0$); pendiente ($b_1 \neq 0$); coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$); coeficiente de determinación ($r^2 \geq 0.98$) e Intervalo de Confianza (IC (β_1)) no incluye al cero) (**ANEXO B**). Las muestras se realizaron por sextuplicado.

6.7.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Para evaluar el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se preparó una curva de calibración con una serie de disoluciones a partir de una solución estándar con una concentración de 2.5 mg/mL. Las diluciones contenían entre 0.0625 y 0.25 mg/mL del estándar a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por

concentración y el área del pico (ABC) que corresponde al estándar de cada réplica se graficó con respecto a la concentración del estándar en cada solución. Para el cálculo de la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (b_1), coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2), se utilizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC se determinaron de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican en el **ANEXO B**.

6.7.4. Linealidad del método y exactitud

La linealidad del método y su exactitud se determinó construyendo una curva de calibración de la matriz de trabajo enriquecida con tres diferentes concentraciones del estándar de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**) (0.3125, 0.625 y 1.25 mg/mL). Se evaluaron tres réplicas por cada concentración para así tener los valores del ABC. Estos valores se interpolaron en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema. Los resultados obtenidos (concentración adicionada vs. concentración recuperada) fueron analizados mediante un análisis de regresión lineal simple para determinar sus parámetros estadísticos ($b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 3\%$). La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [$IC(\beta_1)$] del % de recobro (**ANEXO B**).

6.7.5. Precisión del método.

La repetibilidad se evaluó midiendo la respuesta analítica de seis réplicas de estándar de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**) a una concentración de 2.5 mg/mL y la matriz de trabajo con una concentración de 1 mg/mL.

La precisión intermedia se realizó mediante un análisis de seis réplicas de la matriz de trabajo enriquecida con estándar de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**) (0.625 mg/mL), este análisis lo efectuaron dos analistas en dos días distintos. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

6.7.6. Estabilidad

La estabilidad de la muestra se evaluó midiendo el % de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**) contenida en una solución preparada de estándar de **8** con una concentración aproximada de 1.25 mg/mL. Las condiciones de almacenaje fueron las temperaturas: 37°C, 25°C y - 4°C. En cada una de las condiciones se analizaron tres muestras cada una por duplicado. El primer día se obtuvieron los resultados del análisis inicial. A los siete días, se realizó un análisis de las muestras a las temperaturas anteriormente mencionadas. Por último a los quince días de analizaron todas las muestras almacenadas en las tres condiciones de temperatura.

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

6.8. Caracterización Anatómica de las Partes Aéreas

La caracterización anatómica de *Hofmeisteria schaffneri* se realizó en el Laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas Medicinales, Facultad de Ciencias de la UNAM a cargo del Dr. Guillermo Laguna Hernández y la Bióloga Griselda Sodelva Zarate Cruz.

6.8.1. Deshidratación, inclusión y cortes

La fijación de la especie vegetal (tallos y hojas) se realizó en fresco con FAA (formol, ácido acético y alcohol) y con glutaraldehído en buffer de fosfatos y postfijación en tetraóxido de osmio. Posteriormente, la deshidratación se llevó a cabo mediante concentraciones graduales de alcohol etílico (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%). El material se preincluyó en una mezcla de alcohol absoluto-xilol (1:1) de 20 a 30 minutos. Para finalizar en xilol puro por 20 minutos. Al cabo de este tiempo, se colocó la muestra en una mezcla de xilol-paraplast (1:1) durante 20-30 minutos; después, se incluyó en paraplast puro durante 24 horas en estufa a 65°C, para obtener los bloques de parafina. Finalmente, se obtuvieron láminas en

microtomo de rotación 9, 12 y 13 μm de grosor con diferentes ejes de corte: longitudinal (Lg), transversal (Tr) y radial (Rd).

6.8.2. Técnicas histoquímicas de tinción

Para realizar las distintas técnicas histoquímicas, se eliminó el paraplast de los cortes adheridos en los portaobjetos, esto se logró mediante calentamiento en una estufa (56-58°C) durante 20 minutos; posteriormente se hicieron tres cambios de xilol y se hidrataron en una serie etanólica (López-Curto et al., 2005).

Las técnicas histoquímicas que se realizaron fueron:

- Rojo "O" de aceite (Rj"O"), para identificar reservas lipídicas, cutina y suberina
- Azul negro de naftol (ANN), para identificar proteínas y polisacáridos insolubles
- Ácido peryódico-reactivo de Schiff (Sch), para identificar polisacáridos insolubles, almidón y hemicelulosa

Así como la tinción de:

- Cuádruple de Johansen (CJ), para identificar distintos elementos de la pared celular, así como citoplasma y otros componente celulares.

6.8.3. Análisis de las preparaciones histológicas

Las preparaciones obtenidas se analizaron mediante las técnicas de microscopía de campo claro y microscopía de contraste de fases con la finalidad de identificar y describir las características anatómicas y estructurales más distintivas de las hojas y tallo.

Una vez identificados los campos de mayor interés se tomaron fotomicrografías en el laboratorio de Estructura y Fisiología de Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias utilizando un microscopio confocal Carl Zeiss.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La investigación y la evaluación de plantas medicinales sin una larga historia de uso o que no se hayan investigado anteriormente, debe seguir pautas establecidas por la Organización Mundial de la Salud.

El objetivo de estas pautas es formular criterios básicos para la evaluación preclínica de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los preparados herbolarios, y en consecuencia, ayudar a los organismos nacionales reguladores y a las organizaciones científicas a evaluar la documentación, los informes y los expedientes que se les presentan respecto a dichos productos.

- La evaluación de la inocuidad se debe realizar mediante estudios toxicológicos, en la cual se establecen la especie animal, sexo, número de animales, vía de administración, frecuencia de dosis y el periodo de evaluación.

- En la evaluación de la eficacia, se especificarán los efectos farmacológicos de los preparados y de sus constituyentes. Las pruebas exigidas para respaldar su eficacia, se seleccionarán de acuerdo al uso tradicional medicinal; para ello evaluaciones *in vitro*, *in vivo*, *in situ* o *in silico* pueden ser seleccionadas.

- La evaluación de la calidad, se realizará utilizando métodos analíticos para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos marcadores; así como la determinación de residuos y contaminantes.

Los resultados que se presentan a continuación; se realizarón con base a las pautas establecidas por la OMS.

7.1. Pruebas de Toxicidad y Eficacia

7.1.1. Toxicidad aguda por el Método de Lorke

La determinación de la toxicidad aguda es una de las primeras pruebas que se realizan para determinar el potencial tóxico de una sustancia pura o de un extracto natural. Uno de los métodos más utilizados es el de Lorke (1983) que ofrece una serie de ventajas, incluyendo el hecho de que se emplean pocos animales durante el estudio y permite estimar de manera sencilla la toxicidad aguda.

El ensayo se realizó en dos fases. En la primera se determinó el efecto del extracto orgánico, la infusión y el aceite esencial a las dosis de 10, 100 y 1000 mg/Kg durante 14 días. Como se observa en el **Cuadro 5** los tratamientos no provocaron la muerte de los animales, anomalías externas o de los órganos internos de acuerdo a las observaciones macroscópicas. En la segunda fase del experimento, los ratones fueron tratados con dosis mayores (1600, 2900 y 5000 mg/Kg). De nueva cuenta, no se observaron decesos ni anomalías de los órganos internos en los grupos de animales tratados. Por lo tanto, la dosis letal media es mayor a 5000 mg/Kg, lo cual indica que tanto los extractos como el aceite esencial no son tóxicos para ratones hasta la dosis de 5000 mg/Kg (**Cuadro 5**).

Este hallazgo, aunado al uso de la planta por más de un siglo aproximadamente, garantiza a priori el consumo seguro de esta especie medicinal para los humanos.

Cuadro 5. Evaluación de la toxicidad aguda en ratones por le método de Lorke.

<i>H. schaffneri</i> Extracto Orgánico Aceite esencial Infusión	Fase I			Fase II			DE ₅₀ >5000 mg/Kg
	10	100	1000	1600	2900	5000	
	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	

7.1.2. Evaluación del potencial antinociceptivo de extractos y compuestos en los modelos de la placa caliente y estiramiento abdominal

La primera prueba de eficacia realizada en este estudio consistió en la determinación del potencial antinociceptivo utilizando los modelos de estiramiento abdominal y de la placa caliente en ratones (Williamson *et al.* 1996). El primer modelo mencionado es un modelo de dolor visceral de tipo inflamatorio que es ampliamente utilizado para determinar desórdenes de órganos internos como estómago o intestinos (Al-Chaer and Traub, 2002). Este método muestra una buena sensibilidad para analgésicos débiles, pero muestra poca especificidad porque los estiramientos pueden ser abatidos por relajantes de músculo liso por lo que puede ser mal interpretado. Este problema puede ser solucionarse utilizando otros modelos de nocicepción tales como la placa caliente. En la realización de pruebas preclínicas de agentes antinociceptivos se prefieren pruebas utilizando

estímulos térmicos (Arendt-Nielsen and Chen, 2003). Además, estos ensayos tienen buena sensibilidad y especificidad.

Para establecer el efecto antinociceptivo de la planta objeto de estudio en el modelo de placa caliente se evaluaron los extractos y el aceite esencial (Ángeles-López et al., 2010).

Los resultados de los ensayos en el modelo de estiramiento abdominal indicaron que dosis graduales del extracto orgánico (10-316 mg/Kg, *p.o.*) no disminuyen los estiramientos inducidos por el ácido acético en ratones. Con base en estos resultados no se consideró pertinente evaluar ni el aceite ni la infusión en este modelo experimental (**Figura 2**).

Con respecto al modelo en placa caliente, primero se ensayó el extracto orgánico a las dosis de 10, 31.6, 56.2, 100, 177 y 562 mg/Kg (*p.o.*). Como se observa en la **Figura 3**, a las dosis de 177 y 562 mg/Kg se produjo un retardo significativo ($P < 0.001$) en la respuesta debida al estímulo térmico; el efecto fue dependiente de la dosis.

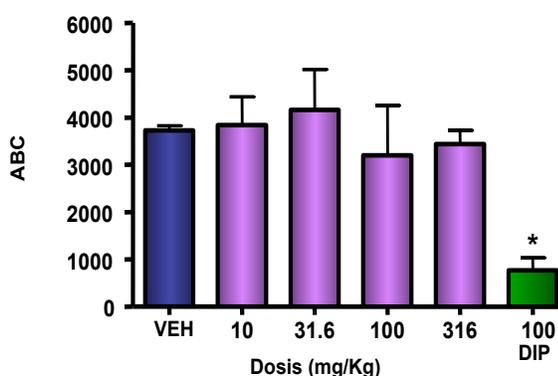


Figura 2. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *H. schaffneri* en el modelo de estiramiento abdominal. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba de Dunnet $*P < 0.05$.

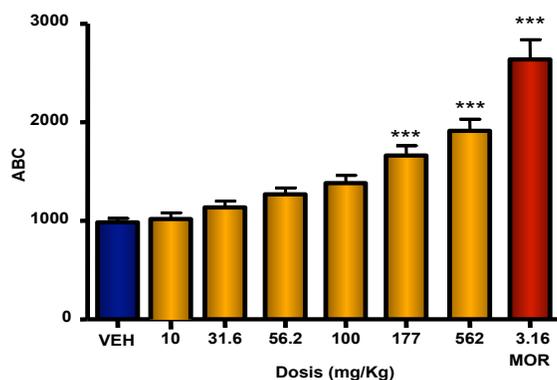


Figura 3. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba de Dunnet *** $P < 0.001$.

En los ensayos con el extracto acuoso, los ratones fueron tratados con 10, 56.2, 100, 177 y 316 mg/Kg (p.o.), y al igual que con el extracto orgánico los tratamientos incrementaron el período de latencia al estímulo térmico (**Figura 4**). El efecto del aceite esencial (1, 3.16, 17.7, 31.6 y 100 mg/Kg, p.o.) fue aún mejor en el rango de dosis de 1-17.7 mg/Kg (**Figura 5**) perdurando también hasta el final del experimento. A las dosis más altas el efecto fue menor; esta disminución de la respuesta farmacológica puede obedecer a varios factores incluyendo la hormesis y/o problemas de solubilidad

A continuación se procedió a evaluar los componentes mayoritarios del aceite esencial y la infusión (Pérez-Vásquez *et al.*, 2011) que incluyen al angelato de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (**8**), timol (**11**), hofmeisterina III (**12**), isovalerato de timilo (**13**) e isobutirato de timilo (**14**). Como los compuestos **13** y **14**, no se encontraban en cantidad suficiente para ser evaluados biológicamente, se sintetizaron mediante la condensación del timol con los cloruros ácidos

correspondientes. Los parámetros espectrométricos y espectroscópicos de **13** y **14** fueron idénticos a los descritos por Mathela y colaboradores (2008) (ANEXO B). Los compuestos **8**, **11** y **12** fueron aislados del material vegetal como se describió previamente por Pérez-Vásquez (Pérez-Vásquez *et al.*, 2008).

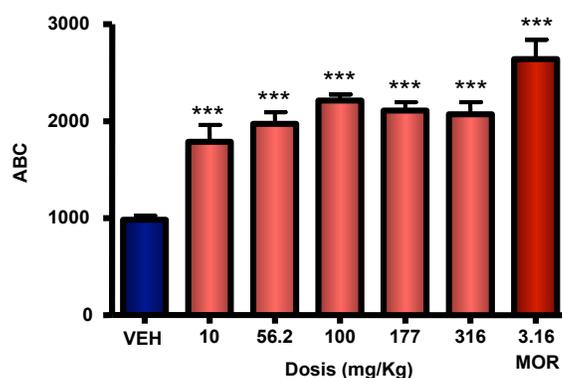


Figura 4. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet *** $P < 0.01$.

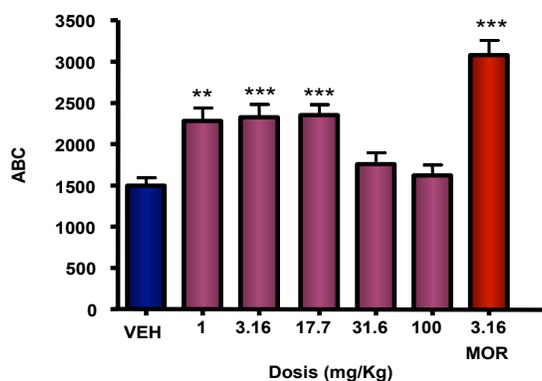


Figura 5. Efecto antinociceptivo del aceite esencial de *H. schaffneri* en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

El compuesto **8** no presentó actividad antinociceptiva a las dosis evaluadas (**Figura 6**); mientras que la hofmeisterina III (**12**) se evaluó a las dosis de 0.1, 0.316, 1, 3.16, 17.7 y 31.6 mg/Kg (p.o.). Como se observa en la **Figura 7**, su efecto fue significativo a las dosis de 0.316, 1, 3.16 y 17.7 mg/Kg. La acción duró hasta el final del experimento. Los compuestos **13** y **14** se ensayaron a las dosis de 0.316, 1 y 17.7 mg/Kg, p.o y como se observa en la **Figura 8A** el efecto antinociceptivo de **13** fue significativo con los tres tratamientos mientras que el de **14** (**Figura 8B**) fue importante a las dosis de 1 y 17.7 mg/Kg. Los tres compuestos (**12-14**) mayoritarios del aceite presentaron un efecto similar a la dosis de 1 mg/Kg al del aceite esencial (**Figura 9**).

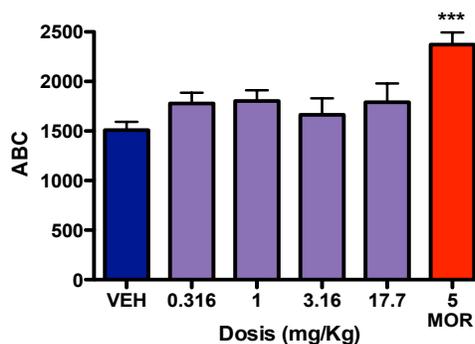


Figura 6. Actividad antinociceptiva del angelato del 8,9-epoxi-10-acetoxitímulo (**8**). Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba Dunnet *** $P < 0.01$.

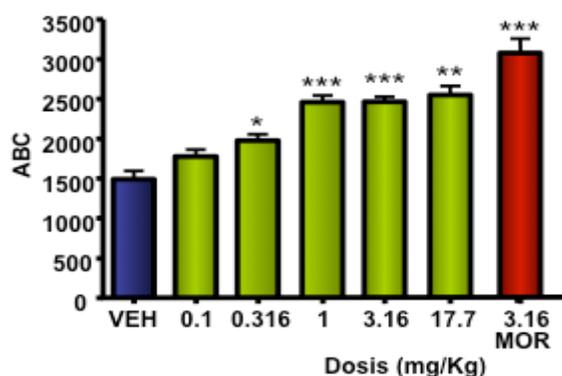


Figura 7. Efecto antinociceptivo de la hofmeisterina III (**12**) en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por un ANADEVIA seguido de la prueba de Dunnet * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

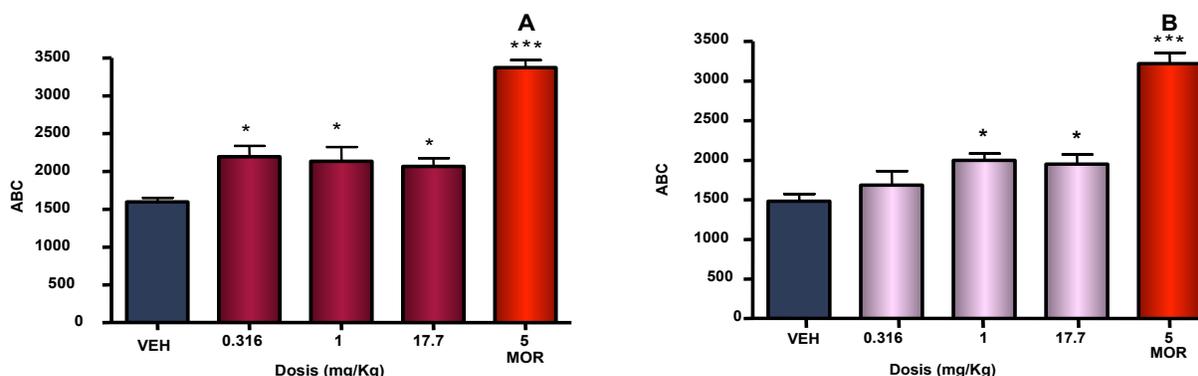


Figura 8. (A) Efecto antinociceptivo del isovalerato de timolo (**13**) e **(B)** isobutirato de timolo (**14**). Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

En cambio, el timol (**11**, 10, 56.2, 100, 316 y 562 mg/Kg p.o.), fue activo sólo a la dosis de 100 mg/Kg (**Figura 10**), sugiriendo que la presencia del residuo del ácido carboxílico confiere a **11** una mayor actividad antinociceptiva. Previamente, se demostró que el timol (**11**) bloquea los canales de sodio con una potencia comparable a la del anestésico local lidocaina (Haeseler., *et al.* 2002). Este efecto

podría estar relacionado con la moderada acción antinociceptiva demostrada para el producto en el presente estudio. Cabe mencionar, que esencias de especies de *Thymus* (Lamiaceae) ricas en timol (**11**) demostraron un efecto antinociceptivo importante en las pruebas de la formalina y placa caliente (Mahmoudi *et al.*, 2008).

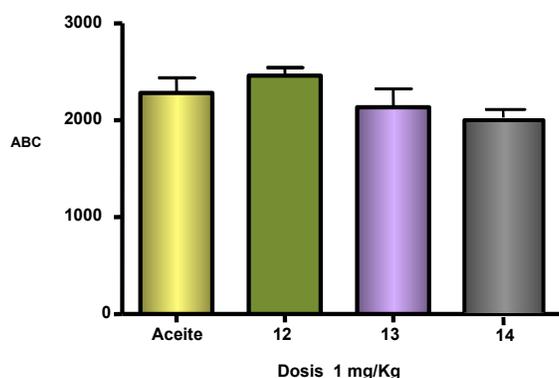


Figura 9. Comparación de la actividad antinociceptiva de **12** con los compuestos **13** y **14** a la dosis de 1mg/Kg en el modelo de placa caliente. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA.

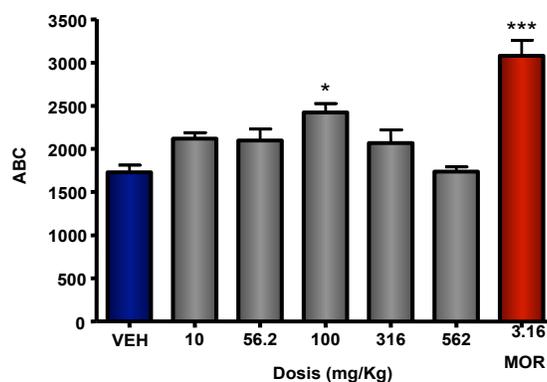


Figura 10. Efecto antinociceptivo del timol (**11**) en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de $n=6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba de Dunnet * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$.

Con la finalidad de establecer de manera preliminar el posible mecanismo de acción del producto **12** se realizó un conjunto de experimentos adicionales. Para ello

los animales fueron tratados inicialmente con naloxona (1 mg/Kg), un antagonista no selectivo de los receptores opioides, L-NAME (30 mg/Kg) un inhibidor de la oxido sintasa, o glibenclamida (10 mg/Kg), un bloqueador de canales de potasio. Quince minutos después del tratamiento con los antagonistas, se administró el producto **12** a la dosis de 1 mg/Kg; los resultados indicaron una disminución de la actividad del angelato de timilo (**12**) cuando se preadministró naloxona (**Figura 11**); ninguno de los otros 2 pretratamientos disminuyó el efecto de **12**. Esta observación permite concluir *a priori* que el efecto farmacológico del compuesto **12** esta mediado por receptores opioides. (Andrade *et al.*, 2007; ElHabazi *et al.*, 2006; Ojewole, 2005; Oweyele *et al.*, 2005). Es importante mencionar que los resultados del presente estudio no permiten descartar la participación de otros mecanismos de acción.

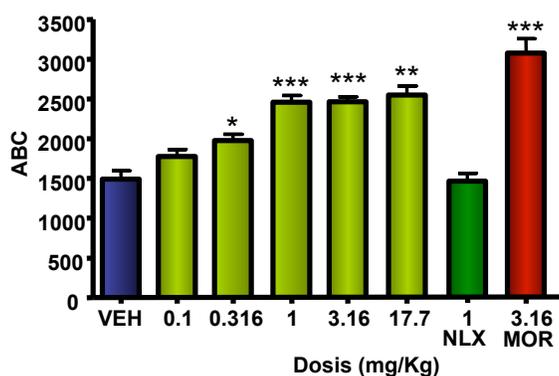


Figura 11. Efecto antinociceptivo de la hofmeisterina III (**12**), así como **12** (1mg/Kg) + naloxona (NLX, 1mg/Kg) en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e. e. de n=6 animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVa seguido de la prueba de Dunnet *P< 0.05, **P< 0.01 y ***P< 0.001.

7.1.3. Determinación del efecto antinociceptivo de los derivados de timol sintetizados

Debido a la importante actividad mostrada por los ésteres mayoritarios del aceite esencial, se decidió preparar una serie de análogos utilizando algunos ácidos carboxílicos y cloruros de ácido disponibles en el laboratorio. Esta actividad se realizó con la finalidad de analizar la variación de la actividad antinociceptiva en función de la naturaleza de la porción derivada del ácido carboxílico del éster. Por lo tanto, diez análogos del compuesto **12**, compuestos **15-26**, se prepararon condensando timol con el cloruro de ácido correspondiente. Los ésteres resultantes fueron evaluados en el mismo modelo de la placa caliente. Los compuestos **18, 19, 20 y 22** fueron nuevas entidades químicas, sin embargo, **15** (Paolini *et al.*, 2005), **16** (Schmitz *et al.*, 1979; Paolini *et al.*, 2007), **17** (Rice and Coats, 1994; Ateeque *et al.*, 2002), **21 y 23** (Viana *et al.*, 1981; Ateeque *et al.*, 2002), **24** (Sheng *et al.*, 2002), **25** (Kumar *et al.*, 2008) y **26** (Viana *et al.*, 1981; Ateeque *et al.*, 2002) eran conocidos, ya sea como productos naturales o sintéticos. Los compuestos **18-20 y 22** fueron identificados por métodos espectroscópicos. En todos los casos en el IR se observó bandas para el carbonilo del éster fenólico a 1760 cm^{-1} . Los espectros de RMN (**Cuadro 6**) fueron muy similares a los otros ésteres de timol, los cuales presentan en la región aromática un sistema ABX correspondiente al anillo aromático trisustituido (**ANEXO B**). Los espectros de RMN únicamente diferían en las señales de los residuos de ácido, los cuales fueron asignados como derivados de

los ácidos tíglico, 2-metil valérico, 3-metil valérico, 4-metil valérico y hexánico, respectivamente (Mathela *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 1988; Paolini *et al.*, 2005, 2007; Schmitz *et al.*, 1979; Rice and Coats, 1994; Viana *et al.*, 1981; Ateeque *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 2008).

Cuadro 6. Datos de los espectros de RMN ^1H (300 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de los productos **18-20** y **22** (CDCl_3).

Compuestos								
	18		19		20		22	
Carbon	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	175.6	-	171.7	-	172.4	-	172.7
2	2.73 m	39.8	2 α 2.35 dd (15.2, 8), 2 β 2.6 dd (14.8, 6)	41.1	2.59 m	32.2	2.5 t (7.6)	34.6
2-CH ₃	1.32 d (7.2)	36.0	-	-	-	-	-	-
3	1.52 m	20.7	1.38 m	31.7	1.68 m	33.5	1.78 m	24.9
3-CH ₃	-	-	1.17 d	19	-	-	-	-
4	1.45 m	17.3	4 α 1.45 m 4 β 1.35 m	29.1	1.71 m	27.4	1.38 m	31.5
4- CH ₃	-	-	-	-	0.98 d (7.2)	21.9	-	-
5	0.98 t (7.2)	14.2	0.97 t (7.4)	10.9	0.98 d (7.2)	21.9	1.38 m	22.5
6	-	-	-	-	-	-	0.92 t (7.2)	14.1
1'	-	148.2	-	147.6	-	147.6	-	148.1
2'	-	137.2	-	136.7	-	136.7	-	137.2
3'	7.19 d (8)	126.4	7.18 d (8)	126.0	7.19 d (8)	126.0	7.17 d (8)	126.5
4'	7.01 da (8)	127.1	7.0 da (8)	126.7	7.0 da (8)	126.7	7.0 da (8)	127.2
5'	-	136.6	-	136.2	-	136.18	-	136.7
6'	6.77 d (0.8)	122.8	6.78 d (0.8)	122.4	6.79 d (0.8)	122.4	6.78 d (0.8)	122.9
5'- CH ₃	2.30 s	21.0	2.30 s	20.5	2.31 s	20.5	2.30 s	21.0
1''	2.97 h (6.8)	27.1	2.97 h (6.8)	26.7	2.95 h (6.8)	26.7	2.95 h (6.8)	27.2
2''	1.19 d (6.8)	23.1	1.20 d (6.8)	22.7	1.18 d (6.8)	22.7	1.17 d (6.8)	23.2
3''	1.19 d (6.8)	23.1	1.20 d (6.8)	22.7	1.18 d (6.8)	22.7	1.17 d (6.8)	23.2

Se realizó la evaluación de todos los análogos (**13-26**) a tres dosis diferentes en un rango de 1-17.7 mg/Kg; los resultados revelaron que sólo los compuestos **22**, **24** y **26** fueron activos. En las **Figura 12A, 12B y 12C** observamos que el efecto antinociceptivo de los compuestos **22**, **24** y **26** fue significativo a la dosis de 1 mg/Kg. Estos resultados indican que la naturaleza de la cadena derivada del éster no muestra una clara relación con el efecto antinociceptivo.

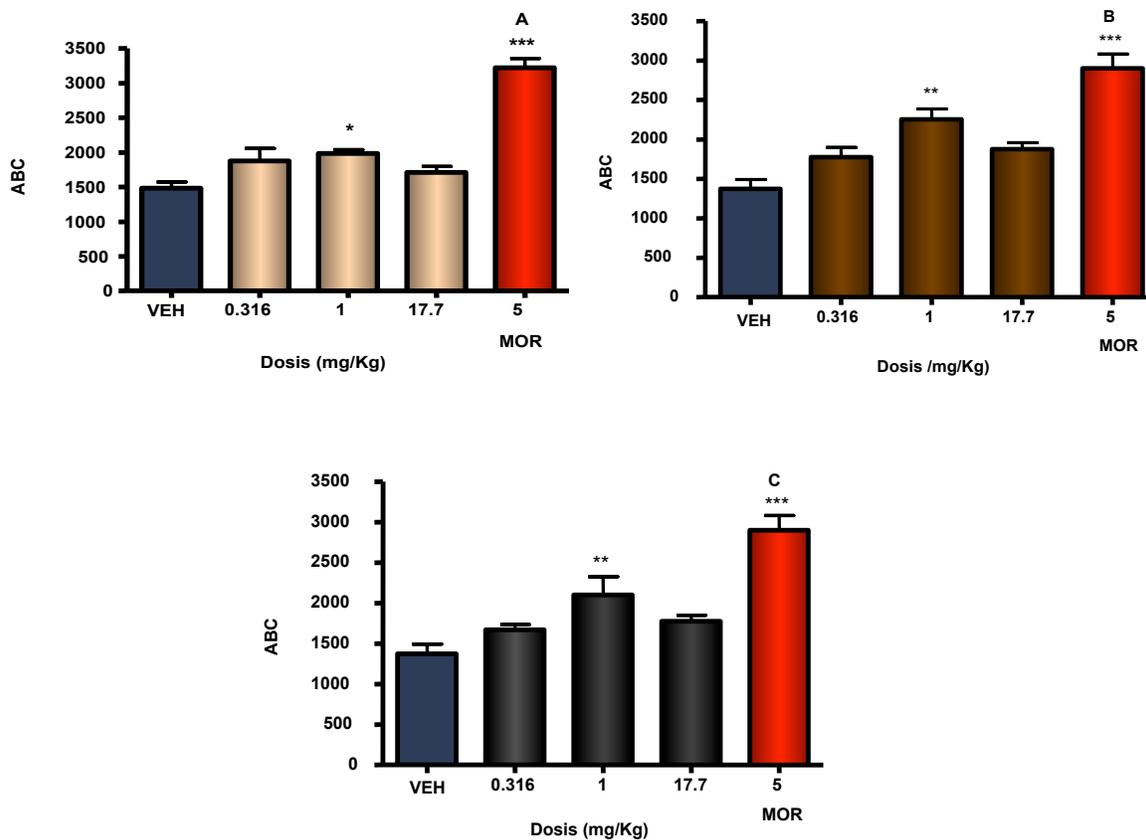


Figura 12. Efecto antinociceptivo del (A) hexanoato de timolo (22), (B) valerato de timolo (24) y (C) acetato de timolo (26) en el modelo de placa caliente. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

7.1.4. Determinación del efecto antinociceptivo del ácido isovalérico

Para establecer si la porción de derivada del ácido carboxílico era la responsable de la actividad antinociceptiva de los ésteres de timol activos, se decidió evaluar el ácido isovalérico (porción ácida del isovalerato de timolo). En la **Figura 13** se observa que el ácido isovalérico no presenta una actividad

antinociceptiva estadísticamente significativa como en el caso del timol; por lo tanto se puede concluir que se requiere la integridad del éster para una mejor actividad. Estos resultados sin embargo, no explican la diferencia de actividad entre los distintos ésteres. Por lo tanto, se decidió evaluar cualitativamente la estabilidad de algunos de los ésteres (activos *vs* no activos) en presencia de una esterasa aislada de hígado de cerdo. Todo ello considerando que la degradación de fármacos cuya estructura posee un enlace éster en matrices biológicas es principalmente debida a la hidrólisis mediada por esterasas; de esta forma se establecería *in vitro* si la diferencia de actividad de los productos se debe a una diferencia de estabilidad metabólica debido a una degradación diferencial por parte de las esterasas.

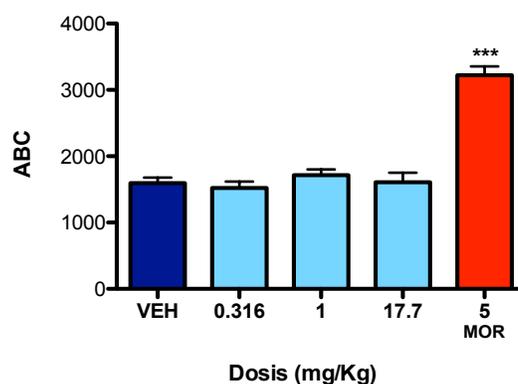


Figura 13. Efecto antinociceptivo del ácido isovalérico en el modelo de la placa caliente. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet *** $P < 0.001$.

La estabilidad *in vitro* de los ésteres de timolo más activos (12-14) y uno inactivo (15) fue analizada durante 24h. El estudio de estabilidad fue realizado de

manera cualitativa, registrando la susceptibilidad de la hidrólisis del éster (**12-15**) en presencia de una solución de esterasa comercial de hígado de cerdo en dos buffers (pH 7.4 y 5), y en plasma de ratón a 37 °C. La hidrólisis de los ésteres fue monitoreada en un periodo de 24h mediante cromatografía en capa fina.

De acuerdo a los resultados resumidos en el **Cuadro 7**, en general, los compuestos fueron inestables en plasma de ratón, sólo el compuesto **12** fue estable durante la primera hora del experimento. En presencia de la enzima el tiempo de degradación fue diferente para cada compuesto. Así, el compuesto **12** fue estable en las soluciones control (pH 5 y 7.4) a lo largo del experimento; sin embargo, fue totalmente hidrolizado en la solución enzimática (pH 7.4) y de plasma de ratón después de 4.5h. Por otra parte, a pH 5 este compuesto fue parcialmente hidrolizado después de 24 h. Estos resultados sugieren que el compuesto **12** podría tener una estabilidad aceptable en el tracto gastrointestinal.

El compuesto **14** fue estable en una solución buffer a pH 5 pero parcialmente hidrolizado a pH 7.4 después de 4.5 h; en plasma de ratón y soluciones enzimáticas, este compuesto fue totalmente hidrolizado a 1 y 4.5 h, respectivamente. Por lo tanto se esperaría una estabilidad gastrointestinal similar a la del compuesto **12**. Finalmente, los ésteres **13** y **15** fueron completamente hidrolizados en todas las condiciones evaluadas; con estos resultados se plantea la posibilidad de que estos compuestos pueden ser hidrolizados antes de la absorción intestinal.

En general, los resultados indican que la mejor actividad antinociceptiva observada en los compuestos evaluados **12** y **14** puede deberse parcialmente a que presentan una mejor estabilidad. Sin embargo, en el caso de **13** otros factores pueden estar involucrados, tales como una mejor absorción *in vivo* no consideradas en este experimento. Por este motivo se encuentra en proceso la determinación de la farmacocinética de estos ésteres en experimentos *in vivo*.

Cuadro 7. Estabilidad *in vitro* de esteres derivados del timol utilizando esterases de hígado de cerdo.

Compuestos	pH 7.4						pH 5						Plasma de Ratón					
	1 h		4.5 h		24 h		1 h		4.5 h		24 h		1 h		4.5 h		24 h	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
12	-	-	++	-	++	-	-	-	+	-	++	-	+	-	++	-	++	-
13	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
14	+	-	++	+	++	+	-	-	+	-	++	-	++	-	++	-	++	+
15	++	-	++	-	++	++	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
4PNA	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-

A: Esterasa o plasma de ratón; B: Buffer o agua destilada; h: Horas.
 -: No hidrolizado; +: Parcialmente hidrolizado; ++: Totalmente hidrolizado.

7.1.5. Determinación del efecto espasmolítico en extractos y aceite esencial.

La prueba del efecto espasmolítico se seleccionó como prueba de eficacia con base en el uso de la planta para el tratamiento de cólicos estomacales. Esta prueba consistió en la determinación del potencial espasmolítico utilizando el modelo de tránsito intestinal en ratones. Este modelo se ha utilizado ampliamente para la determinación del efecto gastrointestinal (Tan-No *et al.*, 2003; Astudillo *et al.*, 2004; Mittelstadt *et al.*, 2005 y Wang *et al.*, 2008) debido a que no requiere de equipo especializado para realizarse.

Inicialmente, se estableció el efecto espasmolítico de los extractos acuoso y orgánico así como del aceite esencial. En el caso del extracto orgánico, los animales se trataron con dosis de 10, 56.2, 100 y 316 mg/Kg (p.o). Como se observa en la **Figura 14**, el efecto espasmolítico del extracto fue significativo con los tratamientos desde 56.2 mg/Kg hasta 316 mg /Kg.

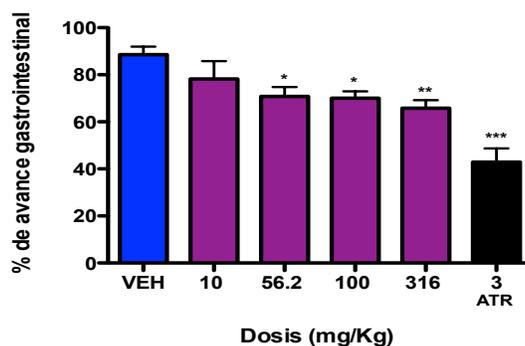


Figura 14. Efecto espasmolítico del extracto orgánico en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

En los ensayos con el extracto acuoso, los ratones fueron tratados con las dosis de 10 - 562 mg/Kg (p.o). Como se observa en la **Figura 15**, el extracto acuoso presenta actividad espasmolítica a partir de la dosis de 316 mg/Kg, siendo la dosis de 562 mg/Kg más activa que la atropina.

La evaluación del efecto espasmolítico del aceite esencial, se realizó a las mismas dosis que el extracto acuoso (p.o). El efecto del aceite esencial **Figura 16** fue significativo con los tratamientos a partir de 100 mg/Kg, siendo la dosis de 562 mg/Kg la más activa.

Los efectos de los extractos y el aceite esencial fueron dependientes de la dosis, sin embargo, el extracto acuoso fue menos activo con respecto al aceite

esencial y al extracto orgánico debido a que su actividad se presentó a partir de la dosis de 316 mg/Kg.

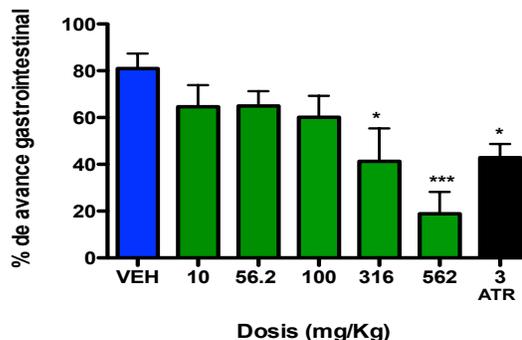


Figura 15. Efecto espasmolítico del extracto acuoso en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVa seguido de la prueba Dunnet $*P < 0.05$ y $***P < 0.01$.

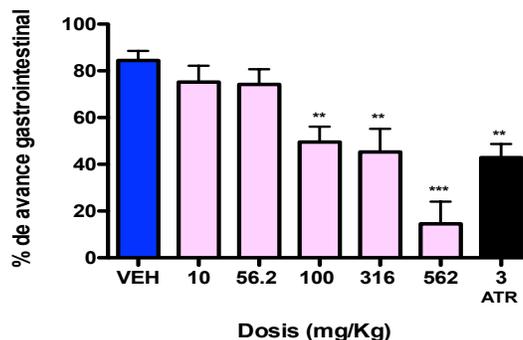


Figura 16. Efecto espasmolítico del aceite esencial en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVa seguido de la prueba Dunnet $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$.

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial, infusión y extracto orgánico fueron evaluados también mediante esta prueba. El éster **12** se evaluó a las dosis de 1, 17.7 y 31.6 mg/Kg (p.o). Como se observa en la **Figura 17**, su efecto fue significativo a partir de la dosis de 17.7 mg/Kg.

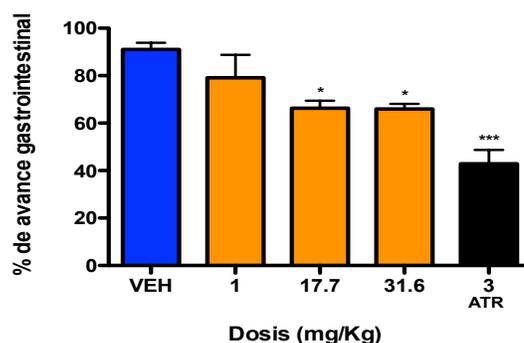


Figura 17. Efecto espasmolítico de la hofmeisterina III (**12**) en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$.

El timol (**11**) se evaluó a las dosis de 17.7, 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg (p.o) y su efecto fue significativo a partir de la dosis de 56.2 mg/Kg (**Figura 18**).

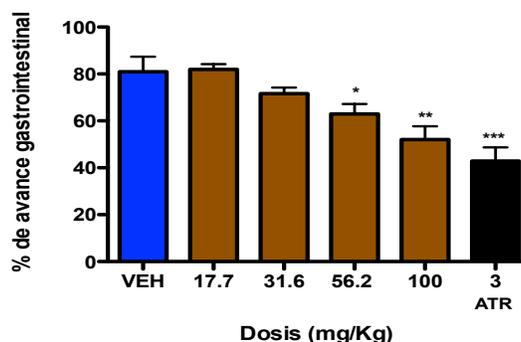


Figura 18. Efecto espasmolítico del timol (**11**) en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

El 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**) se evaluó a las dosis de 5.6 - 31.6 mg/Kg (p.o). Como se observa en la **Figura 19**, su efecto fue significativo a partir de la dosis de 31.6 mg/Kg.

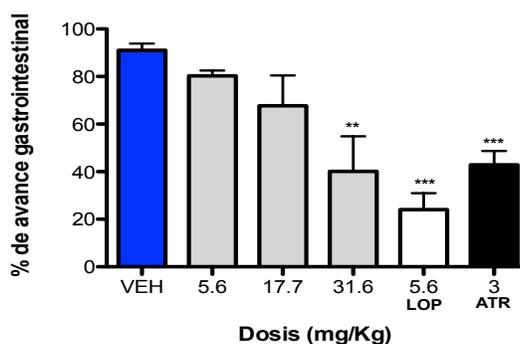


Figura 19. Efecto espasmolítico del 8,9-epoxi-10-acetoxitimo (8) en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

El isovalerato de timilo (13) se evaluó a las dosis de 5.6 - 31.6mg/Kg (p.o) pero fue únicamente significativo a las dosis de 5.6 y 17.7 mg/Kg (**Figura 20**).

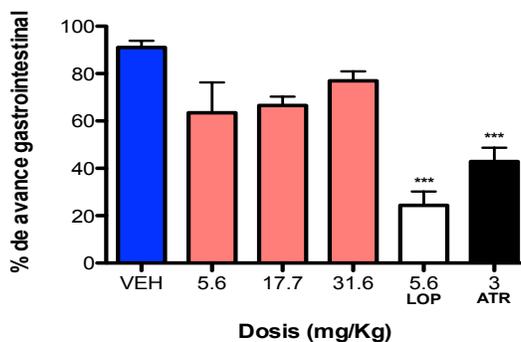


Figura 20. Efecto espasmolítico del isovalerato de timilo (13) en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVVA seguido de la prueba Dunnet *** $P < 0.001$.

El isobutirato de timilo (14) se evaluó a las dosis de 5.6 - 31.6 mg/Kg (p.o) (A) y fue únicamente activo a las dosis de 5.6 y 17.7 mg/Kg.

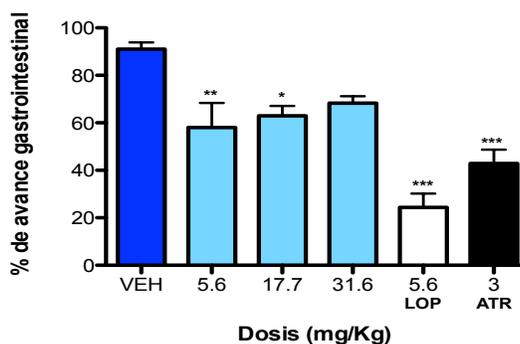


Figura 21. Efecto espasmolítico del isobutirato de timolo (**14**) en el modelo de tránsito intestinal. Cada barra es la media \pm e.e de $n = 6$ animales. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por ANADEVIA seguido de la prueba Dunnet * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Con base en los resultados recién descritos se puede concluir que el efecto espasmolítico de los distintos preparados se debe a los compuestos **8**, **13** y **14**; el primero se encuentra en la infusión, y los otros dos en el aceite esencial. Estudios previos realizados por Astudillo *et al.*, 2004, demuestran la actividad espasmolítica del timol en un modelo in vitro utilizando intestino de conejo; mientras que Beer *et al.*, 2007 proponen un posible mecanismo de acción agonista del timol sobre los receptores α_1 , α_2 , y β -adrenérgicos.

7.1.6.- Determinación del efecto antimicrobiano y antifúngico

Se determinó el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto orgánico y aceite esencial contra una batería de microorganismos Gram positivo (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi*) y una levadura (*Candida albicans*), utilizando el método de microdilución. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto orgánico es inactivo; mientras que el aceite esencial y la infusión (**Cuadro 8**) fueron

activas contra las bacterias *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y la levadura. En el **Cuadro 8**, se muestran los resultados obtenidos del análisis; en donde podemos observar que el compuesto **8**, mayoritario de la infusión y presente en todos los aceites evaluados, particularmente en los lotes IV y I, presentó una actividad mayor a la del timol (**11**) contra *S. aureus* y *B. subtilis*, y fue inactivo contra *C. albicans* (MIC >1024 µg/mL). Sin embargo, la hofmeisterina III (**12**), el componente mayoritario de los aceites y el extracto orgánico fue inactivo contra todos los microorganismos evaluados. El compuesto **13** presentó una buena actividad antibacteriana contra los dos microorganismos Gram +, sin embargo, al ser evaluado contra *C. albicans* se observó una baja actividad antifúngica. El compuesto **9** (MIC = 128 µg/mL), uno de los componentes de la infusión, también demostró una actividad antifúngica comparable a la del timol (**11**) (MIC = 192 µg/mL). Los otros compuestos evaluados no presentaron una actividad significativa.

Las bacterias Gram + evaluadas son las responsables de infecciones menores de piel; tales como barros, impétigo y absesos, así como de enfermedades que ponen en riesgo la salud tal como la neumonía, meningitis, endocarditis, bacteremia, sépsis, entre otras. Por otra parte, *S. aureus* es extremadamente prevalente en dermatitis atópicas y una de las bacterias que más ha mostrado resistencia a los antibióticos provocando un alto índice de mortalidad sobre todo en pacientes hospitalizados (Nyman *et al.*, 2011).

Estudios previos en la determinación del posible mecanismo de acción del timol cuando se evalúa contra *Bacillus cereus*, demostraron que interactúa con la bicapa fosfolipídica de la membrana; se asume que se alinea entre los ácidos grasos; esta distorsión en la estructura membranal puede causar una expansión y desestabilización de la membrana, incrementando su permeabilidad pasiva. En el caso de *S. aureus*, éste causa una fuga de iones fosfato causando la muerte de la bacteria (Burt, 2004).

Evaluaciones recientes de derivados del timol (Isobutirato de 8,9-epoxi-10-isobutiriloxitimilo, 8-hidroxi-9, 10-diisobutiloxitimol y 8,9,10-trihidoxitimol) aislados de *Inula hupehensis* demostraron que poseen actividad antibacterial contra *S. aureus* (Zhao et al., 2010).

Finalmente, *C. albicans* es la causante de infecciones vaginales y erupciones en la piel, por tan sólo mencionar algunas. Recientes investigaciones con terpenos, demuestran que inhiben la respiración del género *Candida*, sugiriendo efectos adversos sobre la mitocondria de la levadura (Braga et al., 2008). Por lo tanto, la actividad de los preparados y algunos compuestos sustenta, *in vitro*, el uso popular de la planta como un agente tópico anti-infeccioso.

Cuadro 8. Efecto antimicrobiano de extractos y esencia de *H. shaffneri*.

Aceite, extracto orgánico, infusión o compuestos	MIC (µg/mL)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25932)	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
I	96	256	192
II	192	256	512
III	192	512	512
IV	48	758	512
4	>1024	>1024	>1024
5	512	>1024	>1024
6	>1024	>1024	>1024
8	32	64	>1024
9	>1024	>1024	128
11	512	256	128
12	>1024	>1024	512
13	64	32	512
14	>1024	>1024	256
Infusión	64	64	128
Extracto Orgánico	>1024	>1024	1024
Ampicilina	<2	<2	-
Fluconazol	-	-	2

7.1.7.- Determinación del efecto antiprotozoario

Se determinó el efecto antiprotozoario del extracto orgánico, infusión y aceite esencial contra *G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*. Los resultados se presentan en el **Cuadro 9**.

Se observa que tanto los extractos como la esencia no presentaron una buena actividad con respecto al control (metronidazol) contra ninguno de los parásitos evaluados, por lo que esta planta no presenta actividad antiprotozoaria

Cuadro 9. Efecto antiprotozoario de extractos y esencia de *H. shaffneri*.

Aceite, extracto orgánico, infusión o compuestos	CI ₅₀ (µg/mL)		
	<i>Giardia lamblia</i> (IMSS:0989:1)	<i>Entamoeba histolytica</i> (HM1-IMSS)	<i>Trichomonas vaginalis</i> (GT3)
Extracto orgánico	175.02	147.45	235.82
Extracto acuoso	223.01	189.39	372.62
Aceite esencial (IV)	161.78	151.82	206.88
8	137.65	120.32	140.80
11	164.12	146.69	185.68
12	158.38	136.30	187.31
13	155.76	129.19	186.30
14	154.68	125.32	140.80
15	140.22	116.86	144.79
Metronidazol	208.80	59.90	39.96

7.2. Pruebas de Composición e Identidad

Como se indicó en la sección de antecedentes es de suma importancia determinar los parámetros de calidad de las drogas vegetales, para así garantizar que los productos consumidos por la población sean los adecuados para el alivio de sus problemas de salud. Por lo tanto, en la presente investigación, se desarrolló un método analítico para cuantificar uno de los componentes activos de la planta, presente en buena cantidad, tanto en la infusión como en la esencia y extracto orgánico de la planta. De manera adicional, se estableció un parámetro de identidad botánica de la droga cruda mediante su análisis microscópico de acuerdo a las técnicas convencionales.

7.2.1. Prueba de composición

Para el desarrollo de la prueba de composición se escogió un método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Este tipo de técnica es popular para el análisis de los productos herbolarios ya que es muy versátil, su manejo es relativamente sencillo y no está limitado por problemas de estabilidad térmica o volatilidad de los compuestos objeto de análisis; prácticamente todos los compuestos presentes en las distintas drogas crudas pueden ser analizados por CLAR. La aplicación de este método requiere el establecimiento de las mejores condiciones de análisis para detectar y cuantificar los principios activos y/o marcadores de interés. Afortunadamente, los detectores empleados en este tipo de

cromatografía son muy diversos haciendo aún más atractiva su aplicación. El desarrollo reciente de las técnicas acopladas facilita aún más este proceso de detección. Entonces, en primer lugar es necesario establecer el perfil cromatográfico de la matriz objeto de análisis; esta actividad a su vez implica la selección de la columna, fase móvil, método de detección, y velocidad de flujo, por señalar algunos. Las columnas de gel de sílice de fase reversa son las más utilizadas para las separaciones analíticas de las drogas crudas.

En este estudio, luego de ensayar simultáneamente numerosas columnas, fases móviles, y matrices de trabajo se determinó que la infusión de la planta constituía la mejor matriz de trabajo. Mejor aún, la resolución del perfil cromatográfico mejoraba notablemente si la infusión se sometía a un proceso de reparto por sextuplicado con CH_2Cl_2 . La fase orgánica resultante (**Figura 22**) se resolvió de manera adecuada mediante la aplicación de las condiciones cromatográficas siguientes: Precolumna Hibar; columna Licrospher 100 RP-18 ($5\mu\text{m}$) con un gradiente de elución de ACN: H_2O 45:55 de 0-7 min; 55: 45 de 7-12 min; 60: 40 de 12-17 min; 65: 35 de 17-22 y 70: 30 de 22-60 min; la longitud de onda de detección fue de 227 nm; temperatura ambiente; flujo 0.6 mL/min, volumen de inyección 20 μL y un tiempo de elución 35 min.

Como se aprecia en el cromatograma de la **Figura 22**, son dos los picos preponderantes en el cromatograma. De éstos, el de tiempo de retención 27 minutos, identificado como el compuesto 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (**8**), aislado

previamente de la planta (Pérez-Vazquez et al., 2007) y con propiedades antisépticas comprobadas (Pérez-Vazquez et al., 2011), presentó las características de estabilidad requeridas para su selección como compuesto marcador. El otro pico de tiempo de retención 17 minutos corresponde al 8,9-epoxy-10-hidroxitimilo y aunque se encuentra en mayor proporción, químicamente el compuesto es menos estable, ya que al cabo de varios días (siete en promedio) parte del producto se degradaba.

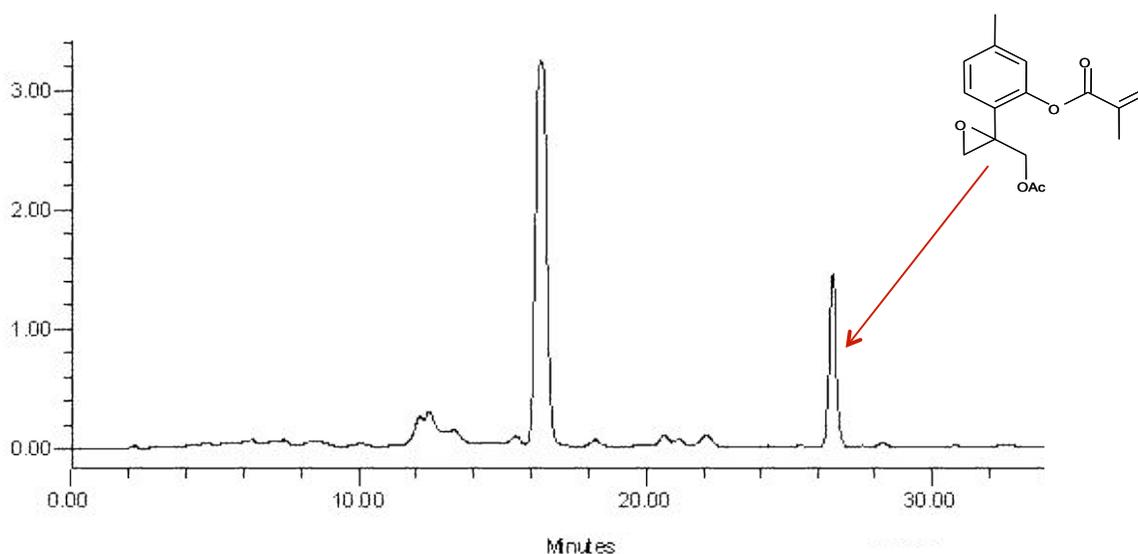


Figura 22. Cromatograma de la infusión de *H. schaffneri*.

Un vez que se seleccionó el producto **8** como idóneo para el desarrollo de la prueba de composición, se ajustó experimentalmente la concentración de trabajo para obtener una respuesta analítica (área bajo la curva) del detector en un rango menor a 0.1 unidades de absorbancia. Después se ajustó la señal correspondiente a **8** y se procedió a la validación del método analítico de acuerdo a las Guías de Validación publicadas por la FDA (ICH, 2005). En el presente estudio, los

parámetros de calidad evaluados para validar el método analítico incluyen: selectividad, linealidad, precisión y exactitud, Los resultados obtenidos para cada parámetro de calidad evaluado se resumen a continuación.

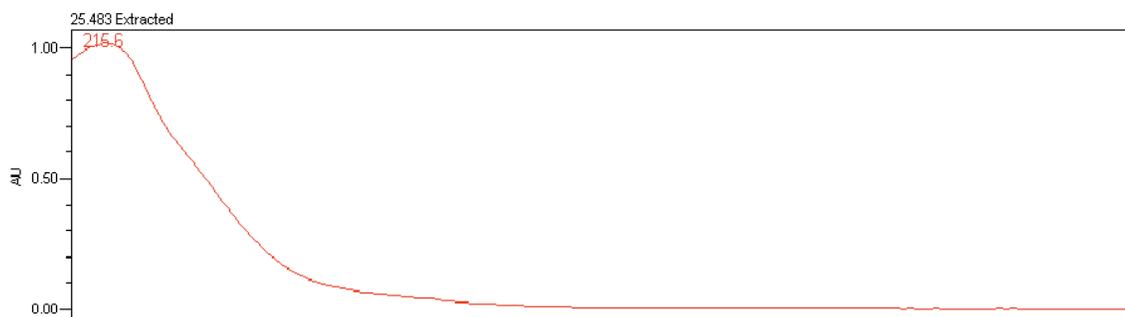
7.2.1.1. Selectividad

Un método es selectivo cuando la respuesta analítica que se genera a través de su aplicación se relaciona únicamente con el analito de interés y no con otros componentes presentes en una muestra de análisis (ICH, 2005). La selectividad se estableció al comparar los espectros de absorción obtenidos al UV (210-300 nm) de tres muestras correspondientes de **8** a una concentración de [1.25 mg/mL] (**a**), a la matriz de trabajo [1 mg/mL] (**b**) y la matriz de trabajo enriquecida con **8** [0.625 mg/mL] (**c**) (**Figura 23**).

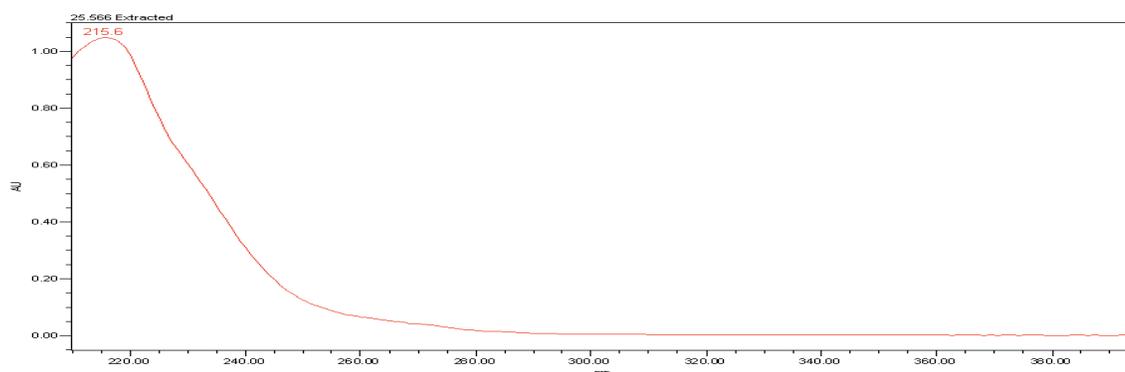
7.2.1.2. Linealidad del sistema

Se dice que el sistema es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (WHO, 2007). La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración con cinco diferentes niveles de concentración (0.0625 a 1.25 mg/mL). Los resultados de estos experimentos se resumen en el **Cuadro 10** y **Figura 24**.

a) Solución de referencia



b) Matriz de trabajo



c) Matriz de trabajo enriquecida con la solución de referencia

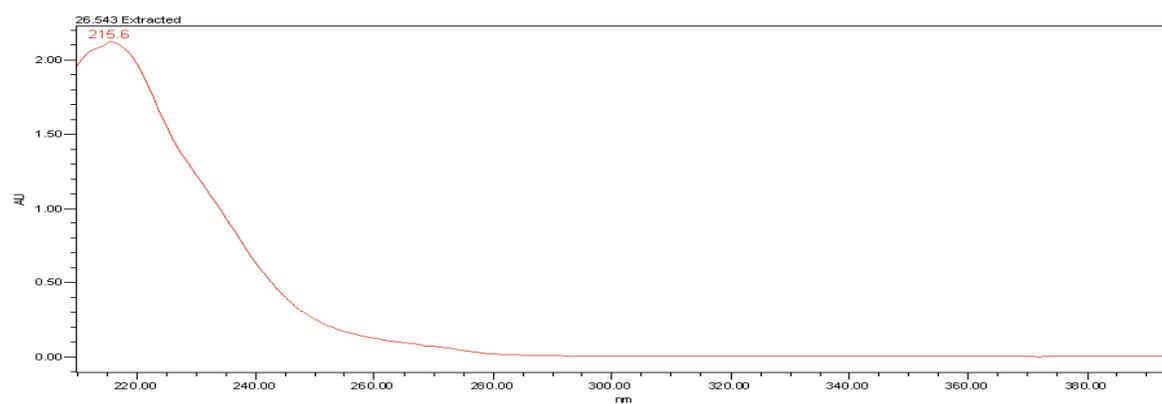


Figura 23. Espectros de absorción al UV de la a) solución de referencia, b) matriz de trabajo y c) matriz de trabajo enriquecida con solución de referencia. Detector PDA 996. Fase móvil: gradiente ACN:H₂O; velocidad de flujo: 0.6 mL/min; fase estacionaria: columna LiChrospher® 100RP-18.

Cuadro 10. Resultados experimentales de la curva de calibración de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8) para evaluar la linealidad del sistema.

Réplica	Concentración (mg/mL)	ABC
1	1.25	63261621
2	1.25	67770615
3	1.25	68026984
4	1.25	69296863
5	1.25	71117711
6	1.25	71162404
1	0.5	27168579
2	0.5	30934452
3	0.5	34057333
4	0.5	31940598
5	0.5	37878553
6	0.5	31305779
1	0.25	14814479
2	0.25	17210654
3	0.25	17877151
4	0.25	17924888
5	0.25	19819378
6	0.25	15945797
1	0.125	8300933
2	0.125	8744012
3	0.125	8902390
4	0.125	10476862
5	0.125	11726177
6	0.125	8795602
1	0.0625	4576585
2	0.0625	4337273
3	0.0625	4348111
4	0.0625	4971844
5	0.0625	5300151
6	0.0625	4136262

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (**Figura 24**). Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del sistema a partir de este análisis fueron: pendiente de la recta (b_1 : 5.3×10^7), ordenada al origen (b_0 : 3.2×10^6), coeficiente de correlación (r : 0.997), coeficiente de determinación (r^2 : 0.995) e intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$: $4.6 \times 10^7 - 5.95 \times 10^7$) con $t_{0.075, 28} = 2.048$

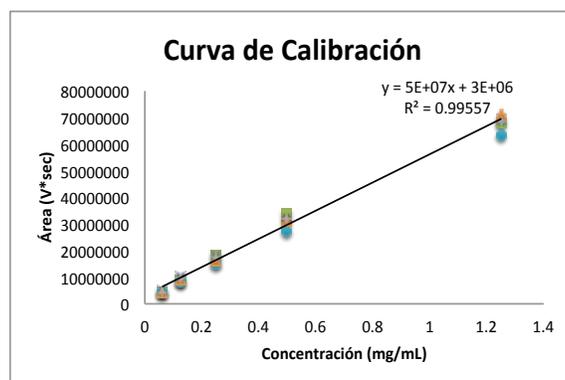


Figura 24. Gráfica de la evaluación de la linealidad del sistema de 8,9-epoxi-10-acetoxitimilo (8).

El método analítico desarrollado es lineal en el rango de concentraciones analizadas, ya que cumple con los criterios de aceptación especificados en la guía de validación ICH Q2 (R1) (2005). Así, la magnitud del coeficiente de determinación (r^2) fue mayor de 0.98 y el intervalo de la pendiente ($IC(\beta_1)$), no incluyó al cero.

Posteriormente, el análisis de varianza (ANADEVA) de la regresión lineal simple para $n=30$ y $\alpha=0.05\%$, muestra un valor para el estadístico F de Fisher de $(F_{0.05,1,4}) 756.9$ que supera el valor crítico de $F_{0.05,1,4} = 7.71$ de tablas con lo que se concluye que el modelo estadístico establecido mediante el análisis de regresión lineal es adecuado.

7.2.1.3. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables (WHO 2007). Ambos límites (LD y LC) se determinaron a partir de una curva de calibración con tres niveles de concentraciones comprendidas entre un rango de 0.0625 y 0.25 mg/mL.

Así, utilizando las fórmulas indicadas del ANEXO B, los valores de límite de detección y límite de cuantificación fueron 0.06 y 0.19 mg/mL respectivamente.

7.2.2.4. Linealidad del método y exactitud

Se dice que un método lineal es cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito adicionado en la muestra de objeto de análisis (WHO 2007). La linealidad del método se evaluó a partir de la curva de calibración construida a partir de disoluciones de la matriz de trabajo enriquecidas con una muestra estándar del compuesto 8. Las cantidades de estándar que se adicionaron a la matriz fueron mg/mL de, que representaban el porcentaje del analito. En el **Cuadro 11** se muestran los resultados.

Cuadro 11. Resultados experimentales de la curva de calibración de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8) para evaluar la linealidad del método y la exactitud.

Solución	Cantidad adicionada (mg/mL)	Área (μV^*s)	Cantidad recuperada (mg/mL)	% Recobro
1	1.25	69596076	1.252	100.2
2	1.25	69860688	1.257	100.6
3	1.25	70360704	1.266	101.3
4	1.25	70784703	1.274	102.0
1	0.625	35997635	0.618	99.0
2	0.625	36103240	0.620	99.3
3	0.625	36180519	0.621	99.5
4	0.625	36591223	0.629	100.8
1	0.3125	19576492	0.308	98.8
2	0.3125	19832834	0.313	100.3
3	0.3125	20114087	0.318	102
4	0.3125	20124207	0.318	102

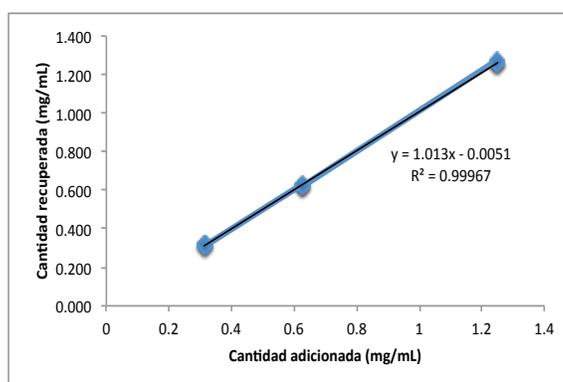


Figura 25. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método y exactitud de 8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8).

El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple (**Figura 25**). Los parámetros estadísticos calculados para evaluar la linealidad del método fueron: pendiente de la recta (b_1 : 1.013), ordenada al origen (b_0 : -0.0051), coeficiente de correlación (r : 0.999), coeficiente de determinación (r^2 : 0.999), intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$: 0.8923–1.134) e intervalo

de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$: $-0.1048 - 0.09377$), ambos con $t_{0.975, 10} = 2.228$ y coeficiente de variación de la regresión ($CV_{y/x} = 0.47$).

El método desarrollado es lineal pues los resultados de la regresión lineal simple cumplen con los criterios de aceptación ($b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $r \geq 0.99$; $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 3\%$

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida obtenida experimentalmente y el valor de referencia (cantidad utilizada para enriquecer la matriz) (WHO, 2007). Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro. Estos resultados indican que el promedio del porcentaje de recobro se encuentra dentro del rango establecido para un método cromatográfico (98-102%). Por lo tanto, el método analítico es exacto en el rango de concentraciones ensayadas.

7.2.2.5. *Precisión del método*

La precisión de un sistema o método analítico se refiere a la concordancia entre las respuestas analíticas individuales que resulten 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 exprese como desviación estándar o coeficiente de variación. En el presente trabajo, la precisión fue determinada en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad es la media de la precisión bajo las mismas condiciones de análisis, evaluada por un sólo analista y durante un intervalo corto de tiempo. La precisión intermedia expresa las variaciones de la respuesta analítica debido a las diferencias de analista, equipos o días de análisis (WHO, 2007).

La repetibilidad se evaluó a través de la respuesta analítica de seis soluciones con una concentración aproximada de 8 de 1.25 mg/mL. **Cuadro 12.**

Los parámetros estadísticos evaluados en este análisis fueron: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV).

El coeficiente de variación calculado para este análisis fue de 0.66% (criterio de aceptación, $CV \leq 3\%$) con lo que se concluye que el método analítico es preciso (EURACHEM, 1998)

La precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de seis muestras independientes (0.625 mg/mL) en dos días y por dos analistas diferentes. Los resultados estadísticos obtenidos: promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) nos permitieron concluir que el método es preciso (criterio de aceptación $CV \leq 2\%$).

Cuadro 12. Resultados experimentales para evaluar la precisión (repetibilidad/precisión intermedia).

Solución	Concentración (mg/mL)	Día 1	Concentración (mg/mL)	Día 2/analista 1	Día 3/ analista 2
		Área(V*s)		Área(V*s)	Área(V*s)
1	1.25	70724534	0.625	36453499	36226788
2	1.25	70001980	0.625	36987274	36914821
3	1.25	69737368	0.625	36838269	36054595
4	1.25	70304547	0.625	36995579	36332961
5	1.25	70039935	0.625	36116675	36097205
6	1.25	69373235	0.625	36144039	36611114
	Promedio	70030266.48	Promedio	36589222.5	36372914
	Desviación std	463812.5143	Desviación std	406326.2526	331871.639
	CV	0.66	CV	1.11	0.91

7.2.2.6. Estabilidad

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

La estabilidad de las muestras de análisis se evaluó bajo condiciones de refrigeración (-4 °C), a temperatura ambiente y a 37 °C. Los resultados son expresados como la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición de almacenaje, respecto de la media aritmética del análisis inicial (Idil). Una muestra se considera estable cuando el valor de Idil \leq 2%. Estos análisis se realizaron en un periodo de 7 días.

Los resultados obtenidos que se indican en el **Cuadro 13** y el análisis de los cromatogramas de cada una de las muestras ensayadas indican que con excepción

de la muestra de la solución estándar almacenada a 37 °C durante 7 días, todas las demás son estables al no presentar descomposición o degradación química del compuesto marcador. (**Cuadro 13**).

En resumen, con base en los resultados descritos anteriormente el método analítico para cuantificar **8** en la partición orgánica de *H. schaffneri* es lineal, preciso y exacto.

Cuadro 13. Resultados de la evaluación de estabilidad representados por Idil.

	Idil		
		7 días	Temperatura ambiente
	-4 °C	37 °C	
8,9-epoxy-10-acetoxitimilo (8)	0.71	2.6	1.3

7.3. Caracterización Anatómica de las Partes Aéreas

Los procesos cromatográficos (CCF, CLAE, CG) junto con las pruebas botánicas (macroscópicas y microscópicas) juegan un papel muy importante en la identificación y el control de calidad de las drogas crudas, en particular cuando estas se venden en mezclas. La prueba de identidad desarrollada en el presente trabajo fue la identificación microscópica de la droga cruda constituida por las partes aéreas de la planta. Se examinaron de forma separada las hojas y el tallo utilizando las técnicas de fijación y tinción que se describen en la sección experimental. Los resultados obtenidos se describen a continuación:

Hoja lobada, 2-pinatífida de bordes lisos, dorsiventral, anfiestomática con estomas anomocíticos con cavidad subestomática, presenta tricomas multicelulares

uniseriados y biseriados, glandulares (**Figura 26A**). En corte paradermal las células epidérmicas son grandes de forma irregular aplanadas (**Figura 26B**).

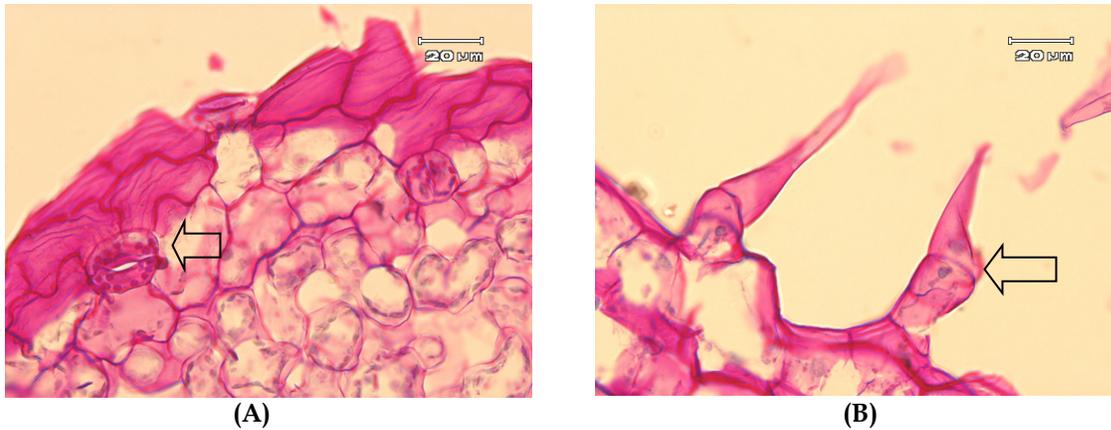


Figura 26. (A). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm de un estoma anomocítico (E). (B). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm, tricomas multicelulares uniseriados (Tr).

En corte transversal se observan las células epidérmicas de la cara adaxial, más grandes que las de la cara abaxial, todas con presencia de cloroplastos (**Figura 27A**). La pared celular de la cara periclinal (apical) de estas células es gruesa, constituida de celulosa, por su reacción con el reactivo de Schiff y verde rápido (**Figura 27B**).

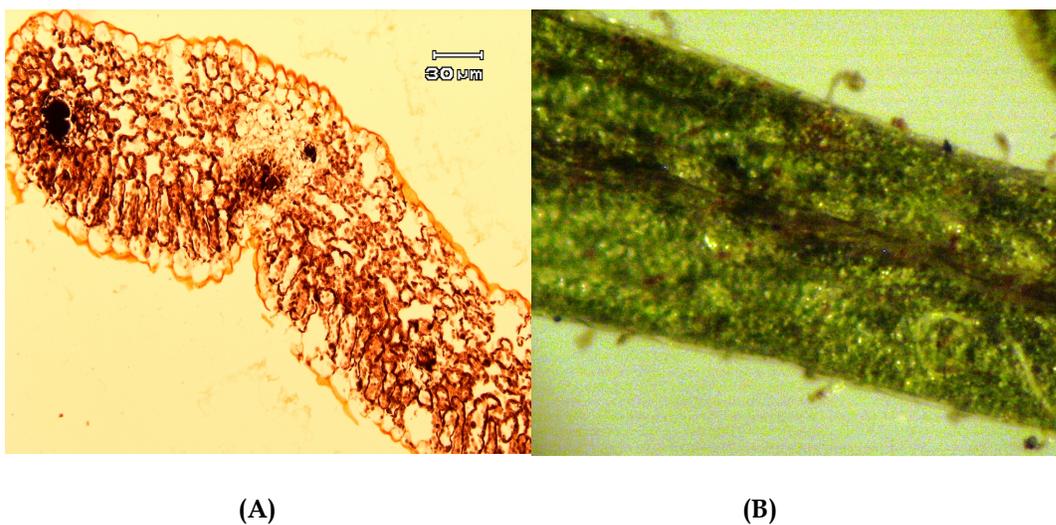


Figura 27. (A). Fotomicrografía de hoja Lg, Sch-ANN, 9 µm, dorsiventral, cámaras subestomáticas en cara abaxial y adaxial. (B). Fotomicrografía de hoja de tricomas glandulares(Tr).

En el mesófilo se observa una capa de parénquima en empalizada en la cara adaxial y parénquima esponjoso, en el cual se ubican cavidades secretoras, cercanas a los haces vasculares y con su eje mayor paralelo al haz vascular (**Figura 28 A**). Estas cavidades presentan una capa de células epiteliales, dentro de la cavidad se presenta un contenido de naturaleza lipídica por su reacción con tetraóxido de osmio y porque no reacciona con ninguno de los otros colorantes usados (**Figura 28 B**).

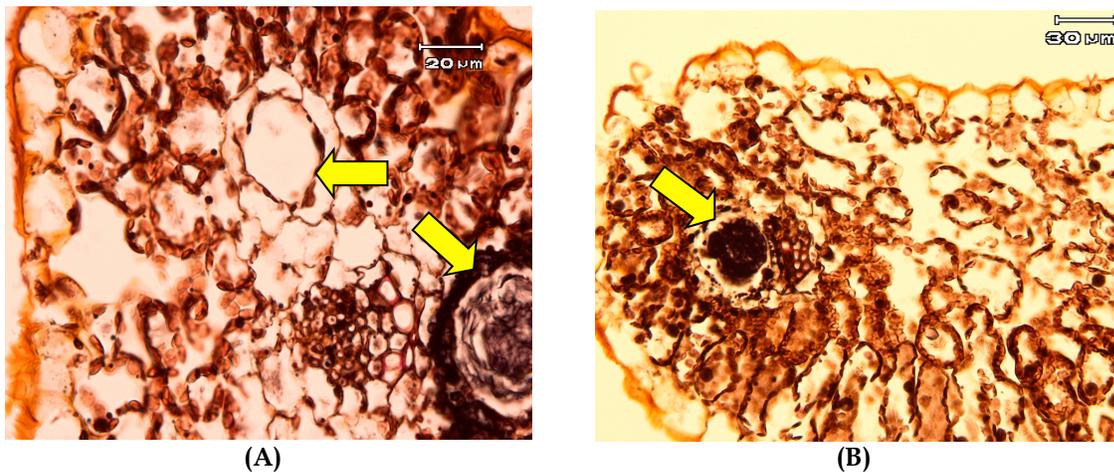
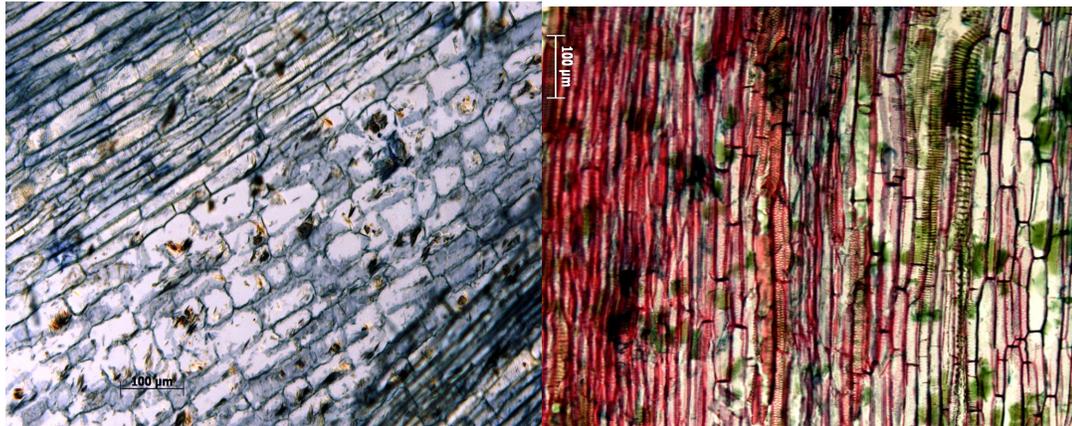


Figura 28. (A). Fotomicrografía de hoja Tr, CJ, 9 μm , cavidades secretoras cerca del haz vascular (CS). (B). Fotomicrografía de hoja Tr, CJ, 9 μm , cavidad secretora con contenido (CS).

En síntesis, las características distintivas de las hojas son sus cavidades secretoras y tricomas glandulares. El tallo contiene material ergástico de oxalato de calcio tipo estiloideo en células parenquimáticas de la médula (**Figura 29A**), alrededor de está se presentan elementos traqueales con paredes lignificadas por su reacción positiva a safranina (**Figura 29B**).



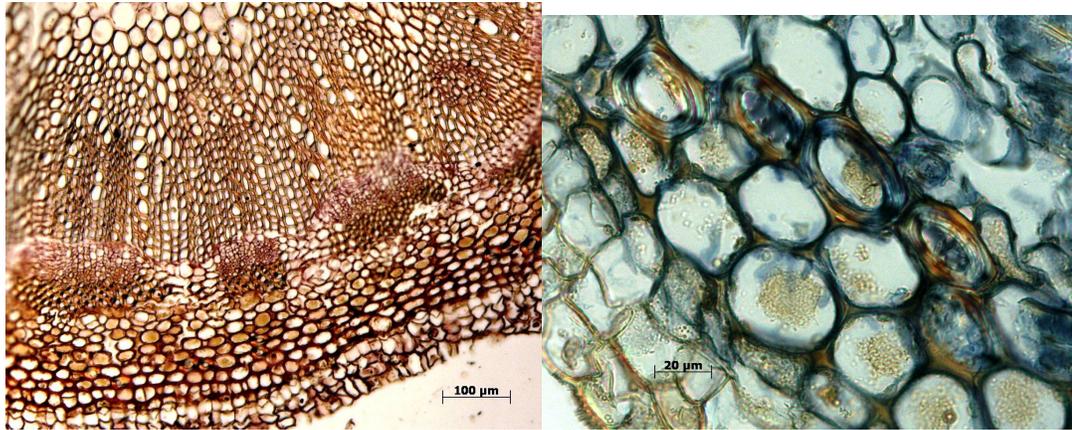
(A)

(B)

Figura 29. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, ANN, 13 µm, material ergástico (estilodeo) en médula. **(B).** Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 µm, elementos traqueales lignificados.

La organización vascular es colateral, el tejido floemático se encuentra hacia el interior y el xilema hacia el exterior (**Figura 30A**), cerca del córtex el cual presenta gran contenido de macroesclereidas (**Figura 30B**), el felema consiste de 3-5 capas celulares (**Figura 30C**).

En la organización longitudinal se presentan elementos traqueales con punteaduras alrededor de la médula (**Figura 31A**); células floemáticas anucleadas, de pared primaria. Los miembros de vaso presentan ornamentación helicoidal (**Figura 31B**); el felema está constituido por células rectangulares de paredes delgadas (**Figura 31C**).



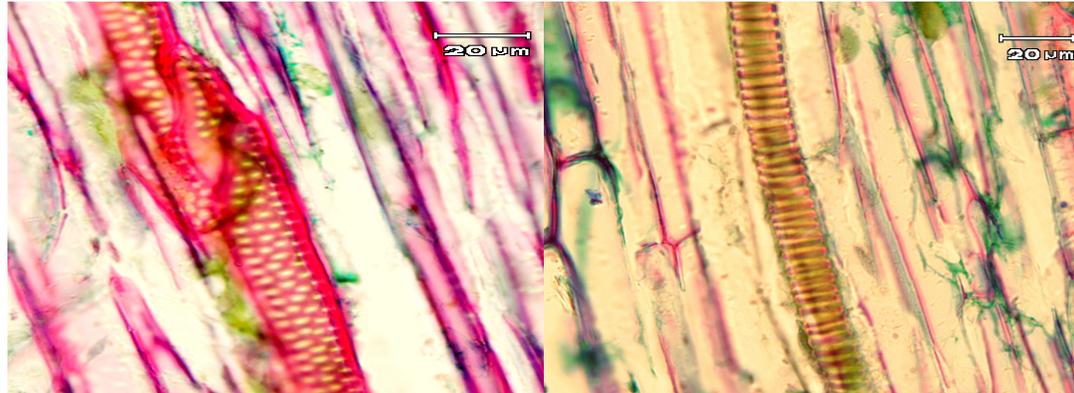
(A)

(B)



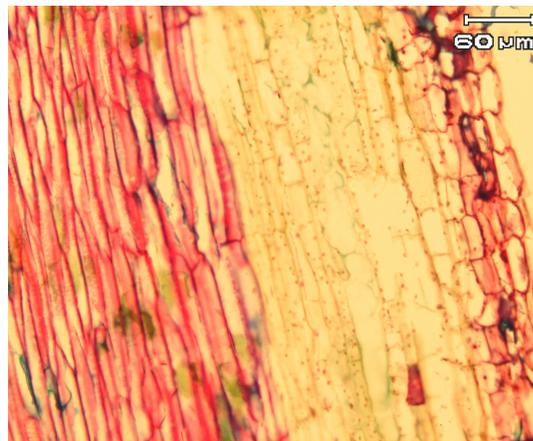
(C)

Figura 30. (A). Fotomicrografía de tallo Tr, Rj"O", 13 µm, haces vasculares colaterales. (B). Fotomicrografía de tallo Tr, ANN, 13 µm, macroesclereidas. (C). Fotomicrografía de tallo Lg, ANN, 13 µm, felema de 5 capas.



(A)

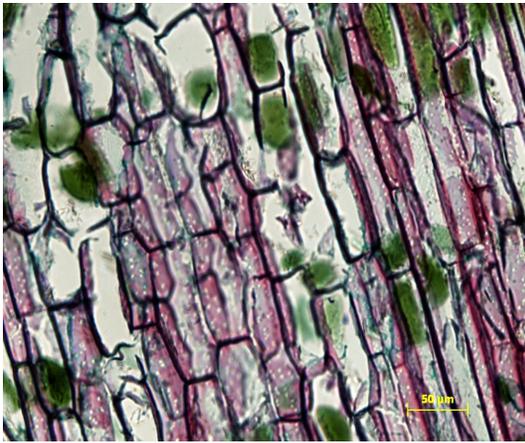
(B)



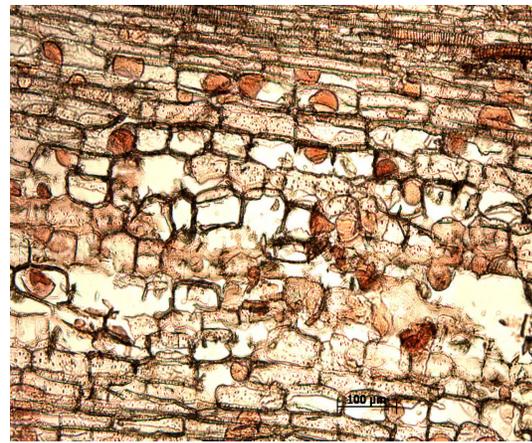
(C)

Figura 31. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , elementos traqueales lignificados con ornamentación puntuada. (B). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , elementos de vaso con ornamentación helicoidal (V). (C). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , felema.

Las células parenquimáticas de la médula presentan un contenido globular con fuerte reacción a rojo "O" y que con Cuádruple de Johansen se tiñe de verde, por lo que puede corresponder a glucolípidos (Figura 32A y 32B).



(A)



(B)

Figura 32. (A). Fotomicrografía de tallo Lg, CJ, 13 μm , contenido parenquimático glucolipídico. (B). Fotomicrografía de tallo Lg, Rj "O", 13 μm , células medulares con glucolípidos.

Las características distintivas encontradas para los tallos de *H. schaffneri* son: macroesclereidas del córtex y células parenquimáticas de la médula con cristales estiloideos y lípidos.

VIII. CONCLUSIONES

Los extractos (orgánico y acuoso) y el aceite esencial, resultaron ser seguros para roedores, hasta la dosis de 5 g/Kg en el ensayo de toxicidad aguda.

Los preparados a base de esta planta y algunos compuestos, al ser evaluados en el modelo de la placa caliente presentaron actividad antinociceptiva, siendo el aceite esencial más activo de los preparados y el derivado **12** el más activo entre los productos ensayados. Este producto es el mayoritario del aceite y su mecanismo de acción como antinociceptivo, se encuentra mediado por receptores opioides, ya que el pretratamiento de los animales con naloxona antagoniza su efecto farmacológico. La mejor actividad antinociceptiva, observada en **12** puede deberse parcialmente a que presenta una mejor estabilidad. Es importante recalcar que los compuestos **18, 19, 20** y **22** evaluados en el modelo de placa caliente, resultaron ser nuevas entidades químicas.

Las propiedades antinociceptivas demostradas para los esteres del timol en este trabajo, constituyen un aporte original para la farmacología de este tipo de productos.

Como la mayoría de los extractos y productos naturales, la evaluación de la actividad antimicrobiana de diferentes preparados y compuestos de *H. schaffneri* arrojó resultados solo contra bacterias Gram positivo. En el caso de los compuestos

evaluados únicamente **8** y **13** presentaron una actividad mayor, a la del timol (**11**) contra *S. aureus* y *B. subtilis*; mientras que el compuesto **9**, mostró una actividad antifúngica comparable a la del timol (**11**). Cabe señalar que *S. aureus* y *C. albicans* son algunos de los principales agentes causales de enfermedades de la piel.

La actividad espasmolítica, en el modelo de tránsito intestinal, demostró actividad en los preparados de extracto acuoso, aceite esencial y en el compuesto **8**. Sin embargo, cuando se realizó la evaluación antiprotozoaria, ninguno de los preparados, ni compuestos, resultaron activos contra los parásitos seleccionados. Por lo tanto, en la presente investigación se demostró la eficacia preclínica y seguridad de preparados y compuestos aislados de *H. schaffneri* de acuerdo al uso popular de la planta.

Por otra parte, fue posible establecer los parámetros de calidad, de la infusión y se desarrollo un método analítico, para cuantificar los principios activos presentes en la misma. Con el desarrollo de esta metodología, será posible contar con preparados estandarizados, a base de esta planta, además de facilitar control de calidad de la droga cruda.

Finalmente, la integración de la información científica, generada en este proyecto y la ya existente, permitirá la elaboración de las monografías tipo OMS y farmacopéicas de la especie objeto de estudio.

IX. BIBLIOGRAFÍA

A

- Al-Chaer, E. y Traub, R. 2005. Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain*. **96**. 221-225.
- Alvarenga, S., Ferreira, M., Emerenciano, V. y Cabrol-Bass, D. 2001. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometr Intell Lab*. **56**. 27-37.
- Andrade, S., Cardoso, L., Carvalho y Bastos, J. 2007. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J Ethnopharmacol*. **109**. 464-471.
- Ángeles-López, G., Pérez-Vásquez, A., Hernández-Luis, F., Déciga-Campos, M., Bye, R., Linares, E. y Mata R. 2010. Antinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*. *J Ethnopharmacol*. **131**. 425-432.
- Arendt-Nielsen, L y Chen, A. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptors in humans. 2003. *Neurophysiol clin*. **33**. 259-268.
- Ateeque, A., Aggarwal, K. y Suchil, K. 2002. Carbon-13 and proton NMR shift assignments of some thymol derivates. *Indian Perfumer*. **46**. 145-151.
- Astudillo, A., Hong, E., Bye, R y Navarrete, A. 2004. Antiespasmotic activity of Extracts and Compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytother Res*. **18**, 102-106.

B

- Braga, P., Culici, M., Alfieri, M. y Dal-Sasso, M. 2008. Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Ag.* **31**. 472-477.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food- a review. *Int J Food Microbiol.* **94**. 223-253.
- Bye, R. y Linares, E. 2006. Comunicación personal.
- Bye, R., Linares, E. y Flores, P. 2006. Selección de Plantas Medicinales de México. Noriega Editores. México. 125.

C

- Calzada, F., Yépez-Mulia, L y Aguilar, A. 2006. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorder. *J Ethnopharmacol.* **108**, 367-370.
- Chérigo, L., Pereda-Miranda, R y Gibbons, S. 2009. Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomea murucoides*. *Phytochemistry.* **70**. 222-227.
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. 2002. Guía de Validación de Métodos Analíticos.

D

- De Smet, P. 2002. Herbal remedies. *New Engl J Med*, **347**. 2046-2057.

E

-ElHabazi, K., Aboufatima, R., Benharref, A., Zyad, A., Chait, A. y Dalal, A. 2006. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* **107**. 406-411.

-EURACHEM. 1998. Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurements.

F

-Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. 2001. Secretaria de Salud. 1ª Edición. México, D.F.

G

-Gurim-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* **27**. 1-90.

H

-Haeseler, G., Maue, D., Grosskreutz, J., Bufler, J., Nentwing, B., Piepenbrock, S., Dengler, R. y Leuwer, M. 2002. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur J Anaesthesiol.* **19**. 571-579.

-Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortíz de Montellano, B., Rodríguez, E. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**. 539-565.

-Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M. y Pardo de Santayana, M. 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology. Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* **107**. 157-160.

I

-ICH . 2005. Guideline Q2 (R1). Validation of analytical Procedures.

-Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., Puccetti, L., De Simone, G. y Supuran, T. 2008. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. *Bioorg Med Chem Lett.* **18**. 2267-2271.

J

-Jewell, C., Prusakiewicz, J., Ackermann, C., Payne, N., Fate, G. y Williams, F. 2007. The distribution of esterases in the skin of the minipig. *Toxicol lett.* **173**. 118-123.

K

-Kumar, A., Singh, S. y Chhokar, S. 2008. Thymol and its derivatives as antimicrobial agents. *Natural Product Communications.* **3**. 823-828.

L

-Lorke, D. 1983. A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Arch. Toxicol.* **54**. 275-287.

M

-Mahmoudi, M., Morteza-Semnani, K. Y Mojra, M. 2008. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Thymus pubescens* extract. *Fitoterapia.* **79**. 361-365.

-
- Martinez M., Naveda-Diaz, V., Joseph-Nathan, P., 1988. Thymol derivates from *Calea zacatechichi* Schdl. *Rev Lat Quim.* **19**. 56-57.
- Mathela, C., Tiwari, A., Padalia, R. y Chanotiya, C. 2008. Chemical composition of *Inula cuspidate* C.B. Clarke. *Indian J Chem.* **47B**. 1249-1253.
- Mendoza-Castelán, G., García-Pérez, J. y Estrada-Lugo, E. 1997. Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el Mercado de Sonora. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, p. 136.
- Mittelstadt, S., Hemenway, C. y Spruell, R. 2005. Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. *J Pharmacol Toxicol.* **52**. 154-158.

N

- Navarrete-Vázquez, G., Yépez, L., Hernández-Campos, A., Tapia, A., Hernández-Luis, F., Cedillo, R., González, J., Martínez-Fernández, A., Martínez-Grueiro, M y Castillo, R. 2003. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorgan Med Chem.* **11**, 4615-4622.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaria de Salud. México.
- Norma Oficial Mexicana 073-SSA1-2005. 2005. Estabilidad de Fármacos. Secretaria de Salud. México.
- Nyman, J., Lees, C., Bockstedt, L., Filice, G., Lexau, C., Leshner, L., Como-Sabetti, K. y Lynfield, R. 2011. Cost of screening intensive care unit patients for methincillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals. *Am J Infect Control.* **39**. 27-34.

O

- Ojewole, J. 2005. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* **99**. 13-19.
- OMS. 2002. Pautas Generales par alas Metodologías de Investigación y Evaluación de la Medicina Tradicional. WHO, Geneva, Switzerland.
- OMS. 2011. The World Medicines Situation 2011. Traditional Medicines Global Situation, Issues, and Challenges. WHO, Geneva, Switzerland.
- Owoyele, V., Oloriegbe, Y., Balogun, E. y Soladoye, A. 2005. Analgesic and anti-inflammatory properties of *Nelsonia canescens* leaf extract. *J Ethnopharmacol.* **99**. 153-156.

P

- Paolini, J., Costa, J. y Bernardini, A. 2005. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* **1076**. 170-178.
- Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A., Bighelli, A., Casanova, J. y Costa, J. 2007. Thymol derivates from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour Frag J.* **22**. 479-487.

-Pérez-Vásquez, A., Capella, S., Linares, E., Bye, R., Angeles-López, G. y Mata R. 2011. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Hofmeisteria schaffneri*. *J Pharm Pharmacol.* **63**. 579-586.

-Pérez-Vásquez, A., Linares, E., Bye., Cerda-García-Rojas, C. y Mata, R. 2008. Phytotoxic activity and conformational análisis of thymol analogs from *Hoffmeisteria schaffneri*. *Phytochemistry.* **69**. 1339-1347.

-Pérez-Vasquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R. y Mata, R. 2005. Phytotoxins from *Hofmeisteria schaffneri*: Isolation and Síntesis of 2'-(2''-Hydroxy-4''-methylphenyl)-2'-oxoethyl Acetate. *J. Nat. Prod.* **68**. 959-962.

R

-Rates, S. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon.* **39**. 603-613.

-Rice, P. y Coats, J. 1994. Structural requirements for monoterpenoid activity against insects. *Symposium Series.* **557**. 92-108.

S

-Schlacher, A., Stanzer, T., Osprian, I., Mischitz, M., Klingsbichel, E., Faber, K. y Schwab, H. 1998. Detection of a new enzyme for stereoselective hydrolysis of linalyl acetate using simple plate assays for the characterization of cloned esterases from *Burkholderia gladioli*. *J Biotechnol.* **62**. 47-54.

-Schmitz, R., Schaden, G. y Horst, K. 1979. Thymyl esters of 2-methylbutyric and 3-methylbutyric acids in the essential oils from subterranean parts of *Arnica alpina* (L.) Olin. *Archiv der Pharmazie.* **312**. 65-68.

-Schwalbe, R., Steele-Moore, L y Goodwin, A. 2007. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. CRC Press. Boca Raton, Florida.

-Sheng, P., Ding, J., Wu, Y. y Niu, F. 1984. Constituents of the essential oil of *Cyathocline purpurea*. *Acta Bot Yunnica*. **6**. 223-228.

T

-Tan-No, K., Niijima, F., Nakagawasai, O., Sato, T., Satoh, S. y Tadano, T. 2003. Development of tolerance to the inhibitor effect of loperamide on gastrointestinal transit mice. *Eur J Pharm Sci*. **20**. 357-363.

V

-Viana, G., Matos, F., Matos, F., Silveira, E., Craveiro, A. y Alencar, J. 1981. Pharmacological effects of thymol and its acetate, butyrate, and benzoate esters. *Ciencia e Cultura*. **33**. 104-106.

W

-Wang, X., Zhang, F., Liu, Z., Feng, H., Yu, Z., Lu, Y., Zhai, H, Bai, F., Shi, Y., Lan, M., Jin, J. y Fan, D. 2008. Effects of essential oil from *Croton tiglium* L. on intestinal transit in mice. *J Ethnopharmacol*. **117**. 102-107.

-Williamson, E., Okpako, D. y Evans, F. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Wiley. Inglaterra. Capítulo 8. Anti-inflammatory and Analgesic Activity. 142-147.

-World Health Organization. 2003. WHO *Monographs On Selected Medicinal Plants*. Volume 2. WHO, Geneva, Switzerland.

-World Health Organization. 2007. WHO *Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related material. Good manufacturing practices and inspection*. Segunda edición. Volumen 2. 129-133. WHO. Geneva.

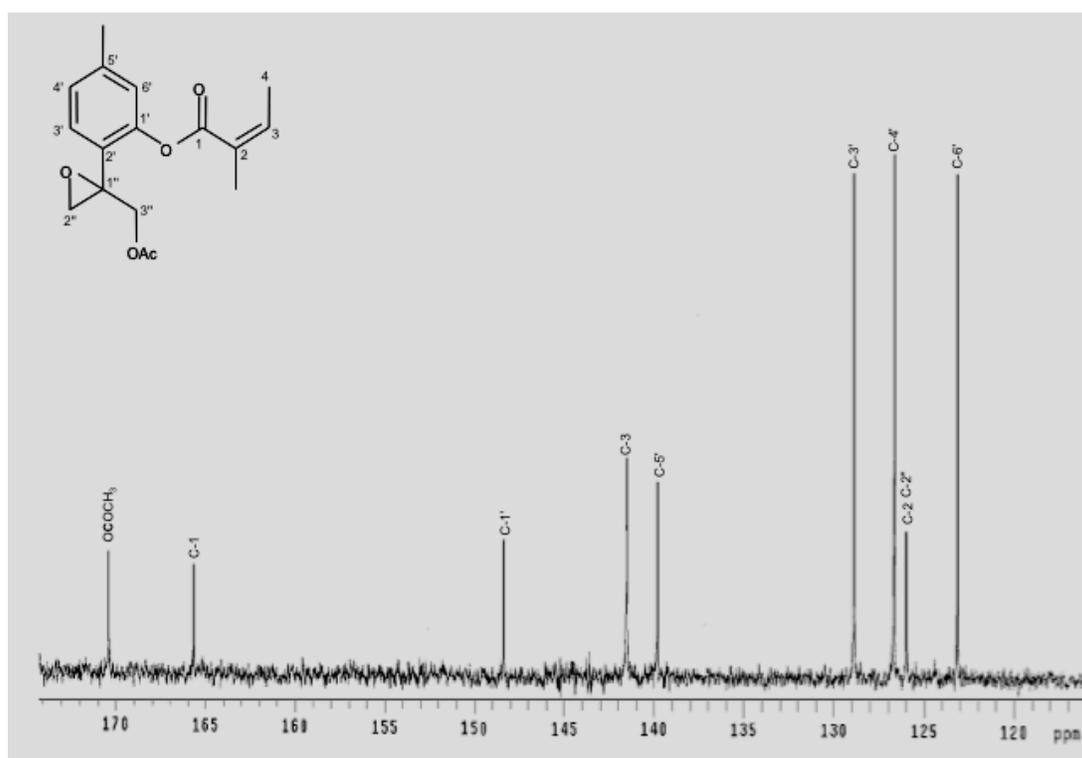
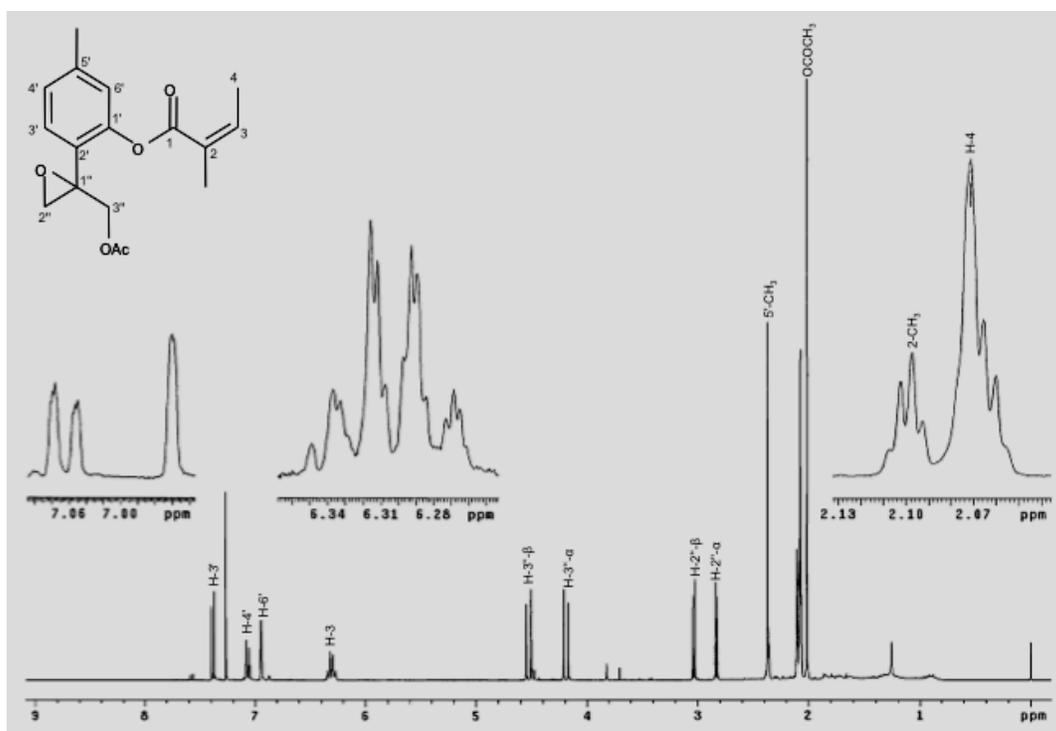
--World Health Organization. 2009. WHO *Monographs On Selected Medicinal Plants*. Volume 4. WHO, Geneva, Switzerland.

-World Health Organization. 2010. WHO *Monographs On Medicinal Plants Commonly Used in the Newly Independent States*. WHO, Geneva, Switzerland.

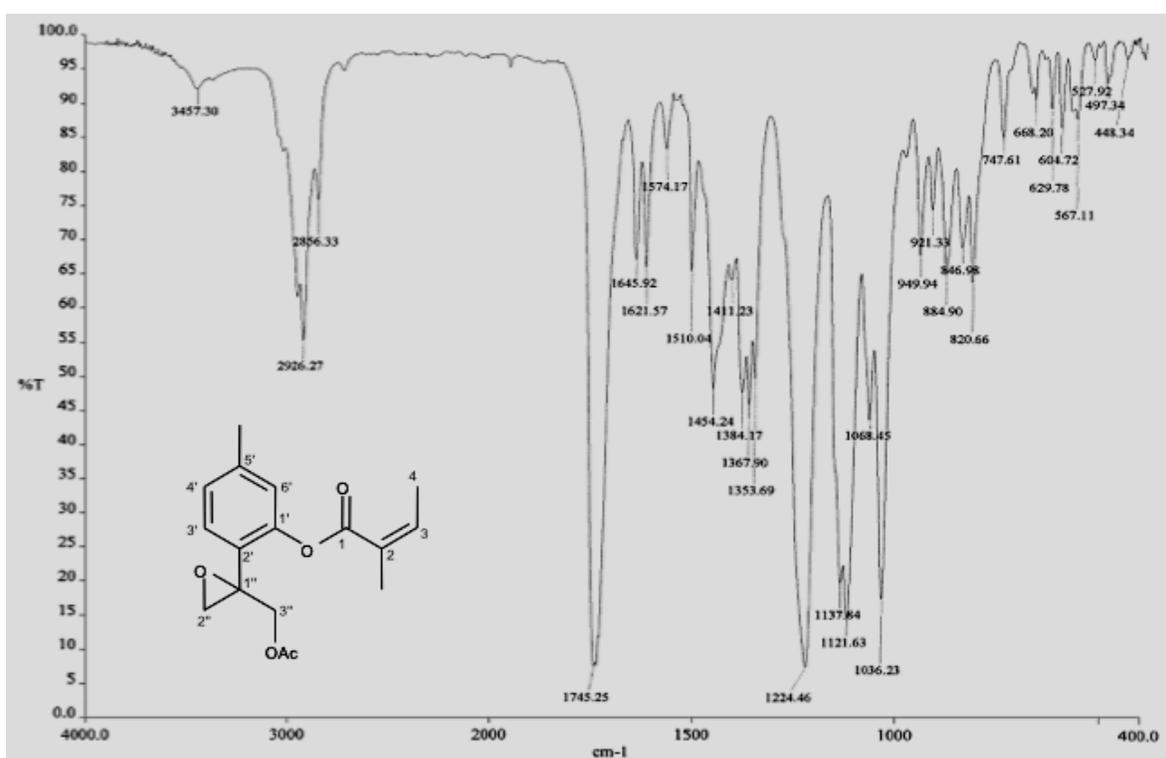
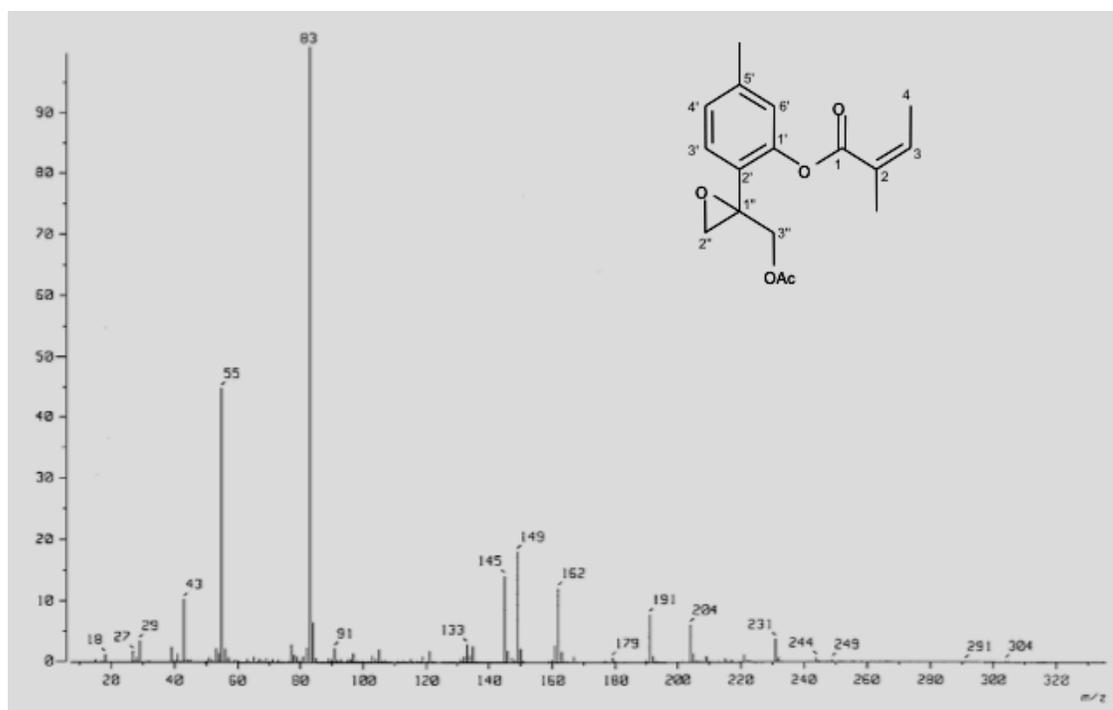
Z

-Zhao, J., Li, Y, Liu, Q. y Gao, K. 2010. Antimicrobial activities of some thymol derivatives from the roots of *Inula hupehensis*. *Food Chem.* **120**. 512-516.

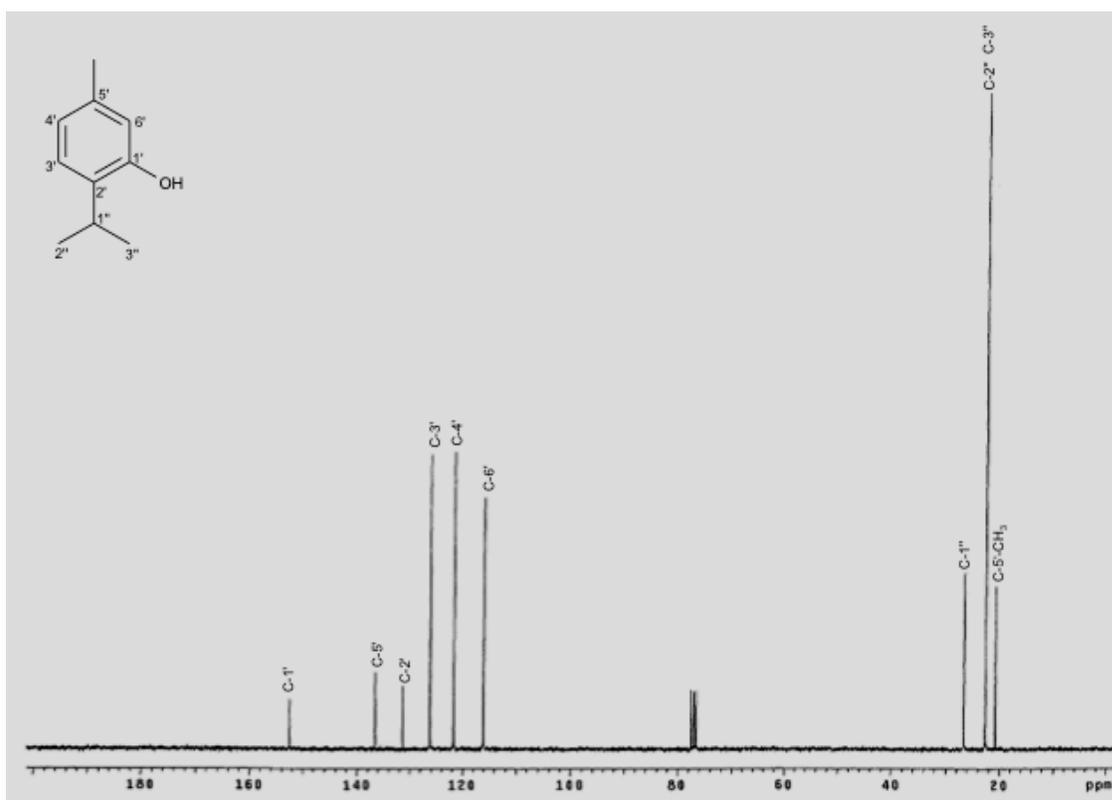
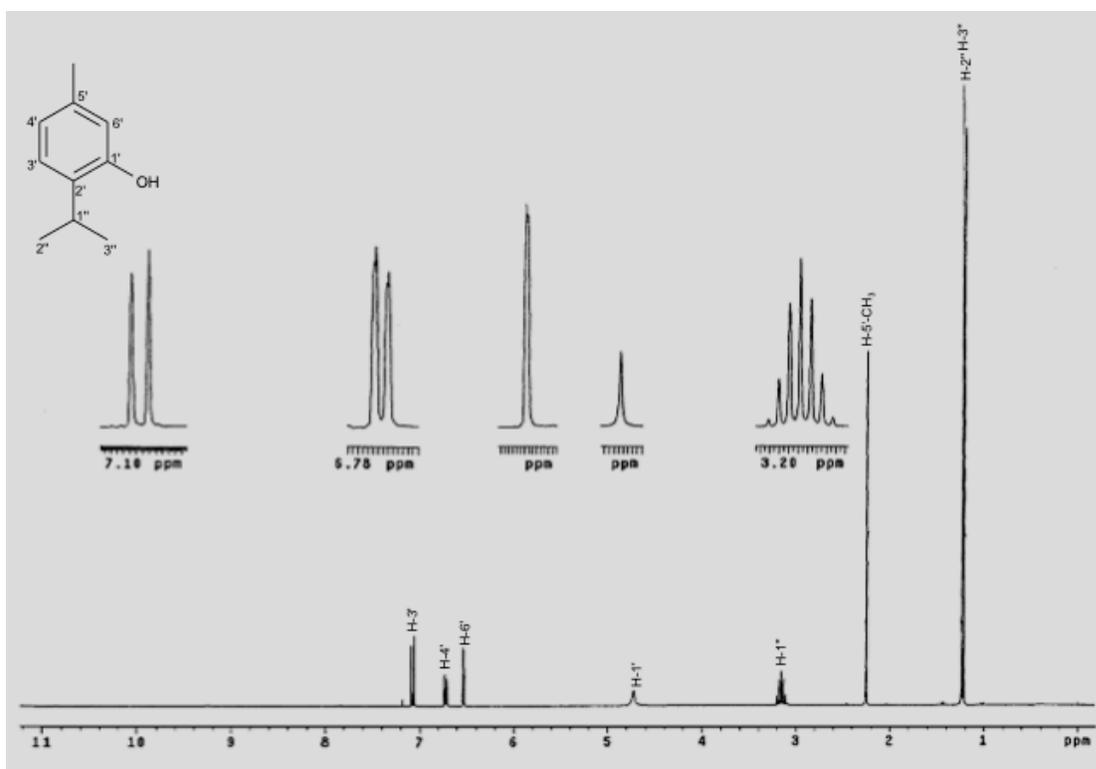
X. ANEXO A



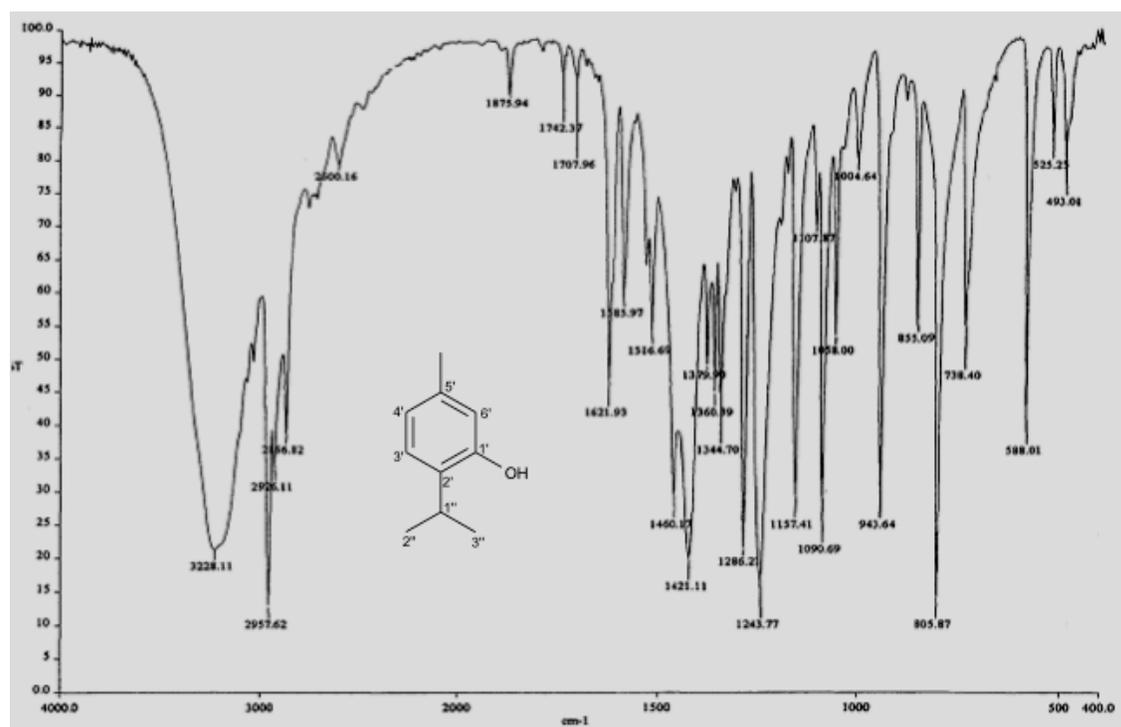
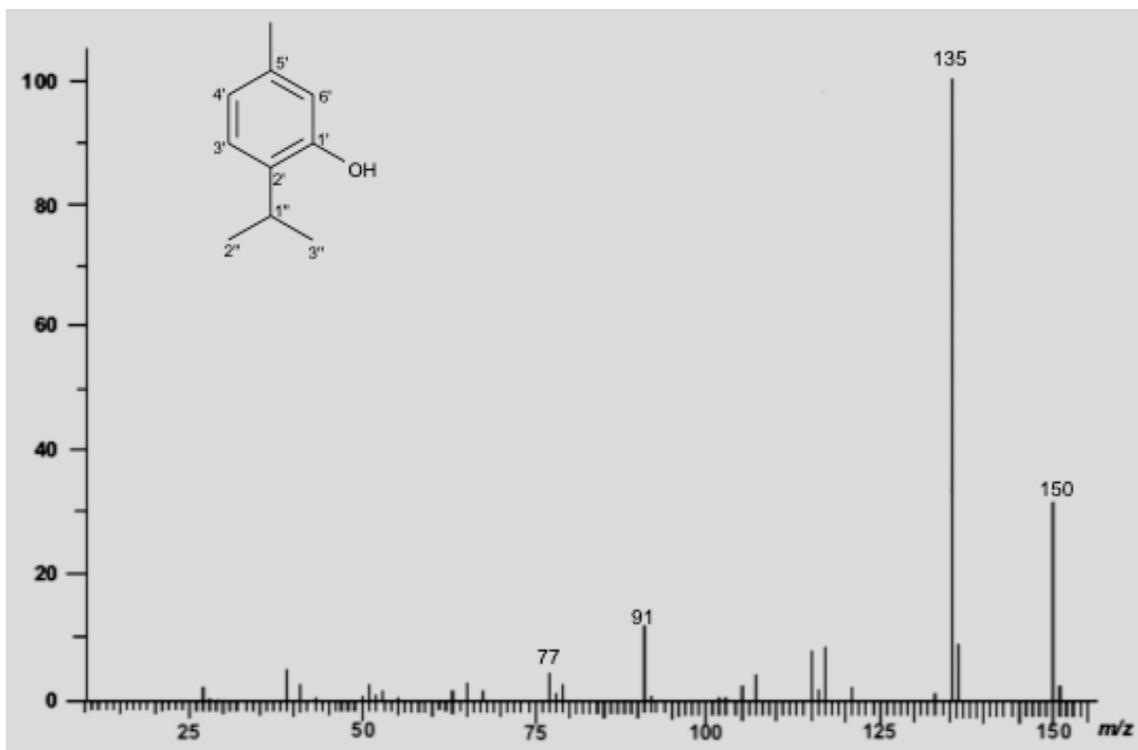
Espectro 1. RMN-¹H (300MHz) y ¹³C (75.5MHz) del compuesto **8** (CDCl₃)



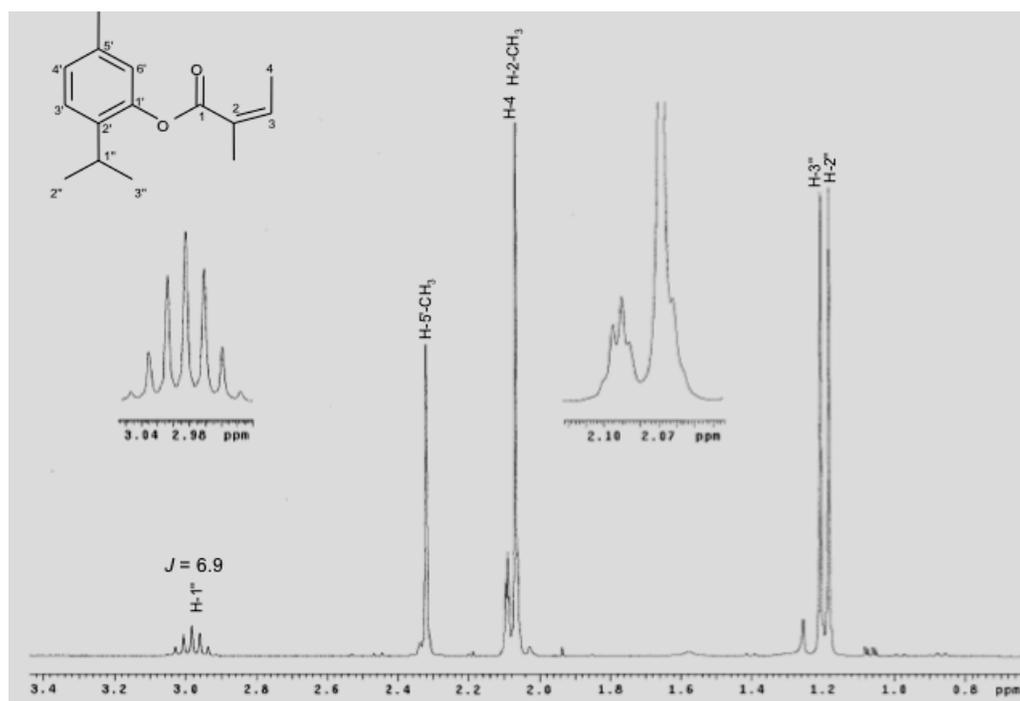
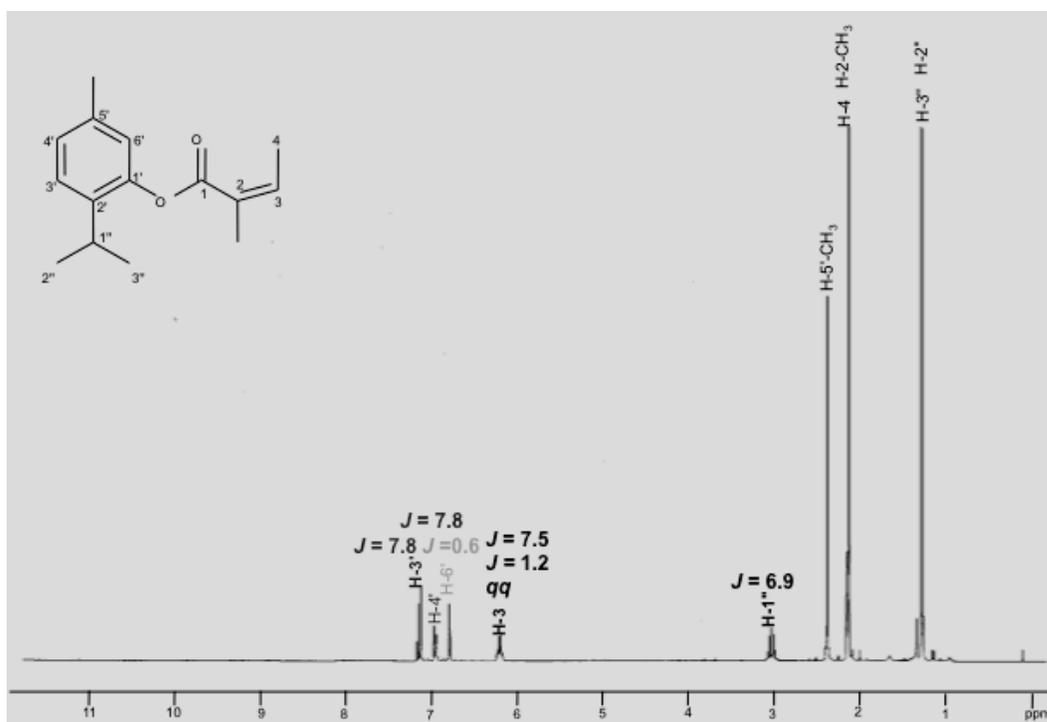
Espectro 2. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 8



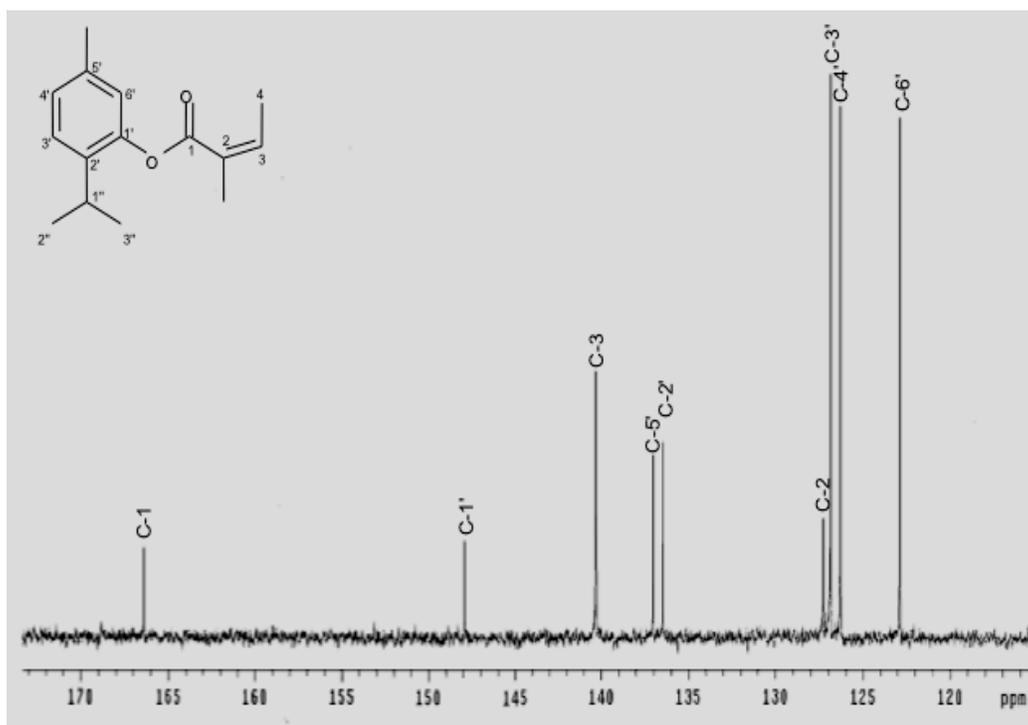
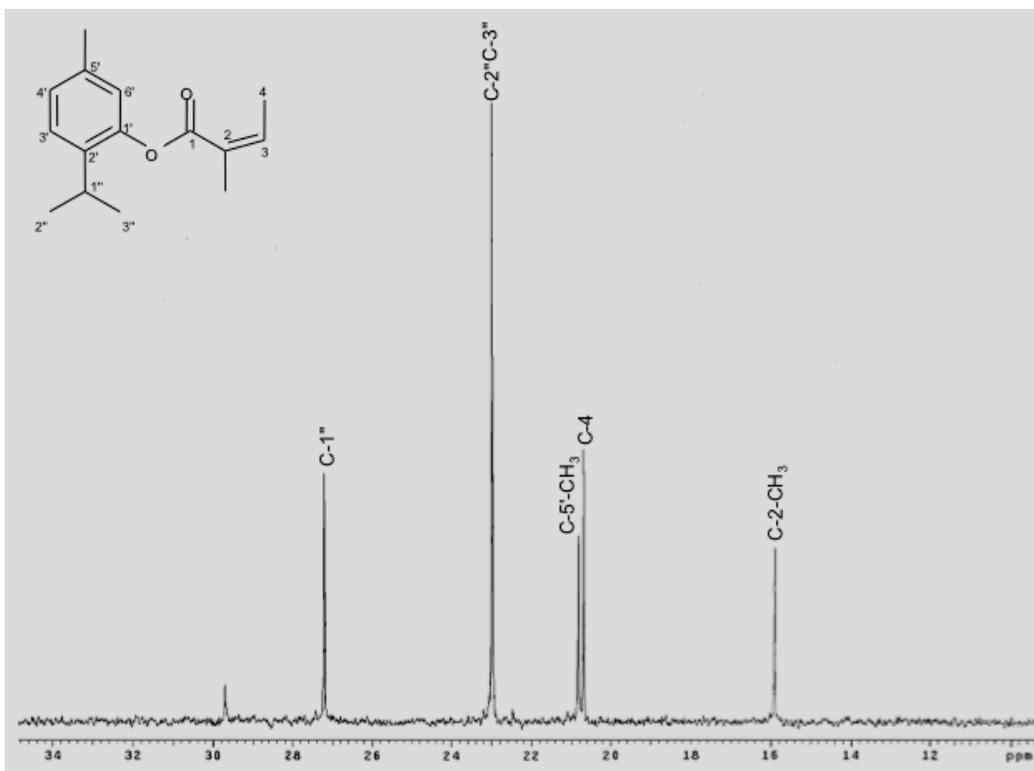
Espectro 3. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **11** (CDCl_3)



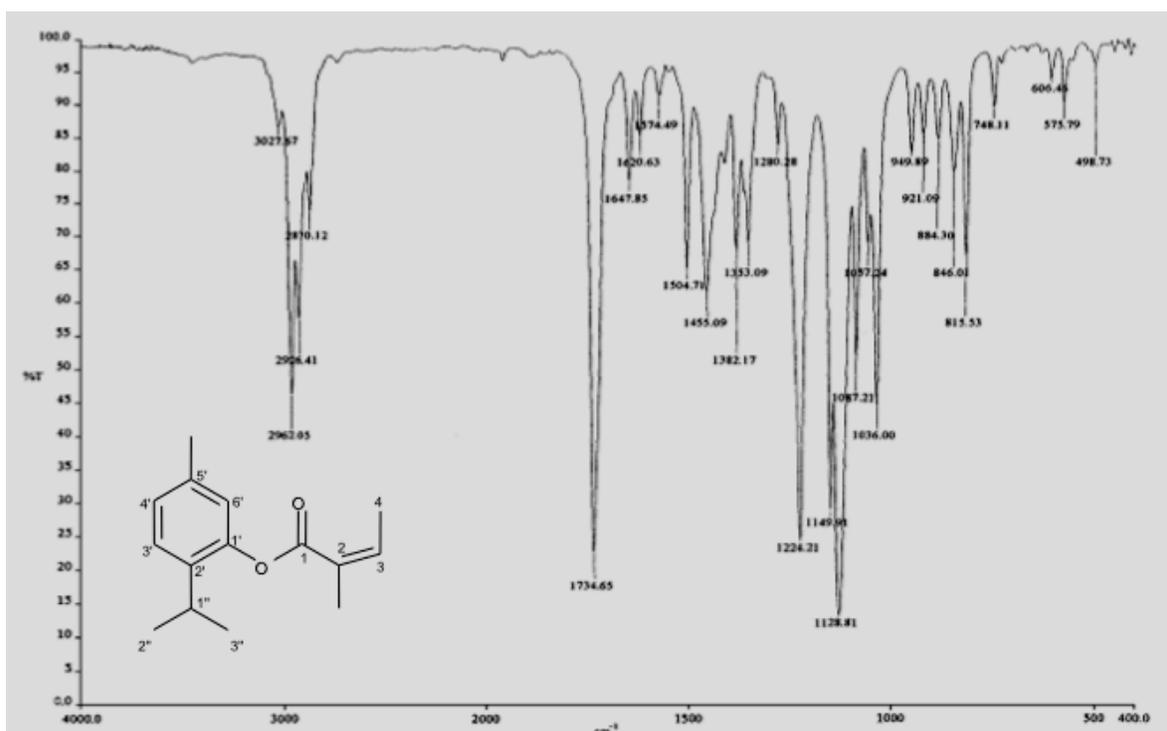
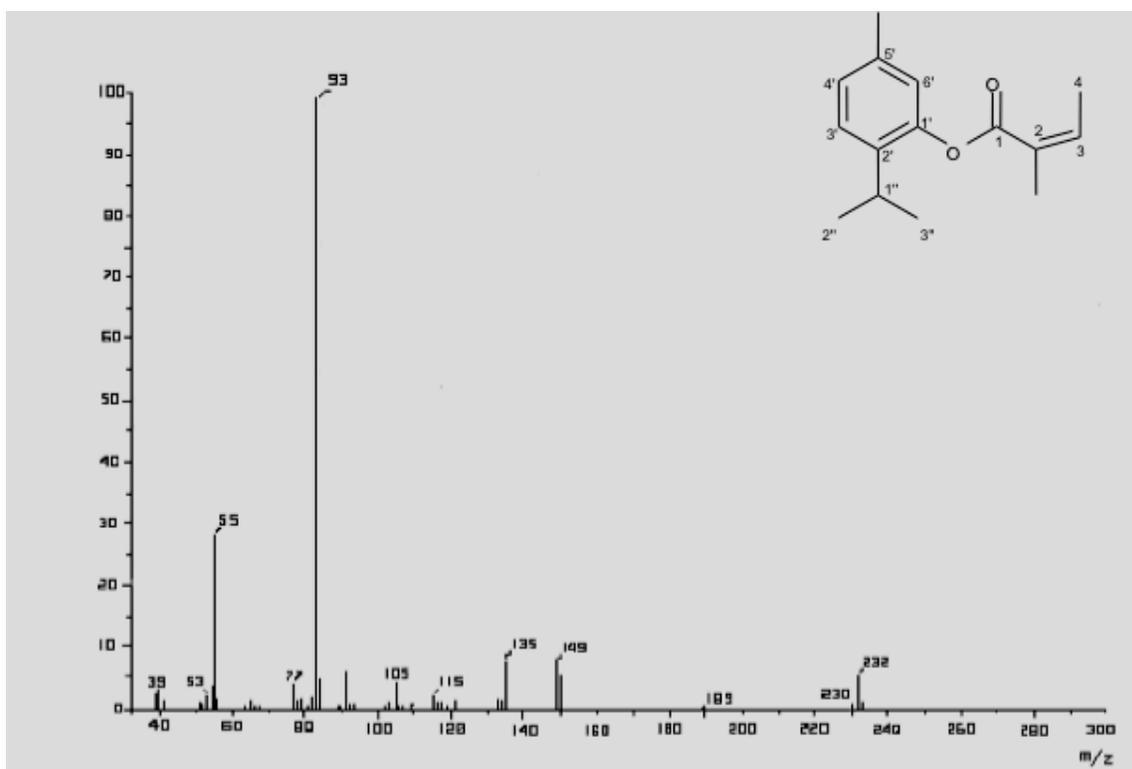
Espectro 4. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 11



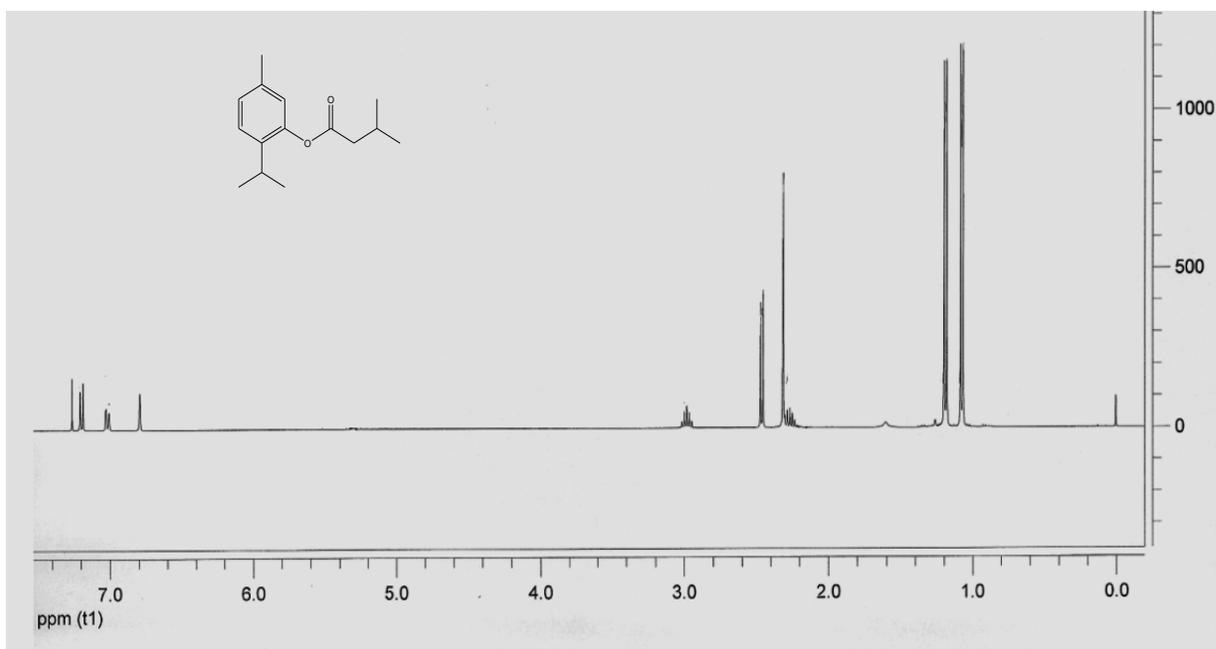
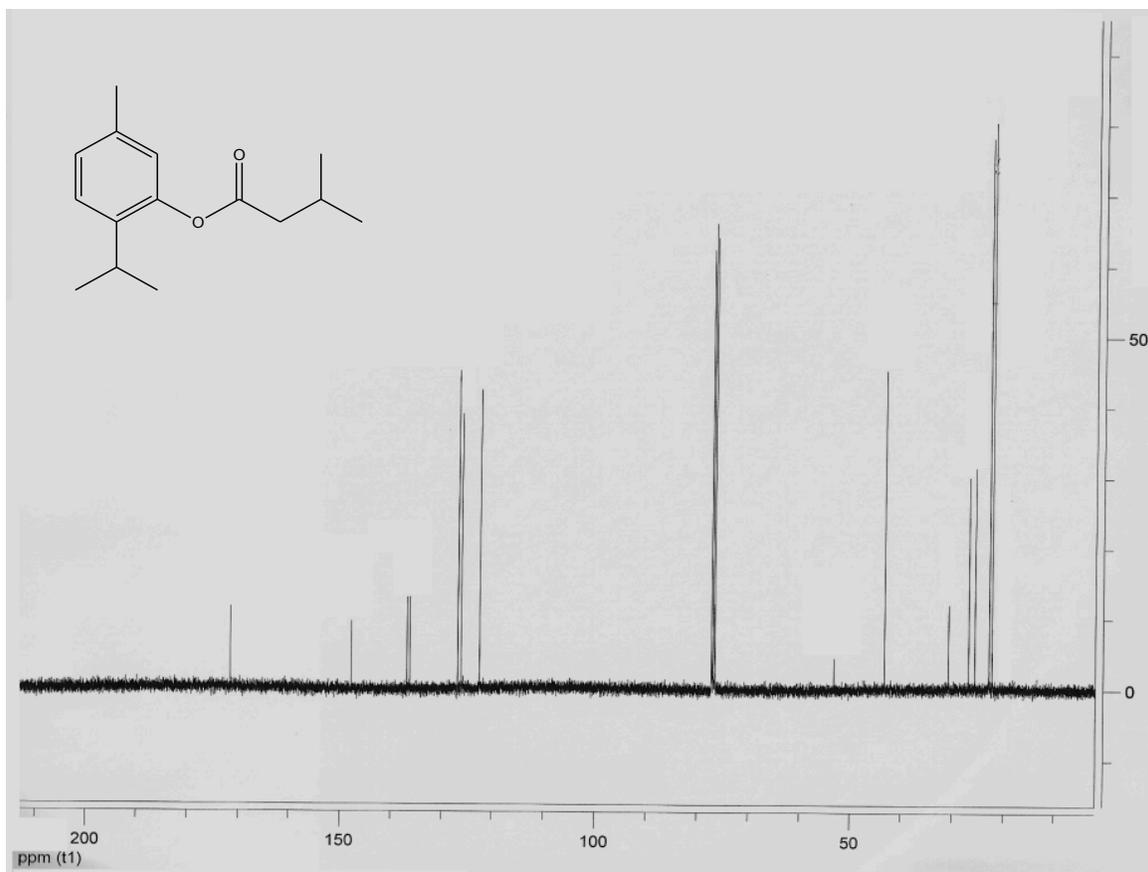
Espectro 5. RMN-¹H del compuesto **12** (CDCl₃) 300MHz.



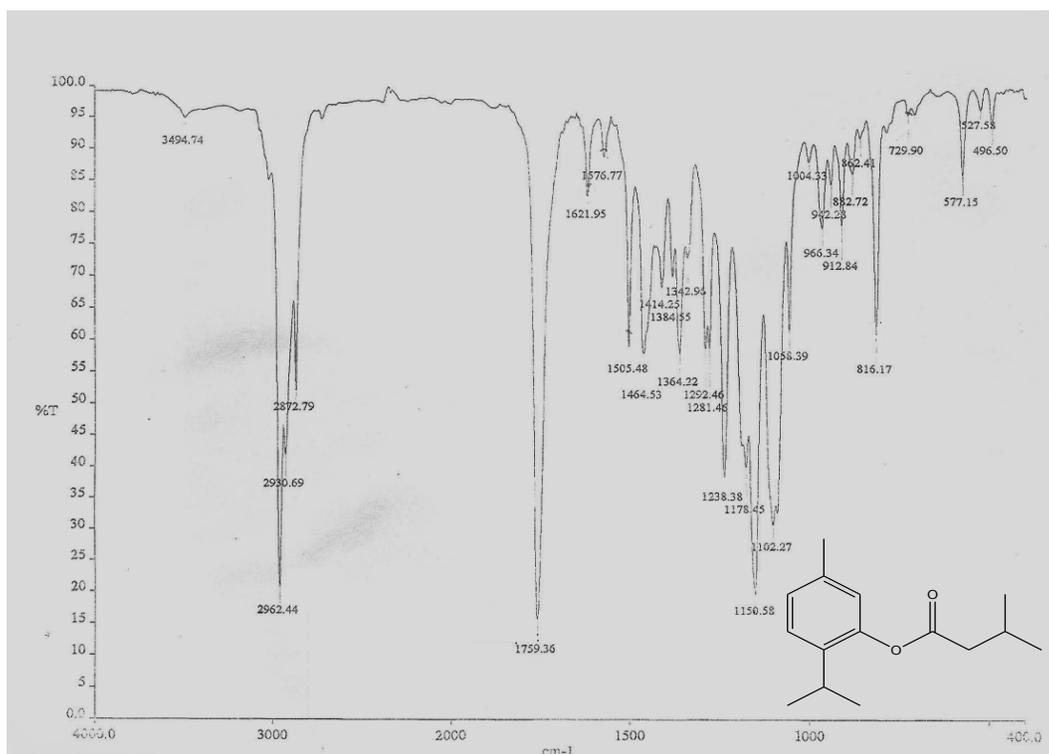
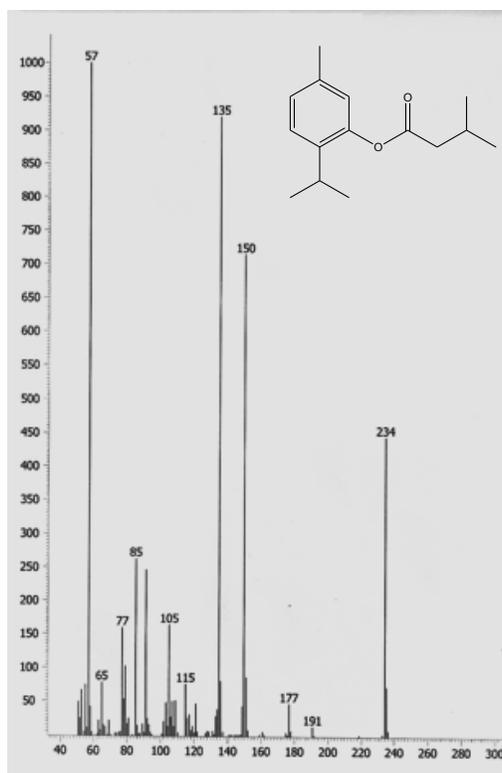
Espectro 6. RMN- ^{13}C del compuesto **12** (CDCl_3) 75.5MHz



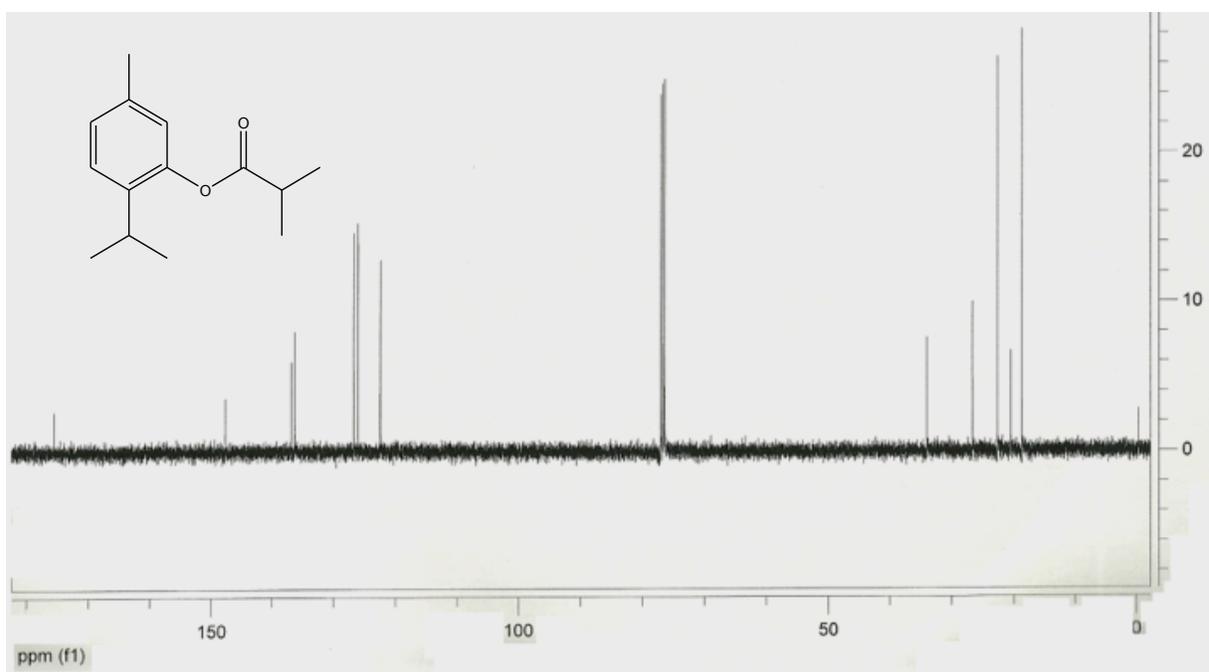
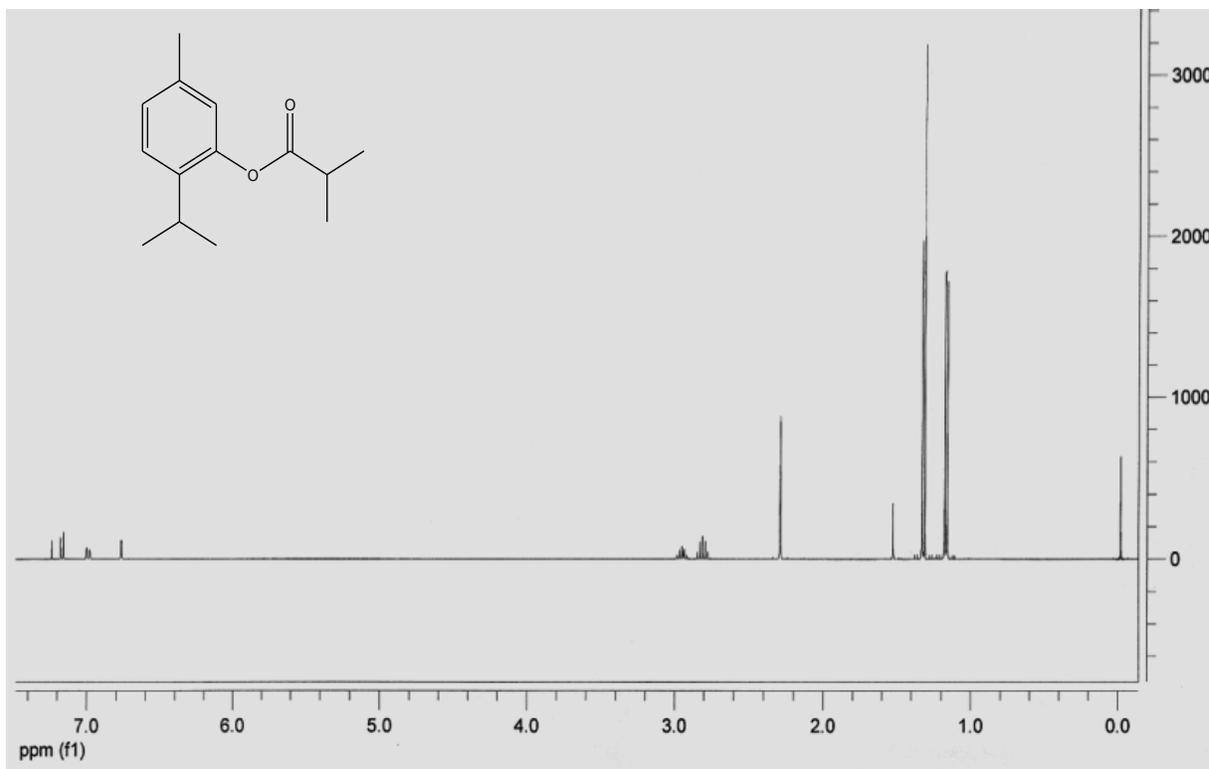
Espectro 7. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 12



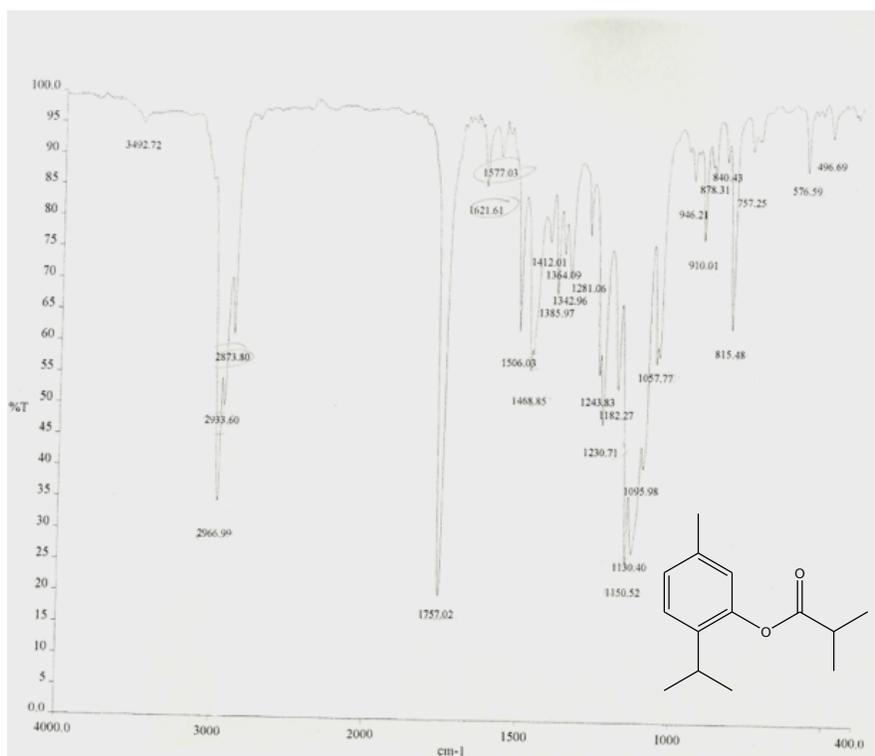
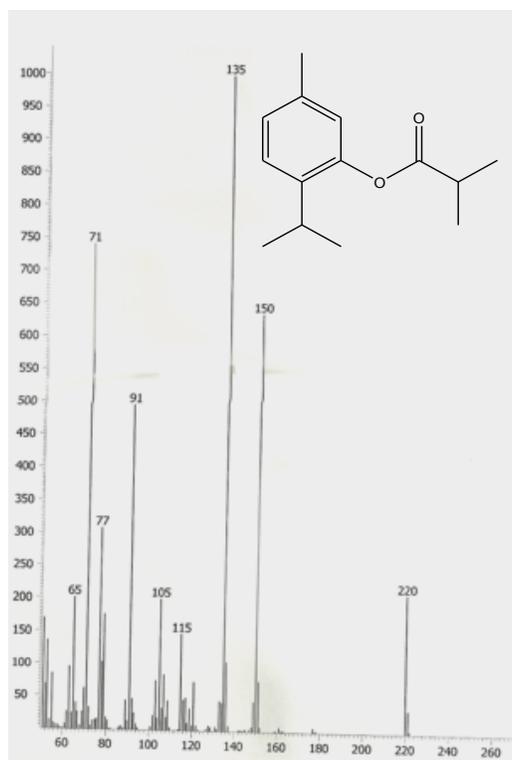
Espectro 8. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **13** (CDCl₃)



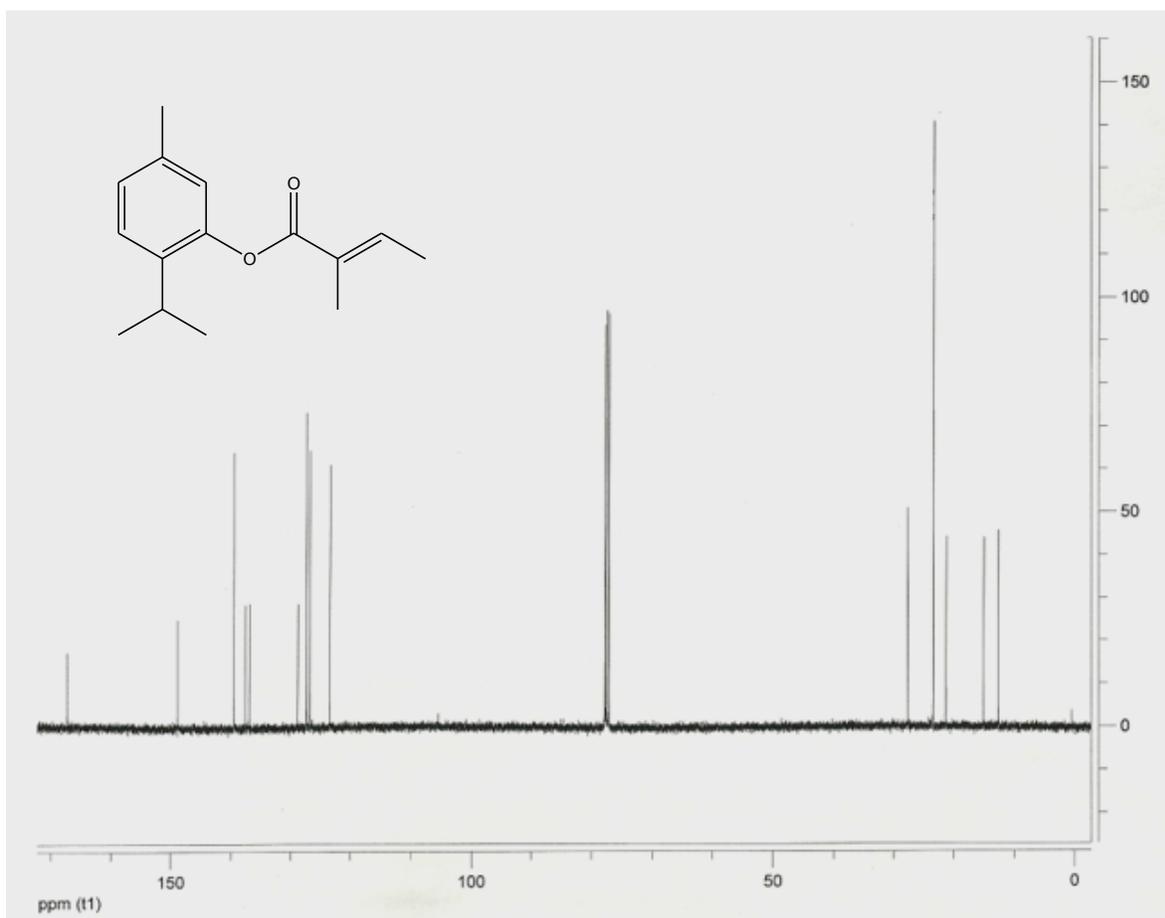
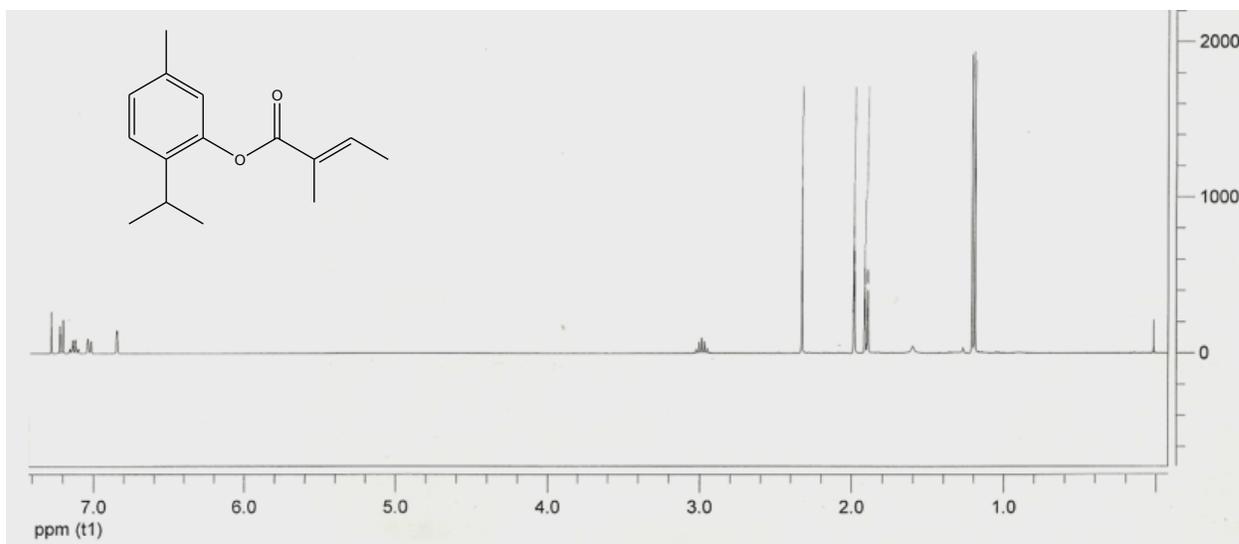
Espectro 9. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 13



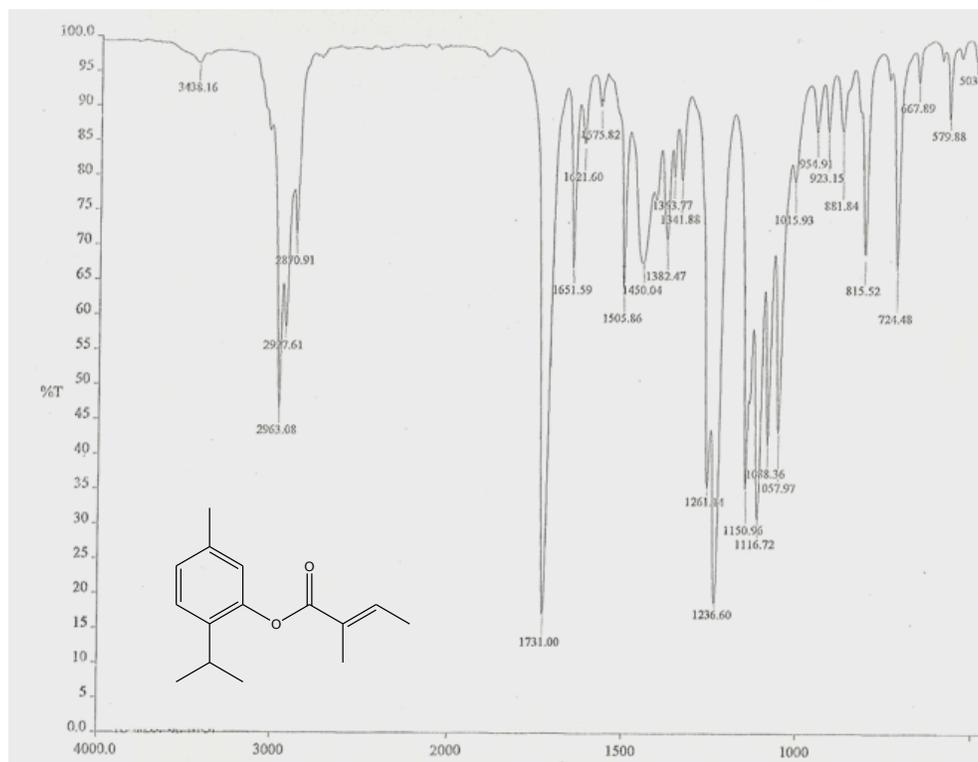
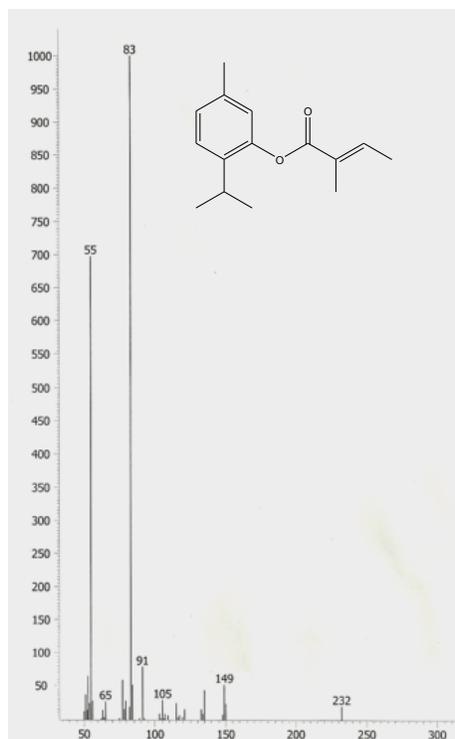
Espectro 10. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto 14 (CDCl_3)



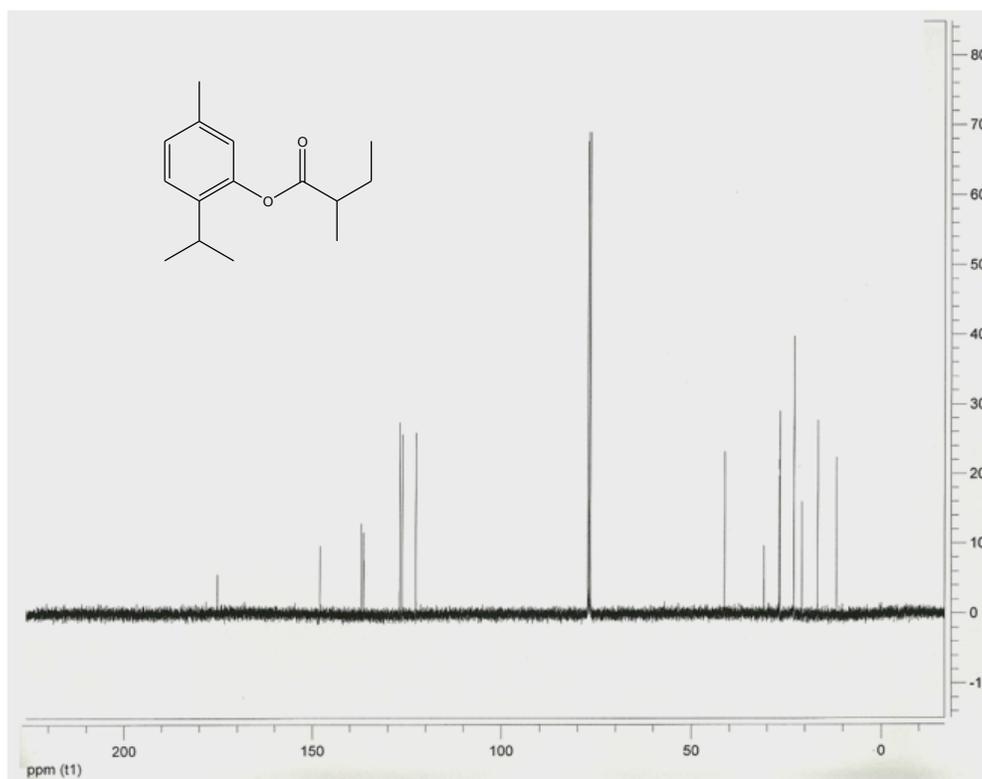
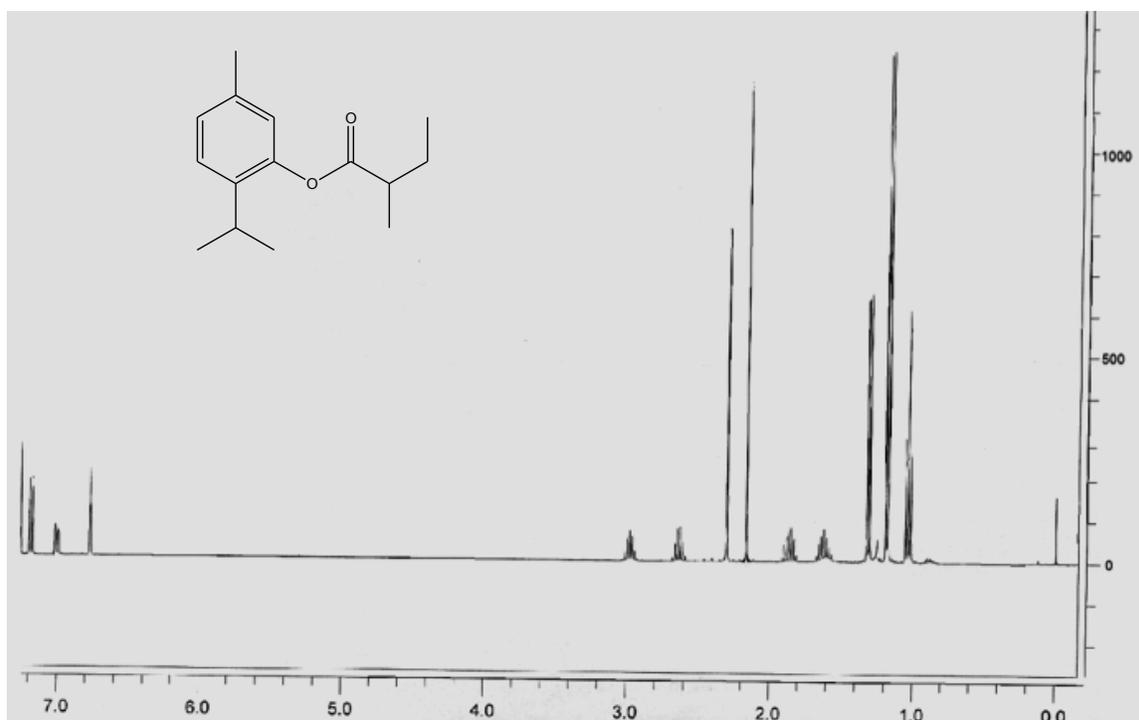
Espectro 11. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 14



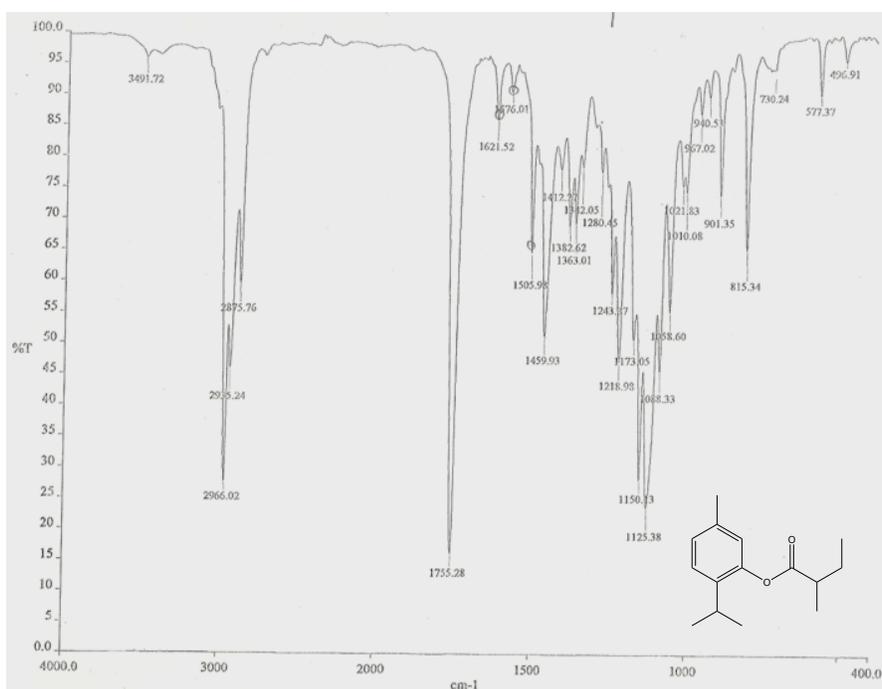
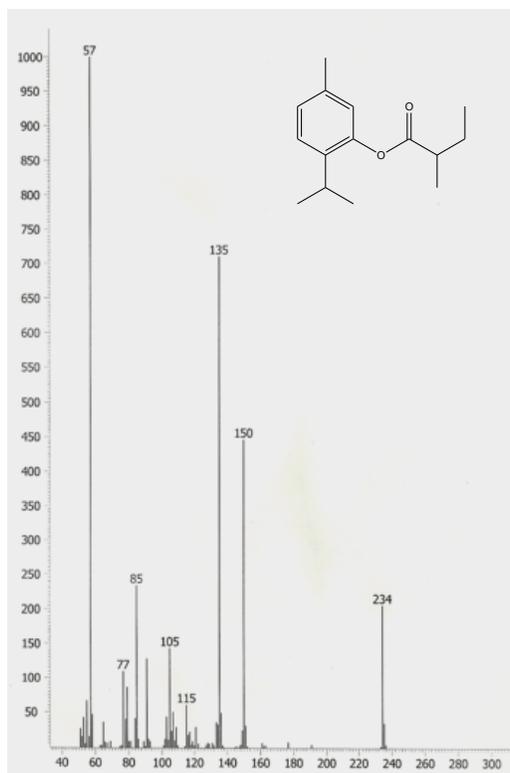
Espectro 12. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **15** (CDCl_3)



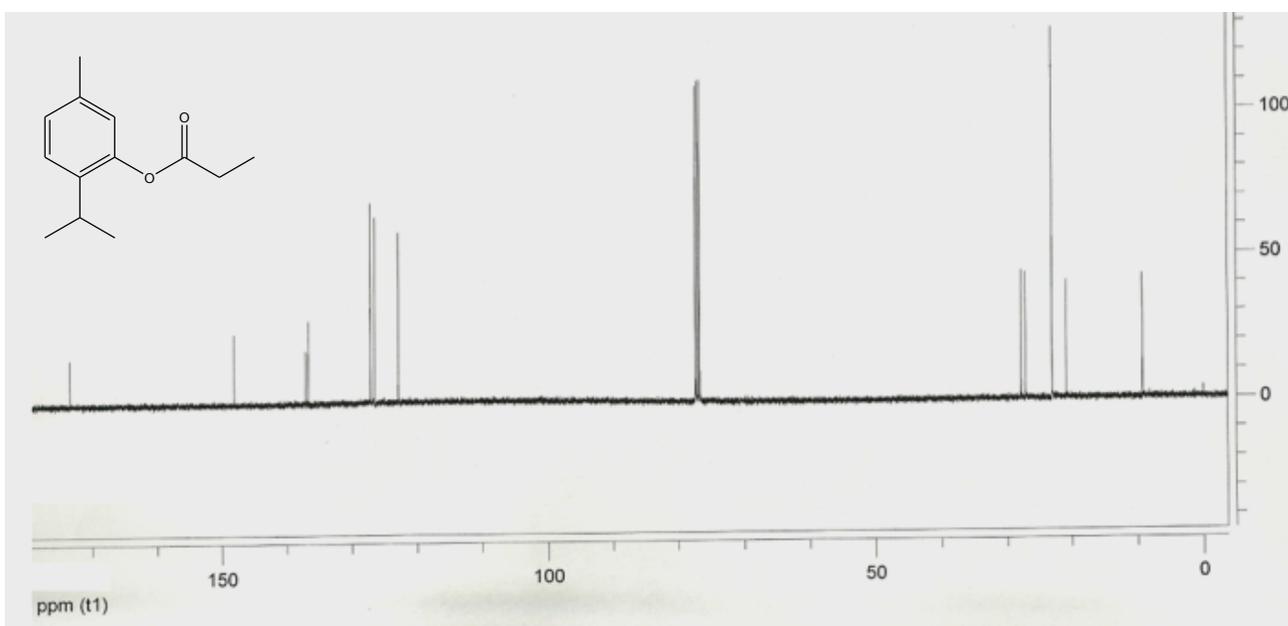
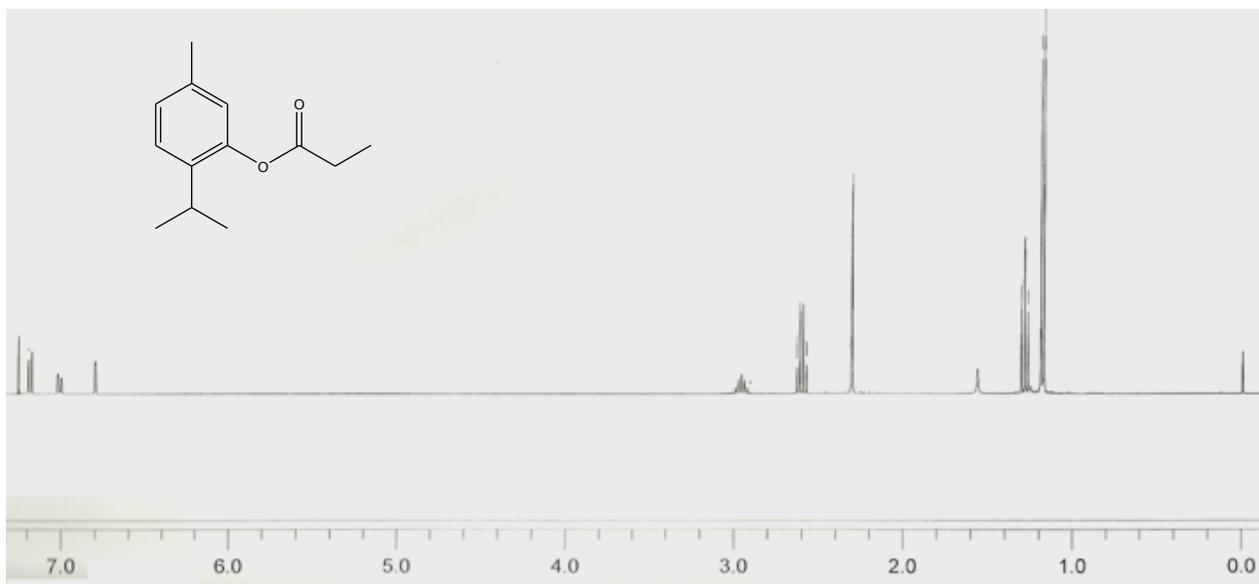
Espectro 13. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 15



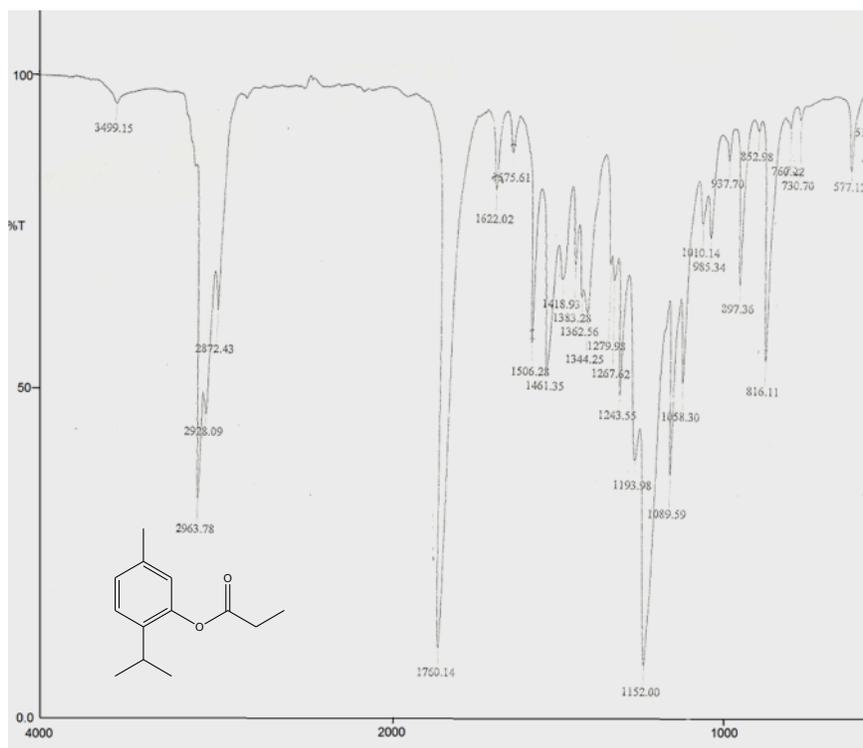
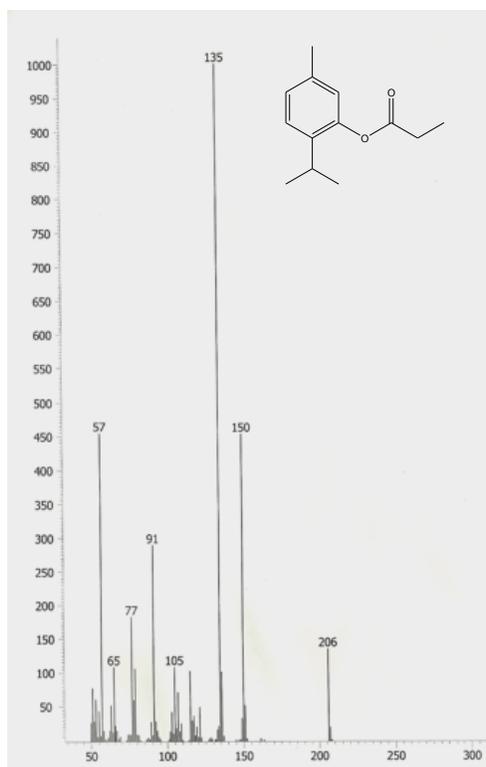
Espectro 14. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **16** (CDCl_3)



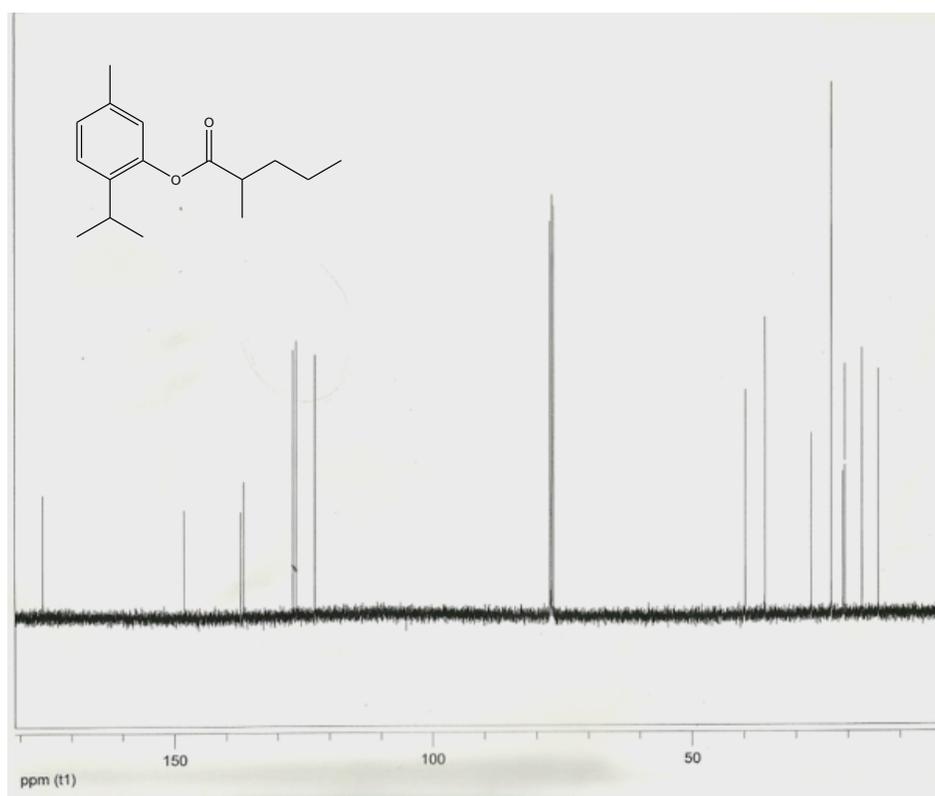
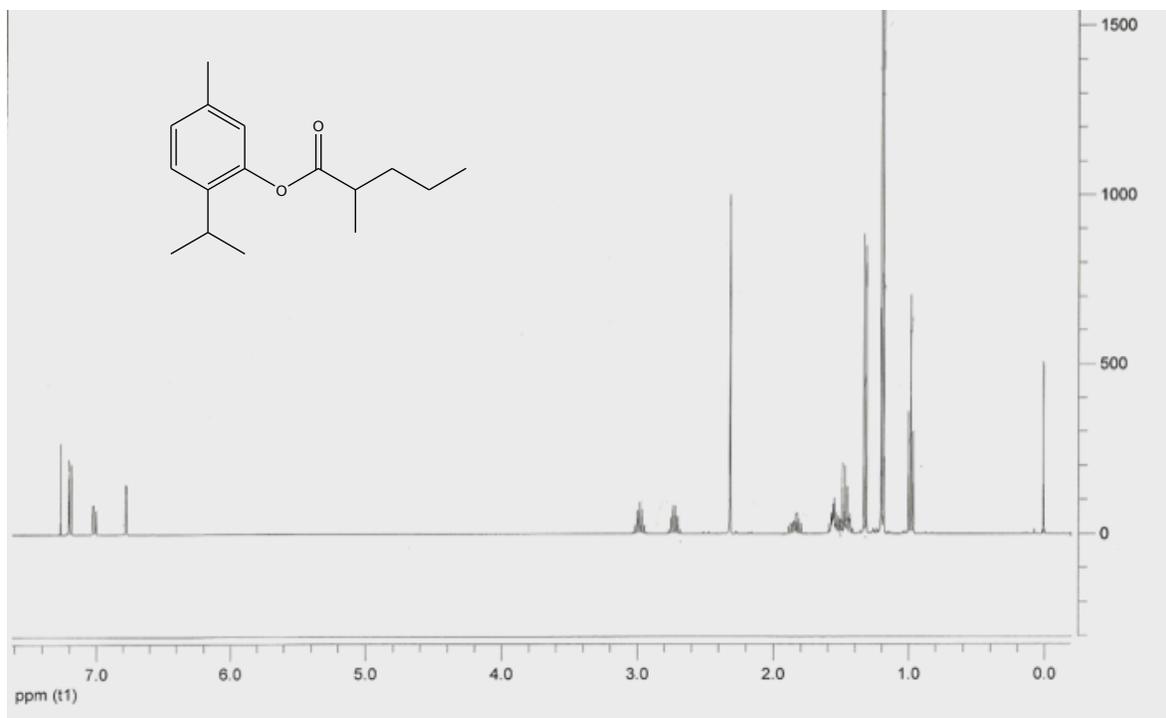
Espectro 15. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **16**



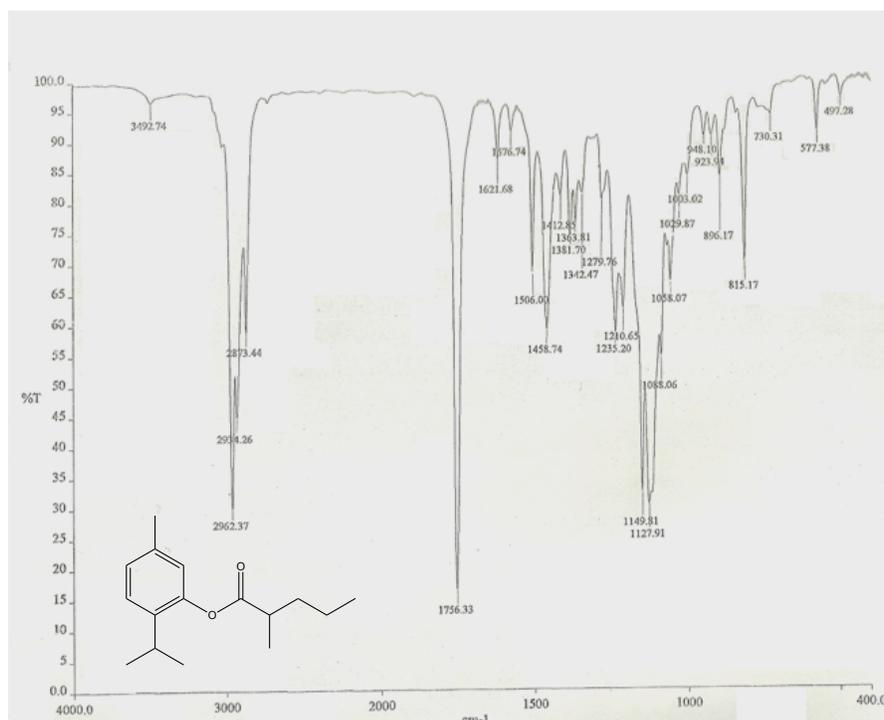
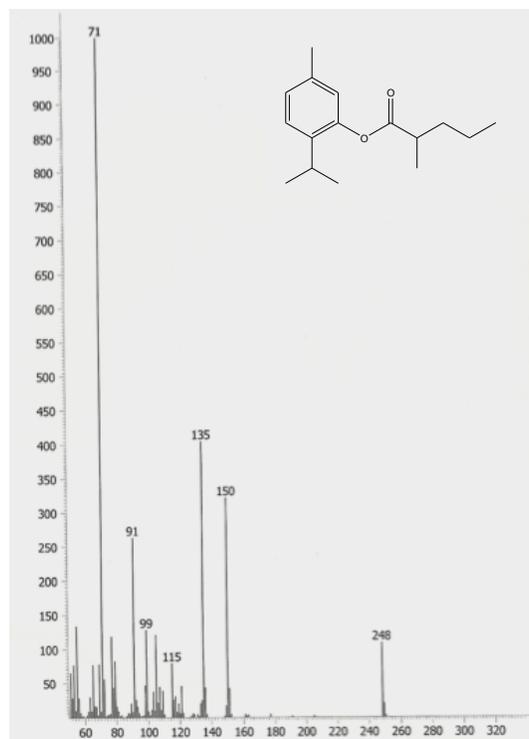
Espectro 16. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto 17 (CDCl_3)



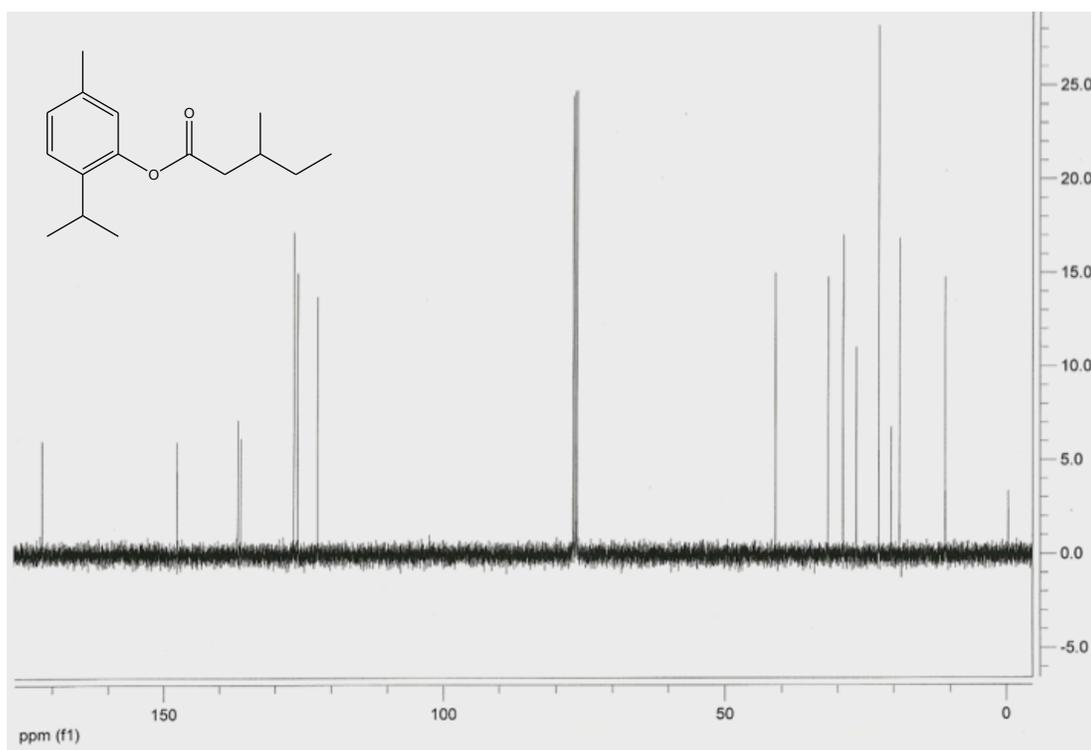
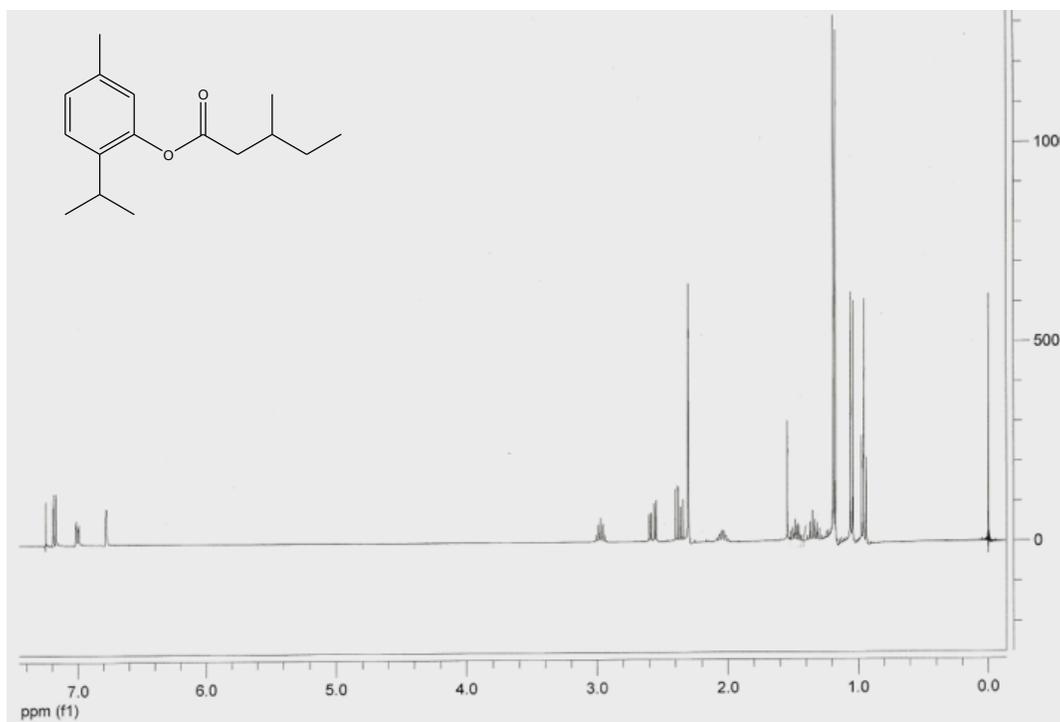
Espectro 17. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto 17



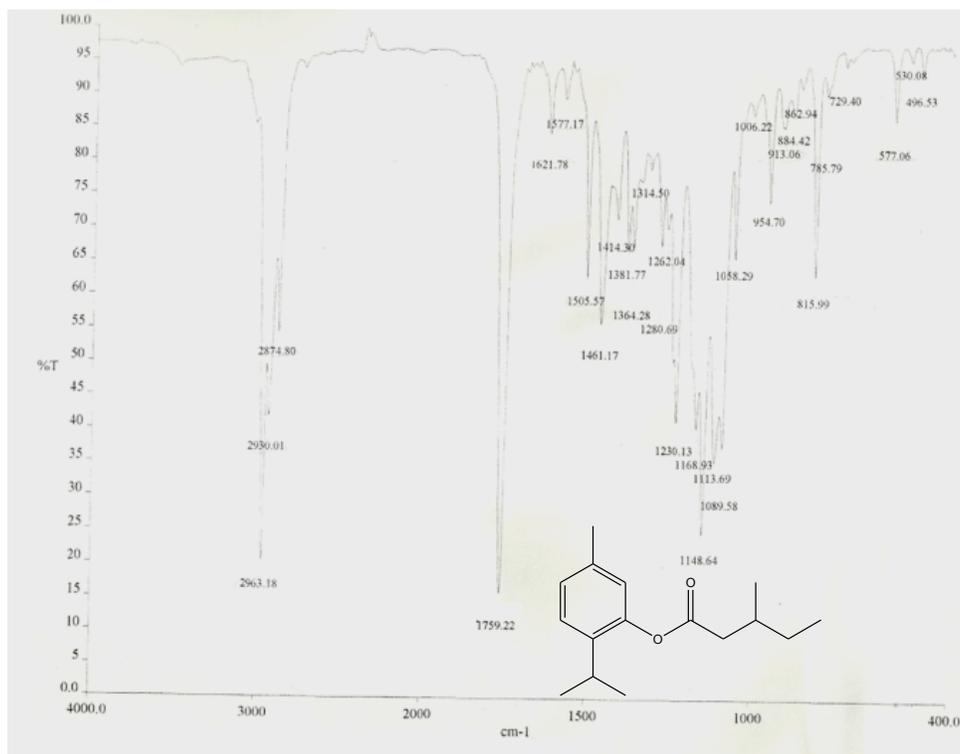
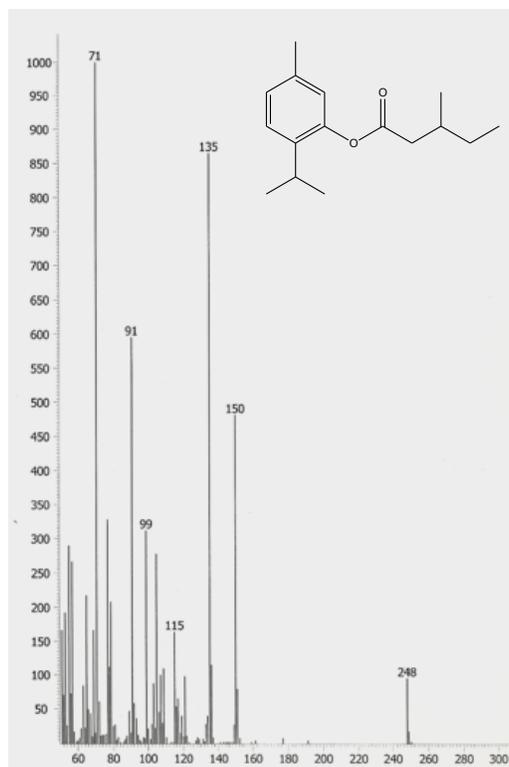
Espectro 18. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **18** (CDCl_3)



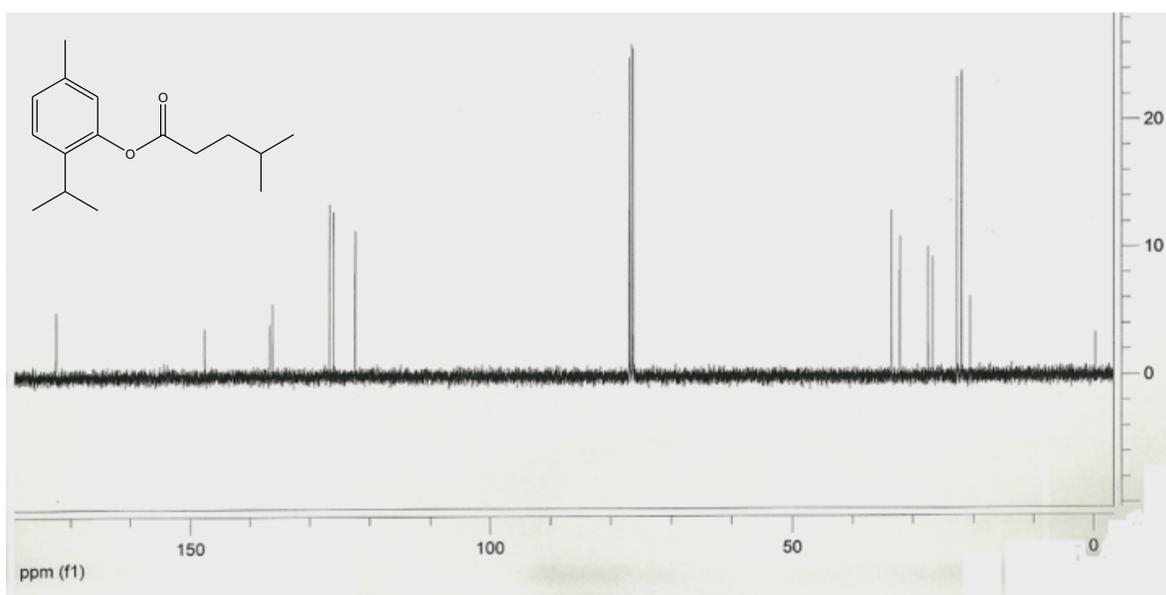
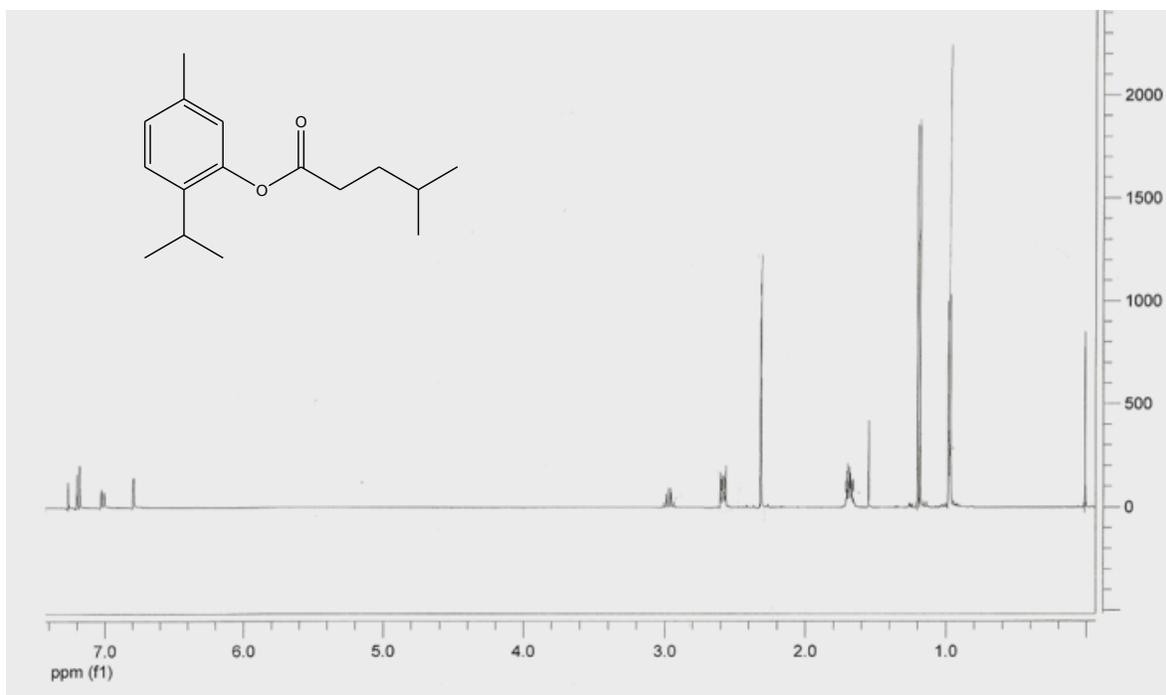
Espectro 19. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **18**



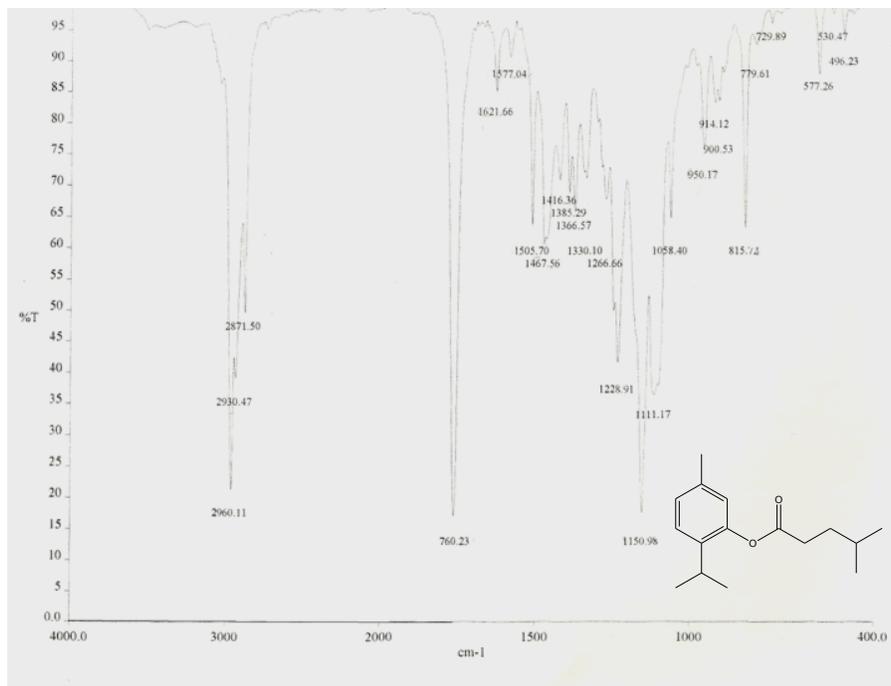
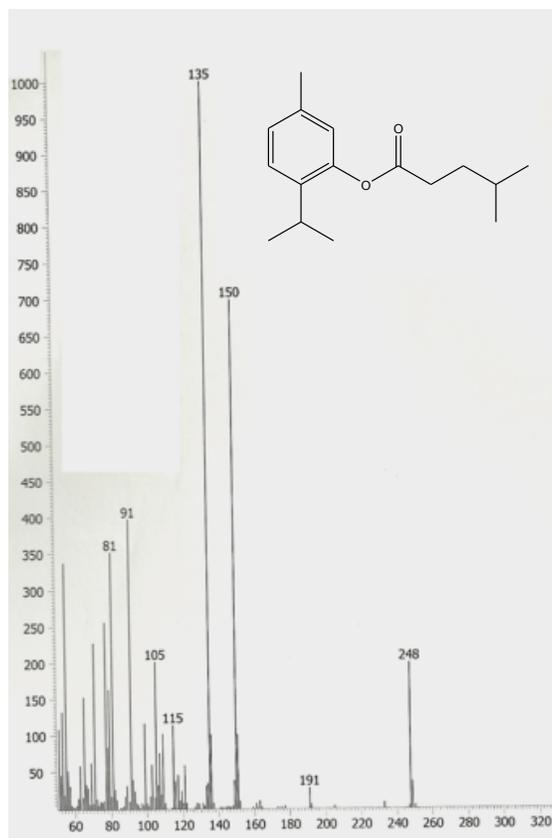
Espectro 20. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **19** (CDCl_3)



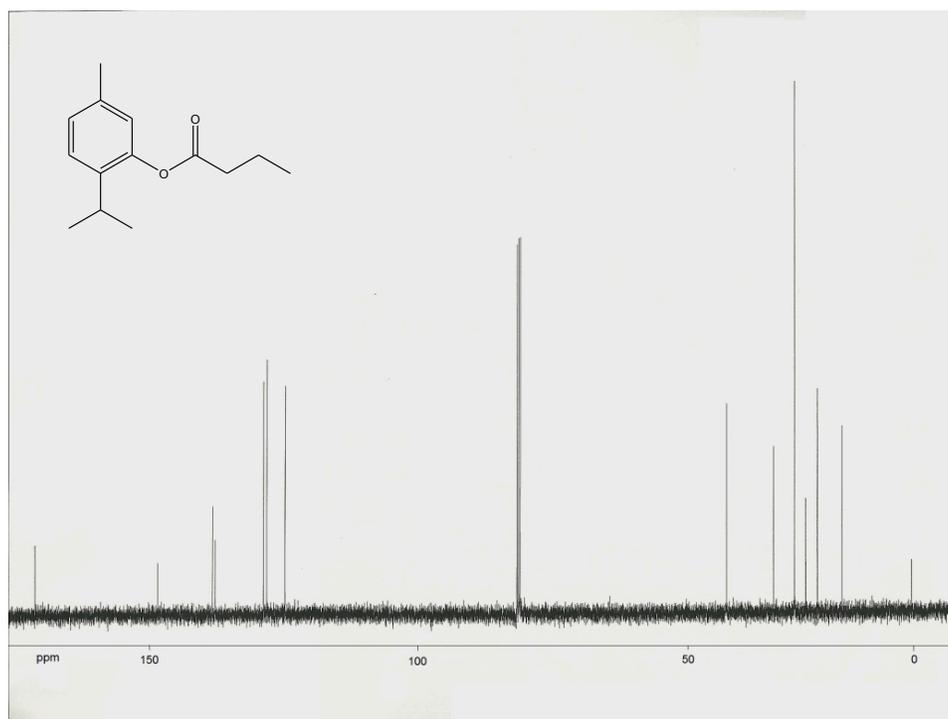
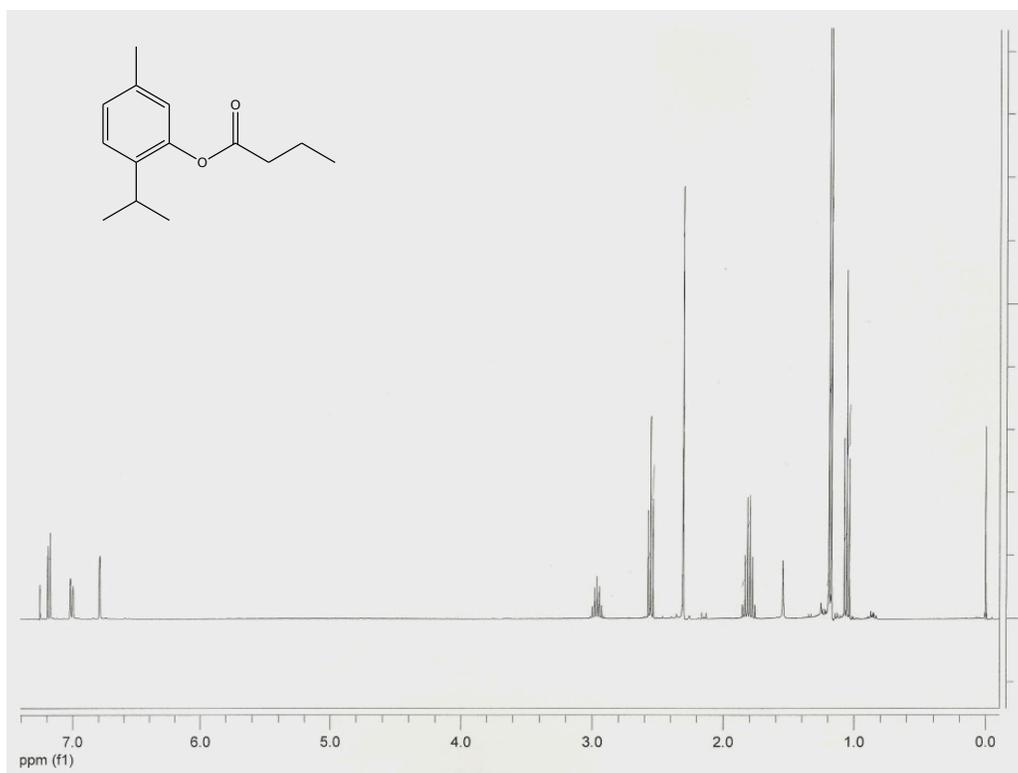
Espectro 21. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **19**



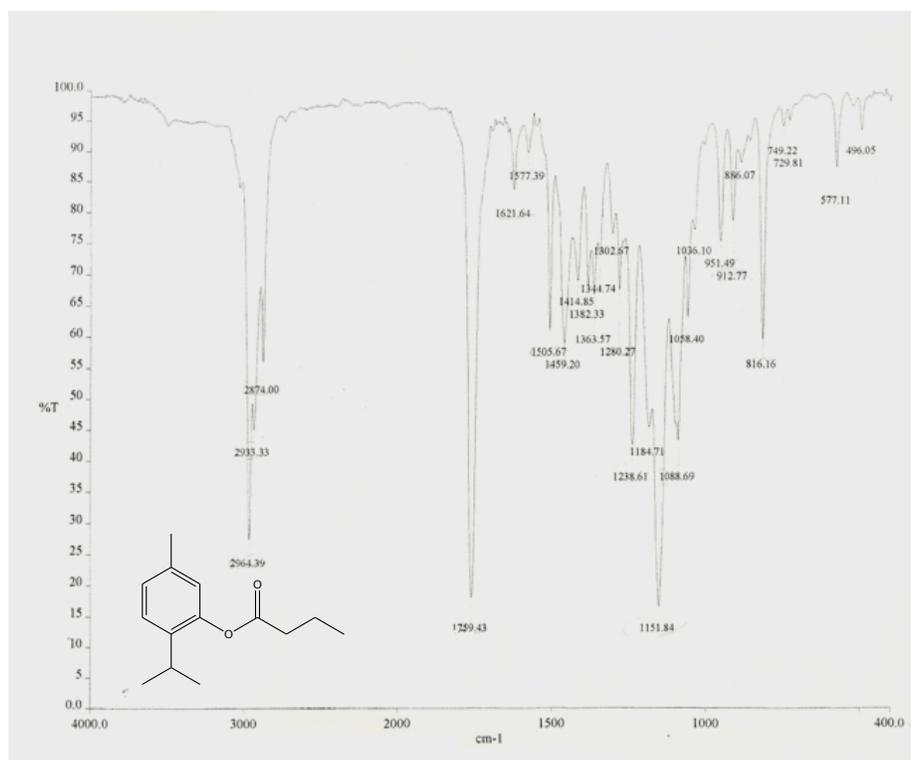
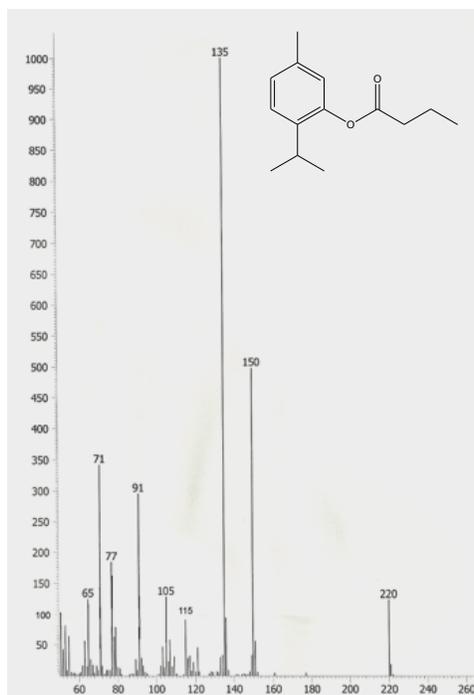
Espectro 22. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **20** (CDCl_3)



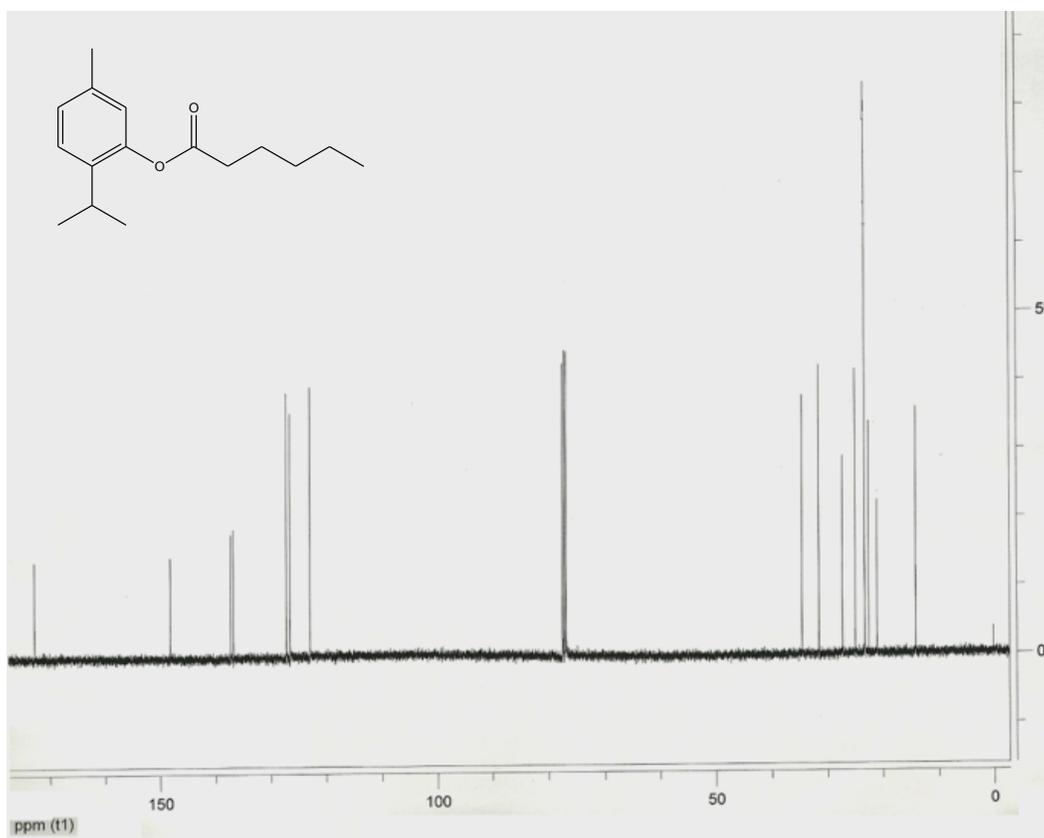
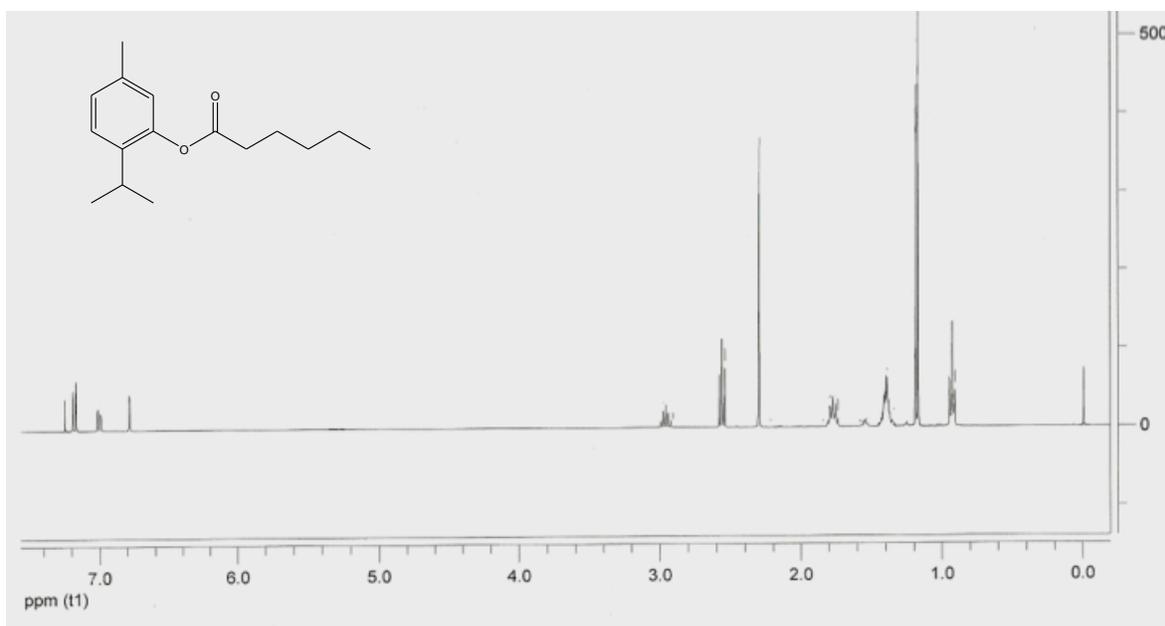
Espectro 23. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **20**



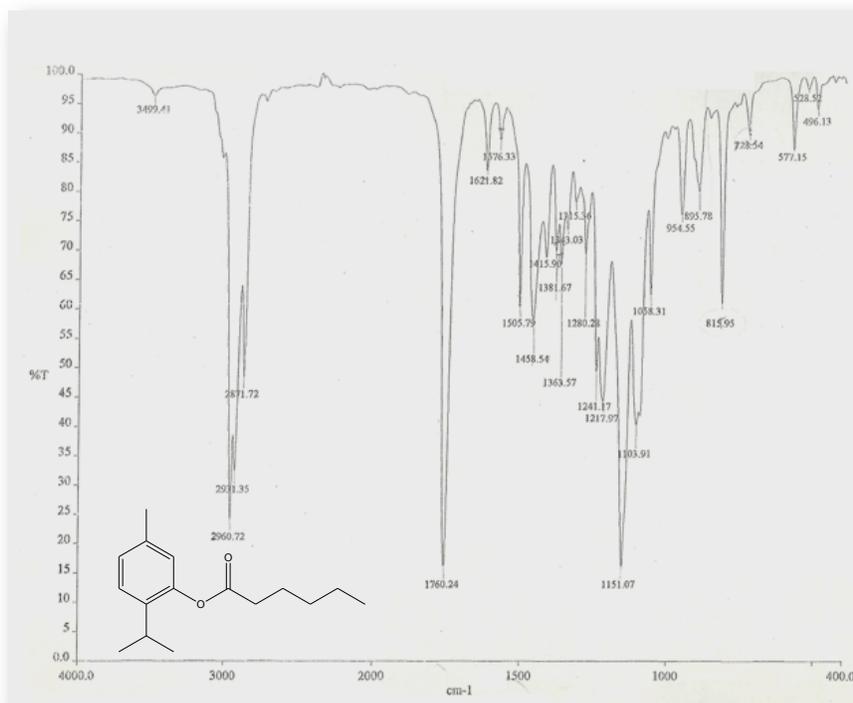
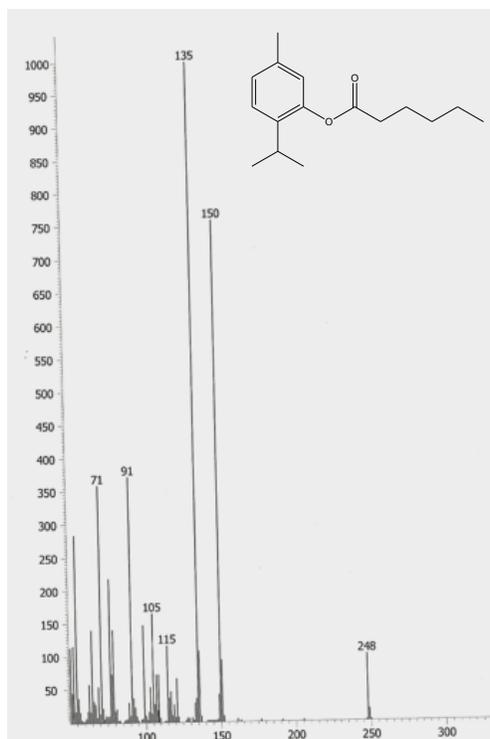
Espectro 24. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **21** (CDCl_3)



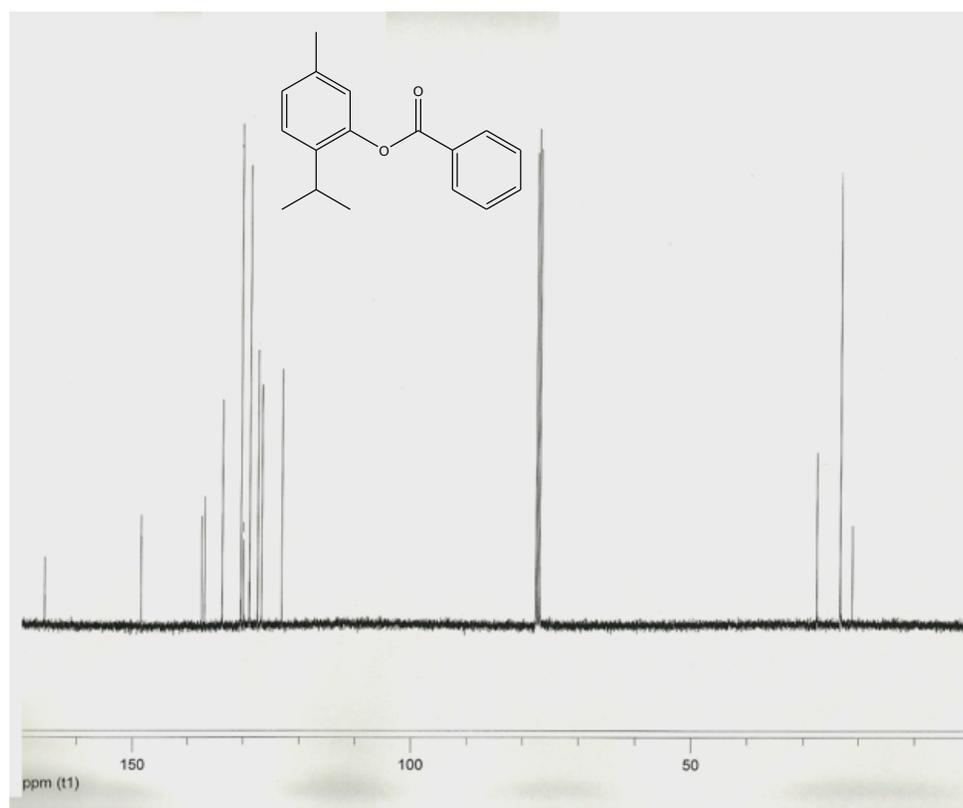
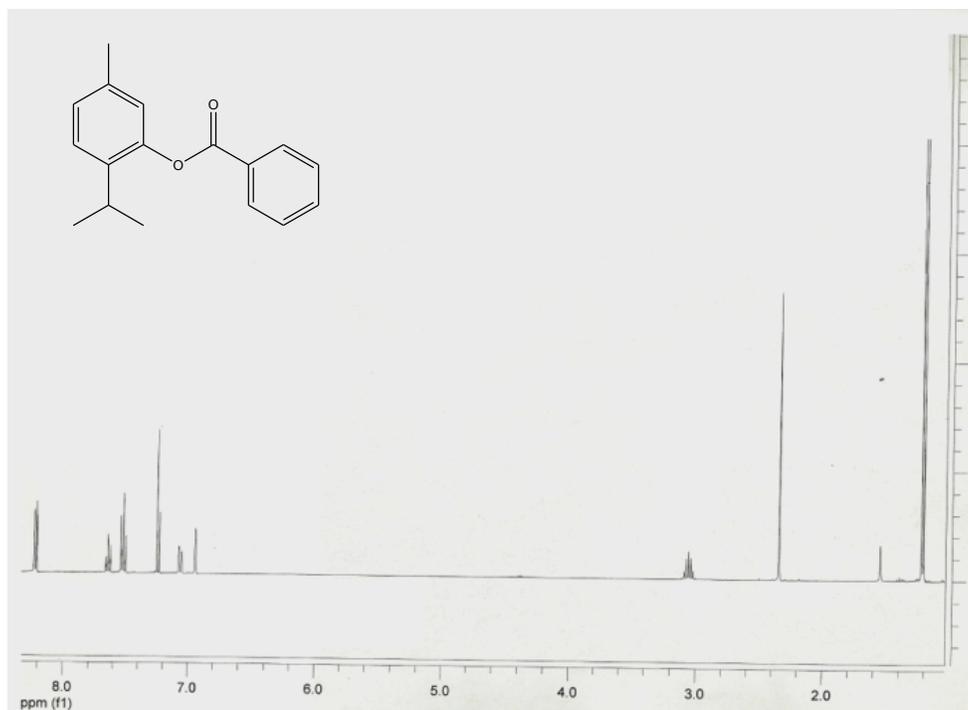
Espectro 25. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **21**



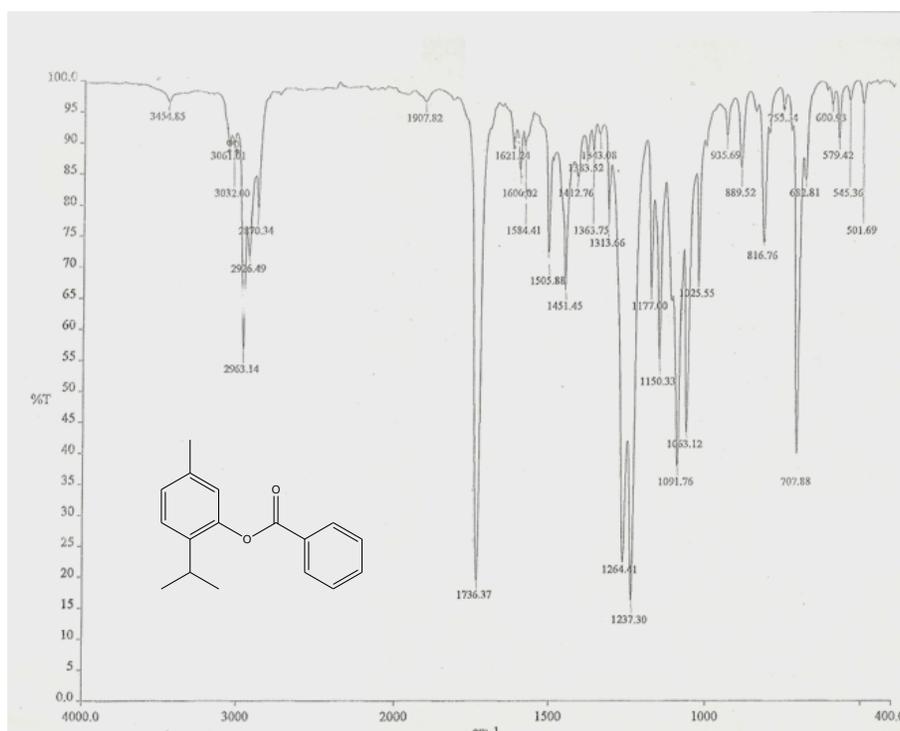
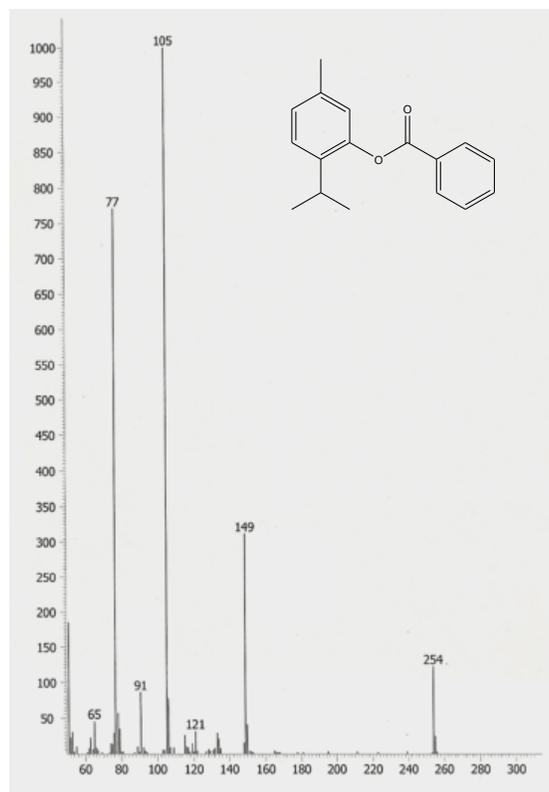
Espectro 26. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **22** (CDCl_3)



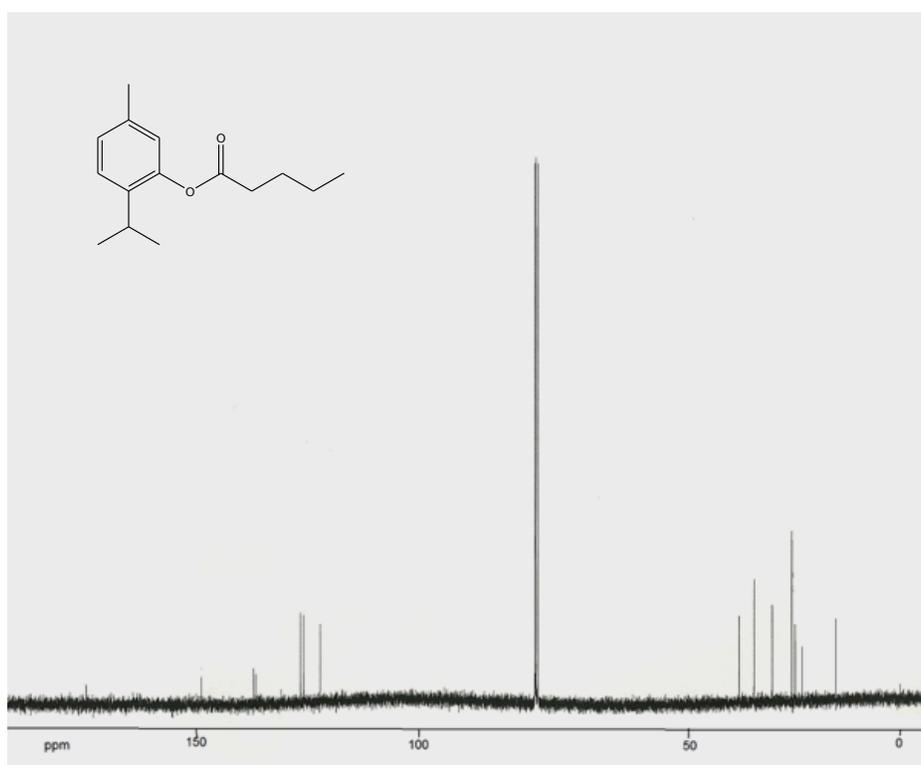
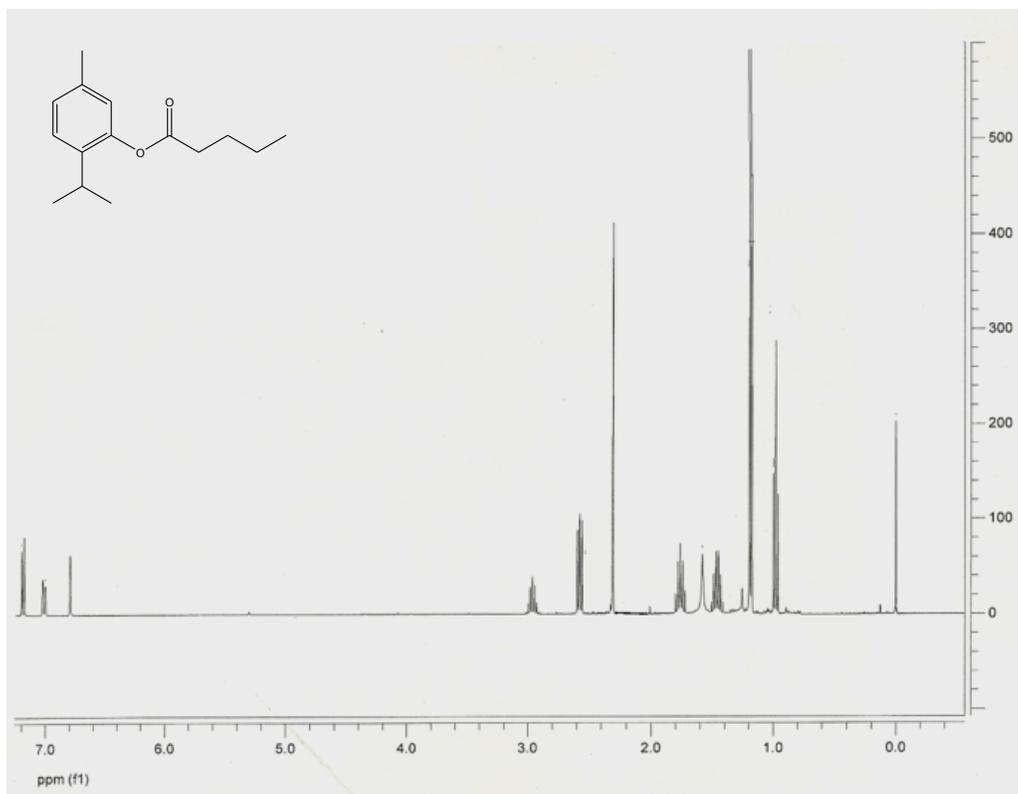
Espectro 27. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **22**



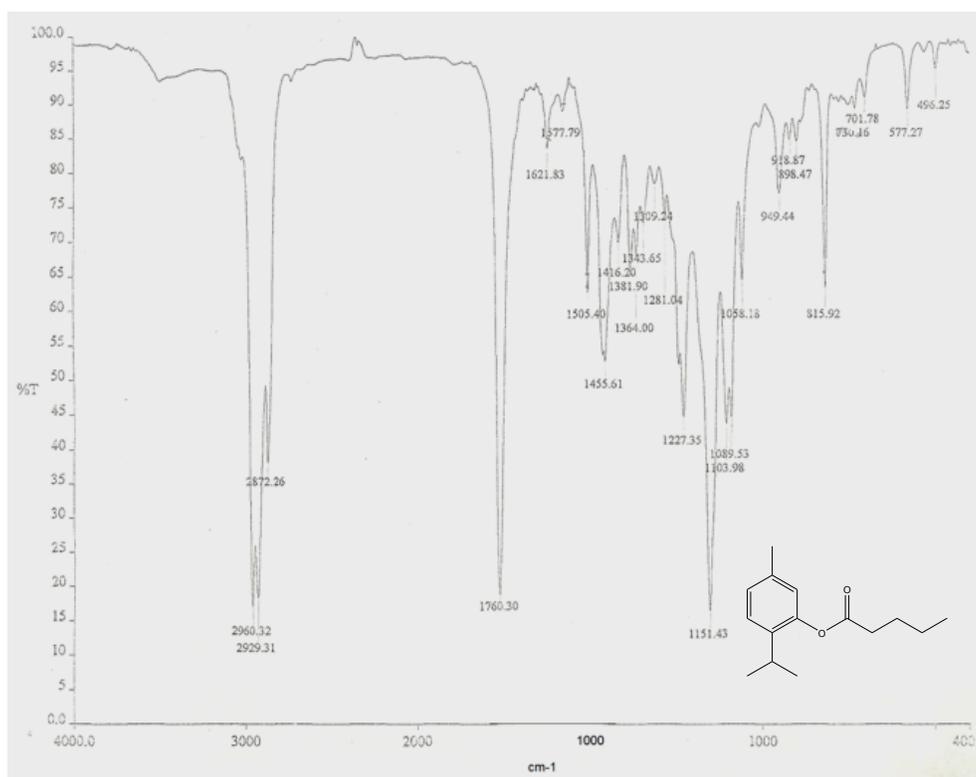
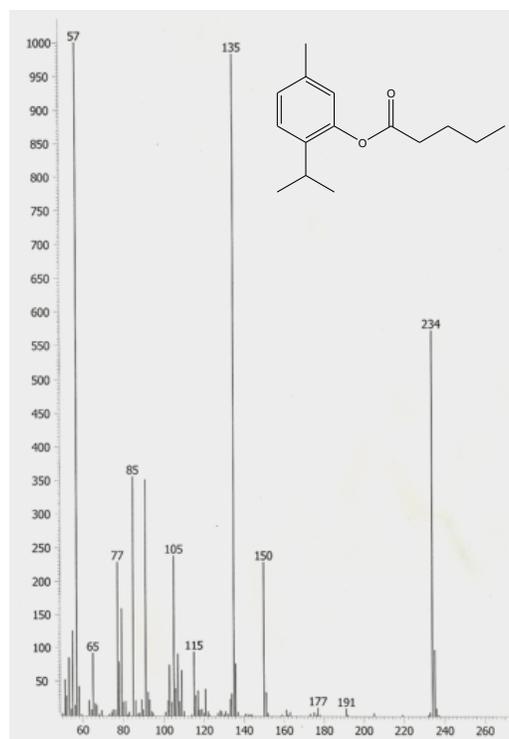
Espectro 28. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **23** (CDCl_3)



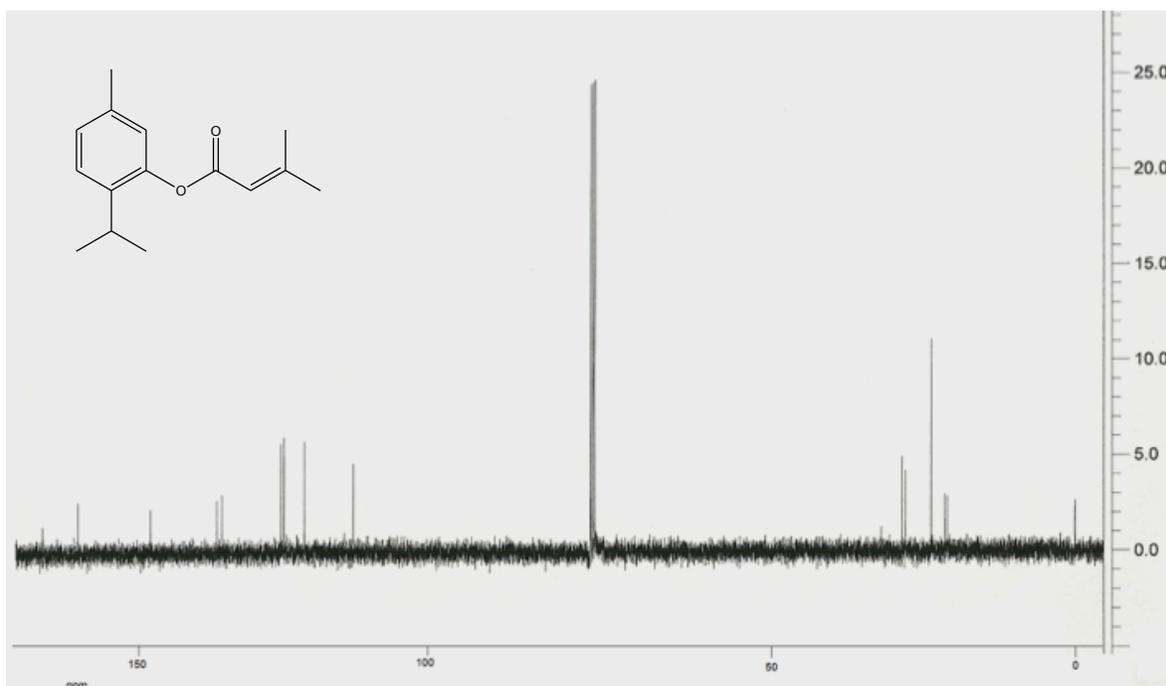
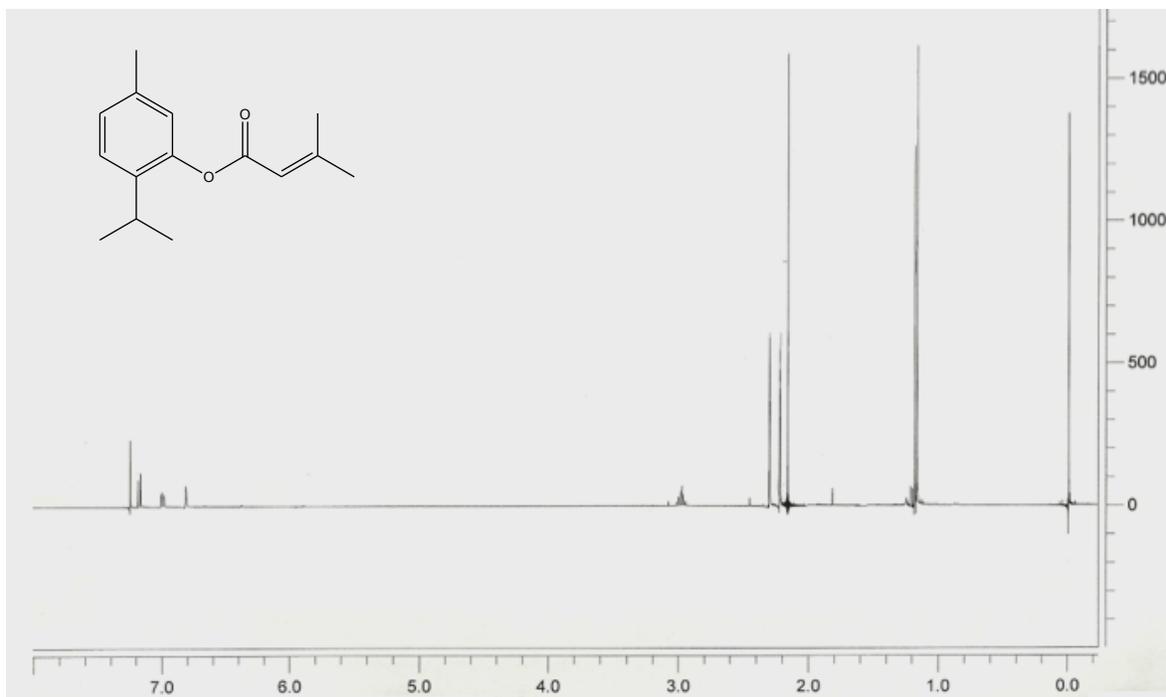
Espectro 29. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **23**



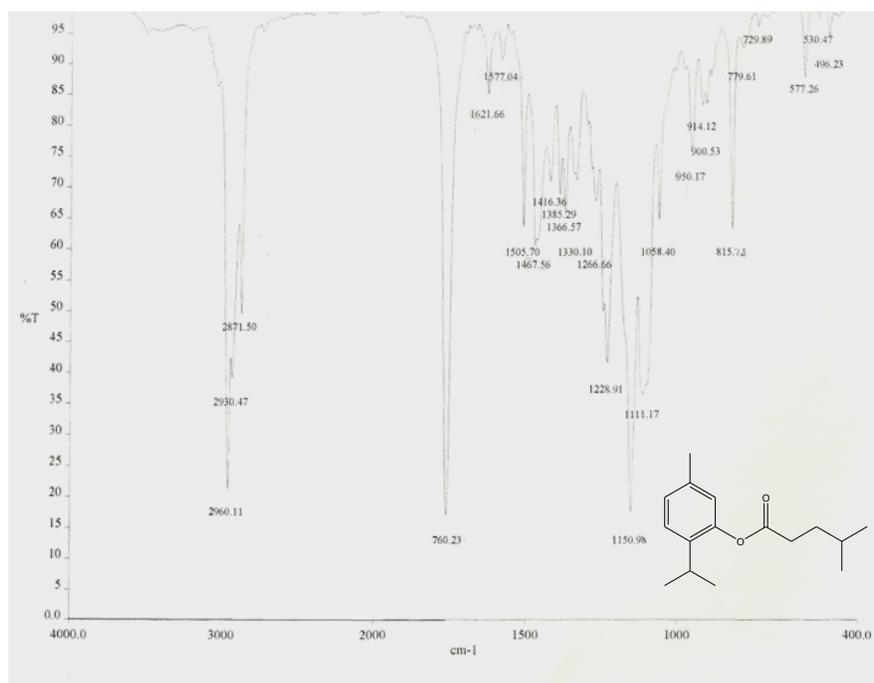
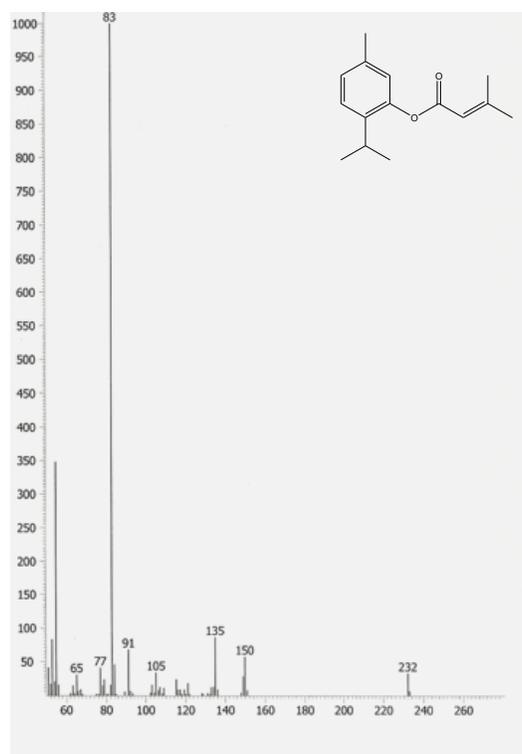
Espectro 30. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **24** (CDCl_3)



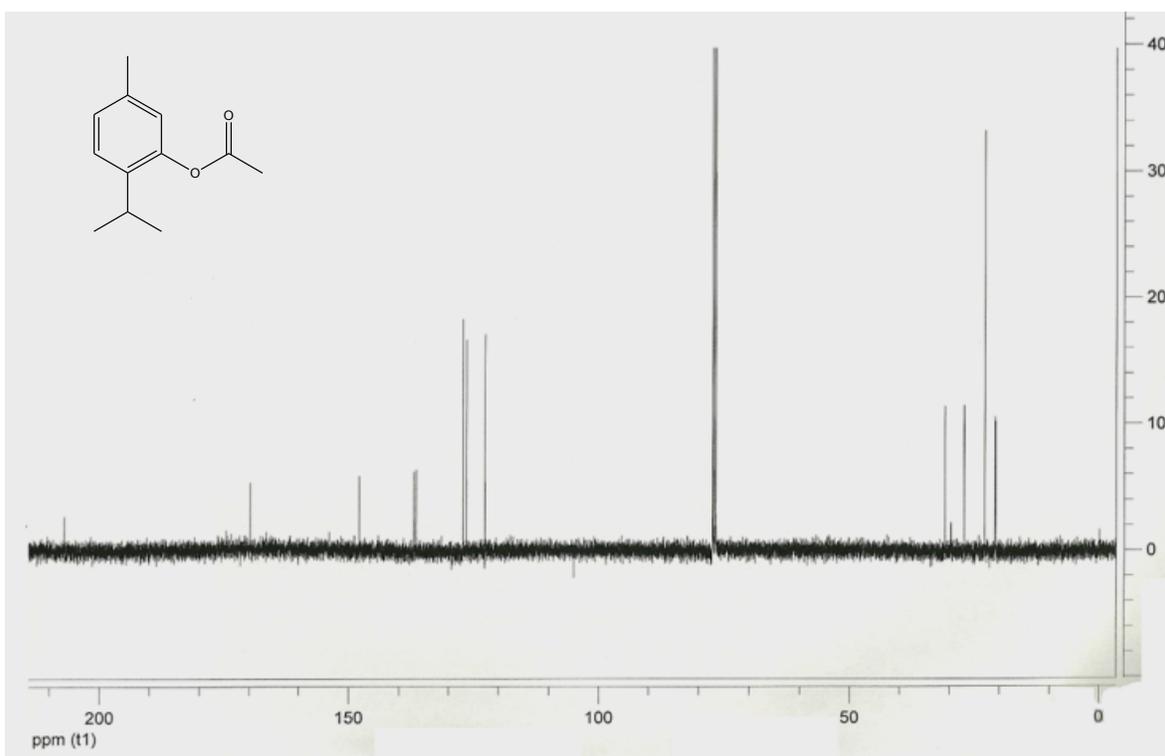
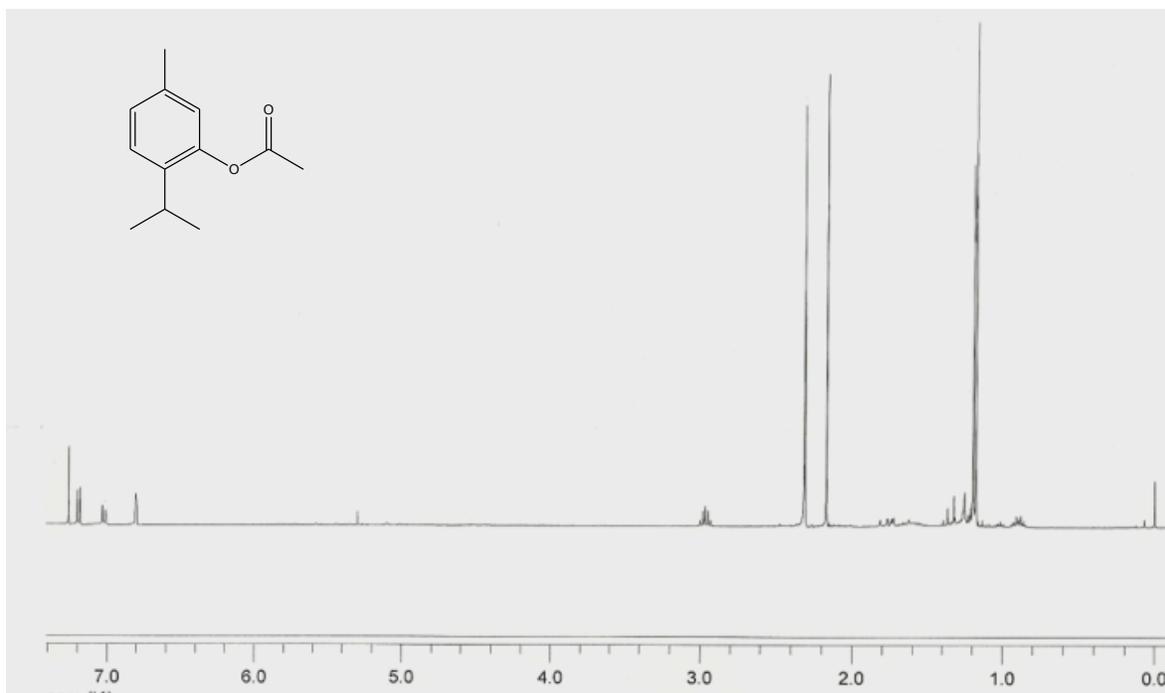
Espectro 31. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **24**



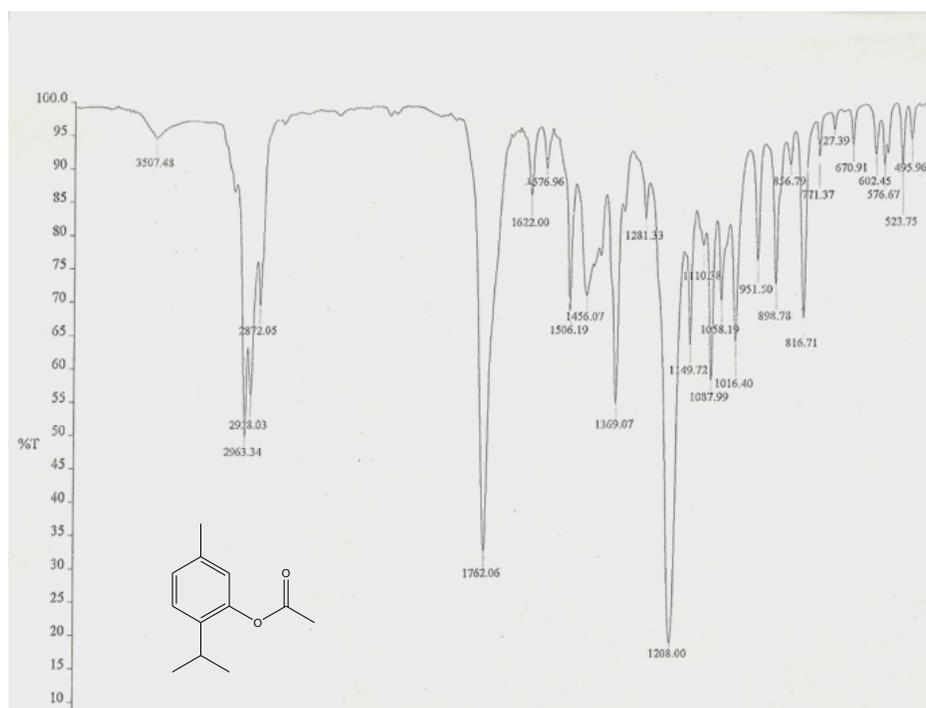
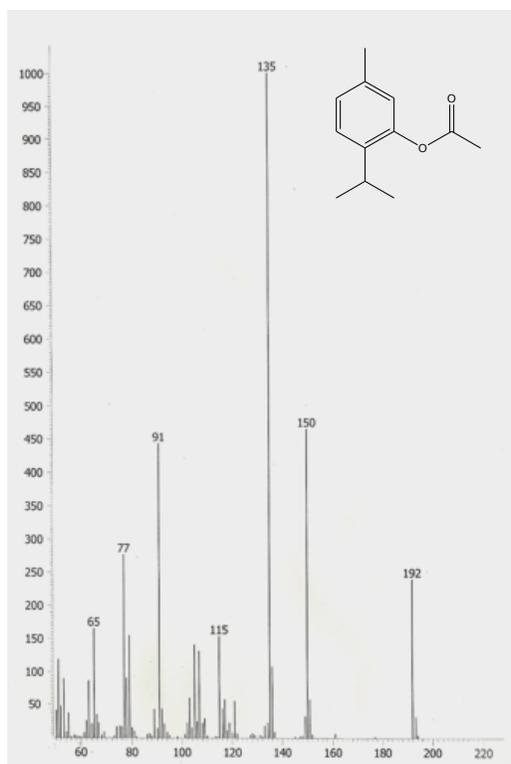
Espectro 32. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **25** (CDCl_3)



Espectro 33. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **25**



Espectro 34. RMN- ^1H (300 MHz) y ^{13}C (75.5MHz) del compuesto **26** (CDCl_3)



Espectro 35. Espectrometría de masas modalidad IE y espectroscopía de IR del compuesto **26**

XI. ANEXO B

Fórmulas para cálculos estadísticos.

Parámetro Estadístico	Fórmula
Coefficiente de correlación	$r = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$
Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}$
Coefficiente de variación	$CV = \left(\frac{S}{y}\right)(100)$
Coefficiente de variación de la regresión	$CV_{y/x} = \left(\frac{S_{y/x}}{y}\right)(100)$
Desviación estándar	$S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Desviación estándar de la ordenada	$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left[\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]}$
Desviación estándar de la pendiente	$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\left[\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \right]}$

Fórmulas para cálculos estadísticos.

Parámetro Estadístico	Fórmula
Desviación estándar de la regresión	$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$
Diferencia absoluta de medias	$ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $
Intervalo de confianza para la media poblacional	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$ $IC(u) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$
Intervalo de confianza para la ordenada al origen	$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_0}$
Intervalo de confianza para la pendiente poblacional	$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$
Límite de cuantificación con base a la curva de calibración y desviación estándar de la regresión	$LC = \frac{(10) \left(S_{y/x} \right)}{b_1}$
Límite de detección con base a la curva de calibración y desviación estándar de la regresión	$LD = \frac{(3.3) \left(S_{y/x} \right)}{b_1}$
Media aritmética	$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}; \quad \bar{y} = \frac{\sum y}{n}; \quad \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n_i}$
Ordenada al origen	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ $\% = \left(\frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \right) (100)$

Fórmulas para cálculos estadísticos.

Parámetro Estadístico	Fórmula
Pendiente	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Suma de x	$\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$
Suma de y	$\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$
Suma de x al cuadrado	$\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$
Suma de y al cuadrado	$\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$
Suma al cuadrado de x	$(\sum x)^2 = \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2$
Suma al cuadrado de y	$(\sum y)^2 = \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2$
Suma de x por y	$\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$
Suma de x por la suma de y	$\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$
% recuperado	$\% = \left(\frac{\text{Cantidad_recuperada}}{\text{Cantidad_adicionada}} \right) (100)$

XII. ANEXO C

CONGRESOS

6ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Irapuato, Guanajuato. México. 21 al 23 de octubre, 2009.. “Pruebas de eficacia e inocuidad de la especie medicinal *Hofmeisteria schaffneri*. (Asteraceae).

51st Annual Meeting American Society of Pharmacognosy. St. Petersburg, Florida. Estados Unidos. 10 Julio al 14 de Julio del 2010. P-3. “Antinociceptive Effect of Extracts and Compounds from *Hofmeisteria schaffneri*.

51st Annual Meeting American Society of Pharmacognosy. St. Petersburg, Florida. Estados Unidos. 10 Julio al 14 de Julio del 2010. P-102. “Antibacterial and Toxic potential of Extracts and Compounds from *Hofmeisteria schaffneri*”.

51st Annual Meeting American Society of Pharmacognosy. St. Petersburg, Florida. Estados Unidos. 10 Julio al 14 de Julio del 2010. P-103. “Antinociceptive Effect and Stability of Several Thymyl Esters”.

QumiUNAM 2010 Auditorio Alfonso Caso, Universidad Nacional Autonoma de México, Noviembre 24-26 , 2010. Modalidad Exposición oral. “*Efecto antinociceptivo de extractos y compuestos de Hofmesiteria schaffneri*.” Fernando Brindis, Martin González-Andrade, Rogelio Rodríguez-Sotres and Rachel Mata.

7ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelia, Michoacán. México. 2011. Cartel C-74. 18 al 20 de mayo, 2011. “Potencia antibacteriano de extractos y compuestos de *Hofmeisteria schaffneri*. (Asteraceae).

7ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Morelia, Michoacán. México. 2011. Presentación Oral O-10. 18 al 20 de mayo, 2011. “Efecto antinociceptivo de extractos y compuestos de *Hofmeisteria schaffneri*. (Asteraceae).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharmAntinociceptive effect of extracts and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*[☆]Guadalupe Angeles-López^a, Araceli Pérez-Vásquez^a, Francisco Hernández-Luis^a, Myrna Déciga-Campos^b, Robert Bye^c, Edelmira Linares^c, Rachel Mata^{a,*}^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 04510, Mexico^b Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 11340, Mexico^c Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México D.F. 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2010

Received in revised form 15 June 2010

Accepted 6 July 2010

Available online 13 July 2010

Keywords:

Hofmeisteria schaffneri

Asteraceae

Acute toxicity

Antinociceptive effect

Stability

Thymol derivatives

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Hofmeisteria schaffneri* (Asteraceae) is a medicinal plant widely commercialized in the most important Markets of Mexico City for the treatment of gastro-intestinal complaints and skin afflictions.

Aim of the study: The main goals of this study were to establish the potential acute toxicity and the antinociceptive activity in animal models of several preparations and compounds from *Hofmeisteria schaffneri*.

Materials and methods: The aqueous and organic extracts as well as the essential oil of *Hofmeisteria schaffneri* were prepared by infusion, maceration and hydrodistillation, respectively. Investigation of the acute toxicity was accomplished by the Lorke method. The antinociceptive effect was assessed using the writhing and the hot plate tests. Natural compounds were isolated by standard phytochemical procedures. In addition, a few thymol esters were prepared by chemical synthesis. The stability of natural and synthetic esters was qualitatively analyzed by measuring their susceptibility to hydrolysis by pig liver esterase and mouse plasma at 37 °C.

Results: The LD₅₀ for each preparation tested was higher than 5000 mg/kg revealing that they were not toxic to mice after exposure for short space of time. On the other hand, the extracts showed significant antinociceptive effect when tested in the hot plate model. The most active natural product as antinociceptive agent was hofmeisterin III (1) which also was the most stable in the stability study. Its pharmacological effect seems to be partially mediated by an opioid mechanism since naloxone inhibits its action. Using compound 1 as a lead molecule, several synthetic thymol esters were prepared and only compounds 13, 15 and 17 were antinociceptive at the dose of 1 mg/kg.

Conclusions: The present investigation provided evidence of the efficacy of several preparations of *Hofmeisteria schaffneri* as antinociceptive agents. The most active preparation was the essential oil which contained large amount of hofmeisterin III (1) and other thymol derivatives. Some novel synthetic analogs of hofmeisterin III with antinociceptive properties were discovered. The nature of the ester chain of these analogs did not have a clear impact on the antinociceptive activity. The phyto-preparations analyzed in this study were not toxic to mice according to the Lorke's test; therefore considering their long term use of the plant they might be secure for human consumption.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In Mexico an important segment of the population relies on botanical raw materials for primary health care, therefore it is very important to investigate these herbs from the pharmacological and toxicological points of view to establish their real efficacy and safety. The results of such investigations will be also useful to integrate the scientific monographs of these plants in order to

promote their rational use. Consequently, the present investigation was undertaken to initiate the preclinical pharmacological and toxicological analyses of *Hofmeisteria schaffneri* (A. Gray) R.M. King & H. Robinson (Asteraceae), a widely commercialized medicinal species in Central Mexico. The infusion prepared from the fresh or dried aerial parts of the plant is highly valued for treating gastro-intestinal complaints, including stomach aches, related or not with irritable bowel syndrome and dyspepsia, and bleeding diarrhea (King, 1967; Mendoza-Castelán et al., 1997; Pérez-Vásquez et al., 2005, 2008). In addition, the plant is highly valued as a topic antiseptic agent.

Previous chemical work of the plant allowed isolation of several thymol and northymol derivatives (Pérez-Vásquez et al., 2005,

[☆] This work was taken in part from the PhD thesis of Guadalupe Angeles-López.

* Corresponding author. Tel.: +52 5 55 622 5289; fax: +52 5 55 622 5329.

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

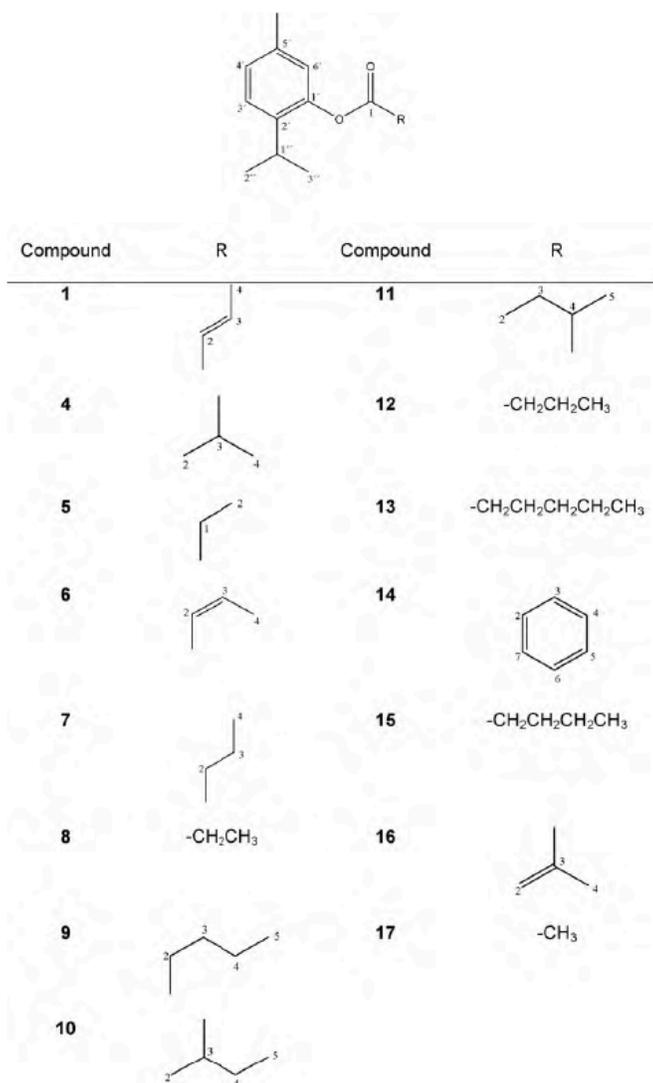


Fig. 1. Structures of thymyl esters.

2008) including hofmeisterin III (1), thymol itself (2) and 8,9-epoxy-10-acetoxythymyl angelate (3) (Figs. 1 and 2). Furthermore, the essential oil and infusion of the plant revealed significant antimicrobial properties against Gram+ bacteria. The antimicrobial essential oil of the plant harvested at different seasons during a year period was also chemically analyzed by GC and capillary GC–MS. Forty four compounds representing ~90% of the total constituents were identified. Compounds 1–3, thymyl isovalerate (4), thymyl isobutyrate (5) were the major components of the oils but only 3 and 5 were active against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* (Pérez-Vásquez et al., submitted for publication).

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The aerial parts of *Hofmeisteria schaffneri* (4 kg) were collected in San Luis Potosi, Mexico on November 2002. An authenticated

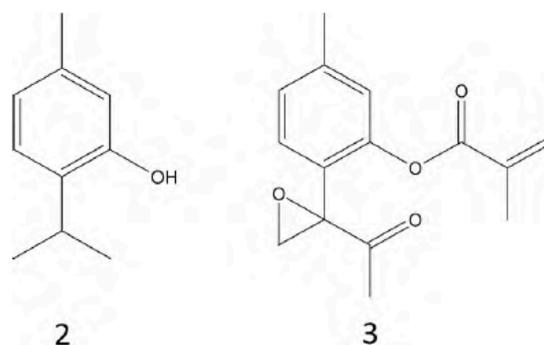


Fig. 2. Structures of thymol (2) and 8,9-epoxy-10-acetoxythymyl angelate (3).

voucher (Bye & Linares 31018) specimen is deposited in the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

2.2. General chemistry procedures

IR (films) spectra were recorded in a Perkin Elmer 59913 spectrophotometer. NMR spectra were registered on a Varian Mercury 300 spectrometer in CDCl₃, at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C) with tetramethylsilane (TMS) as internal standard. Electron impact (EI) mass spectra (MS) were obtained on a JEOL SX 102 mass spectrometer. Open column chromatography: silica gel 60 (0.063–0.200 mm), 70–230 Mesh (Merck). TLC analyses were carried out on silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using a ceric sulphate (10%) solution in H₂SO₄ as color reagent.

2.3. Preparation of organic extract

The organic extract of *Hofmeisteria schaffneri* was obtained from dried and shredded aerial parts (750 g) macerating with CH₂Cl₂–MeOH (1:1) (21 × 3) during 14 days at room temperature. After filtration, the extract was concentrated *in vacuo* to yield 172 g of a greenish residue. Hofmeisterin III (1) (100 mg), thymol (2) (79 mg), and 8,9-epoxy-10-acetoxythymyl angelate (3) (20 mg) were isolated as previously described (Pérez-Vásquez et al., 2008).

2.4. Preparation of the essential oil

Dried aerial parts (500 g) cut in small pieces were hydrodistilled during 3 h using a Clevenger-type apparatus. When the condensed material cooled down, the essential oils were separated from the water by liquid–liquid extraction with CH₂Cl₂ (21 × 3). After removal of the solvent, 0.4 g of the oil was obtained. The oil was stored at 4 °C until analysis (WHO, 1998).

2.5. Preparation of the aqueous extract

The dried aerial parts (900 g) were extracted with boiling water (25 l) during 30 min. The resulting aqueous extract was partitioned with CH₂Cl₂ (25 ml × 3). The organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to yield a brown residue (3.43 g).

2.6. Chemicals and drugs

Morphine (MOR) was a donation from Alfredo Covarrubias Gómez, MD, and Luis Antonio Reyes Vallejo, MD. Dipirone (DIP) was purchased from Laboratorios Pisa (Mexico City); the vehicle (VEH) was prepared with isotonic solution of NaCl and tween 80 (0.05%); pig liver esterase, 4-nitrophenyl acetate (4-NPA), glibenclamide (GLIB), N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), naloxone (NLX), acetic anhydride, valeroic, tiglic, isovaleric, propionic, 3-methylvaleric, 4-methylvaleric, 2-methylbutiric and 3,3-dimethylacrylic acids as well as 2-methylvaleric, butyric, hexanoic, benzoic and isobutyric acid chlorides were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Compounds 4–17 were prepared by synthesis as describe below.

2.7. Synthesis of thymol derivatives

2.7.1. Preparation of acyl chlorides of isovaleric, tiglic, 2-methylbutiric, propionic, 3-methylvaleric, 4-methylvaleric, valeric and 3,3-dimethylacrylic acids

Thionyl chloride (2.5 ml; 0.034 mol) was added drop wise to a stirred solution of appropriate carboxylic acid (0.002 mol) in CH₂Cl₂ (1 ml). The resulting mixtures were refluxed gently for 1 h. In all cases, the excess of thionyl chloride was distilled and the resulting

products were used to prepare esters 4, 6, 7, 8, 10, 11, 15 and 16, respectively.

2.7.2. Thymyl esters 4–16

To a stirred mixture of thymol (0.5 g, 0.003 mol) and 10% aqueous NaOH (4.5 ml) the acid chloride previously obtained was slowly added. In each case, the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. Every reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 ml). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure; the crude products were purified by open column chromatography [silica gel, hexane–EtOAc (98:2)] to yield pure 4–16 (Fig. 1). Compound 14 was obtained as colorless oil in a yield of 70%. The remaining products 4–13 and 15–16 were yellow oils and the yields were 46, 61, 50, 41, 48, 65, 41, 35, 62, 71, 45 and 52%, respectively. The spectral properties of compounds 4–8, 12, 15, and 16 were identical to those previously described (Mathela et al., 2008; Martinez et al., 1988; Paolini et al., 2005, 2007; Schmitz et al., 1979; Rice and Coats, 1994; Viana et al., 1981; Ateeque et al., 2002; Sheng et al., 1984; Kumar et al., 2008, respectively). Compounds 9, 10, 11 and 13 were new chemical entities therefore their NMR (Table 1) and other spectral data are presented in this paper.

Thymyl 2-methylvalerate (9): UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 222 (4.71), 263 (4.36), 271 (4.34), IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2962, 2934, 2873, 1756, 1621, 1506, 1458, 1149, 1127, 815, 730, EI-MS *m/z* (rel. intensity): 248 [M⁺ (12)], 150 (34), 135 (45), 115 (10), 91 (25), 71 (100).

Thymyl 3-methylvalerate (10): UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 222 (4.81), 263 (4.46), 271 (4.44), IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2963, 2930, 2874, 1759, 1621, 1505, 1461, 1148, 954, 815, 577, EI-MS *m/z* (rel. intensity): 248 [M⁺ (11)], 150 (49), 135 (87), 115 (15), 91 (60), 71 (100).

Thymyl 4-methylvalerate (11): UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 222 (4.71), 263 (4.36), 271 (4.23), IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2960, 2930, 2871, 1760, 1621, 1505, 1467, 1150, 950, 815, EI-MS *m/z* (rel. intensity): 248 [M⁺ (20)], 150 (70), 135 (100), 115 (10), 105 (20), 91 (40).

Thymyl hexanoate (13): UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 224 (4.75), 263 (4.40), 271 (4.38), IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2960, 2931, 2871, 1760, 1621, 1505, 1458, 1151, 815, 728, 577, EI-MS *m/z* (rel. intensity): 248 [M⁺ (15)], 150 (75), 135 (100), 115 (10), 105 (15) 91 (35).

2.7.3. Thymyl acetate (17)

In a 50 ml round-bottomed flask, thymol (0.5 g, 0.003 mol), acetic anhydride (1.5 ml, 0.015 mol) and sulphuric acid (0.1 ml, 0.001 mol) were mixed and stirred for 45 min. The reaction mixture was then extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 ml). The organic layer was dried over anhydrous sodium sulphate and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by open column chromatography on silica gel, eluting with hexane–EtOAc (98:2) to yield a yellow oil (72%). Its spectral properties were identical to those previously described by Viana et al. (1981) and Ateeque et al. (2002).

2.8. Qualitative stability test of thymol esters

The stability of esters 1, 4 and 5 toward pig liver esterase (2 mg suspended in 10 ml of distilled water) was estimated using the procedure described by Schlacher et al. (1998). The enzyme activity was qualitatively corroborated by monitoring the production of 4-nitrophenol, yellow, from the colorless 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) (Innocenti et al., 2008). The stock solution, in water–acetonitrile (99:1), of 4-NPA (0.1 mM) was freshly prepared before use. For the analysis, 10 μl solution acetate buffer (pH 5.0) or phosphate buffer (pH 7.4), 100 μl (0.1 mM) of test compound (1, 4 and 5) or positive control (4-NPA, 1 mM) and enzyme preparation (10 μl) were added to Eppendorf tubes (Jewell et al., 2007). The resulting reaction mixtures were shaken for 1 h at 37 °C. Suitable blanks using compounds 1, 4, 5 and 2 were also prepared in

Table 1
¹H and ¹³C (400 MHz and 100 MHz, respectively) NMR spectroscopic data of compounds **9**, **10**, **11** and **13**.

Nuclei	Compounds							
	9		10		11		13	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	–	175.6	–	171.7	–	172.4	–	172.7
2	2.73 m	39.8	2 α 2.35 dd (15.2, 8), 2 β 2.6 dd (14.8, 6)	41.1	2.59 m	32.2	2.5 t (7.6)	34.6
2-CH ₃	1.32 d (7.2)	36.0	–	–	–	–	–	–
3	1.52 m	20.7	1.38 m	31.7	1.68 m	33.5	1.78 m	24.9
3-CH ₃	–	–	1.17 d	19	–	–	–	–
4	1.45 m	17.3	4 α 1.45 m 4 β 1.35 m	29.1	1.71 m	27.4	1.38 m	31.5
4-CH ₃	–	–	–	–	0.98 d (7.2)	21.9	–	–
5	0.98 t (7.2)	14.2	0.97 t (7.4)	10.9	0.98 d (7.2)	21.9	1.38 m	22.5
6	–	–	–	–	–	–	0.92 t (7.2)	14.1
1'	–	148.2	–	147.6	–	147.6	–	148.1
2'	–	137.2	–	136.7	–	136.7	–	137.2
3'	7.19 d (8)	126.4	7.18 d (8)	126.0	7.19 d (8)	126.0	7.17 d (8)	126.5
4'	7.01 br d (8)	127.1	7.0 br d (8)	126.7	7.0 br d (8)	126.7	7.0 br d (8)	127.2
5'	–	136.6	–	136.2	–	136.18	–	136.7
6'	6.77 d (0.8)	122.8	6.78 d (0.8)	122.4	6.79 d (0.8)	122.4	6.78 d (0.8)	122.9
5'-CH ₃	2.30 s	21.0	2.30 s	20.5	2.31 s	20.5	2.30 s	21.0
1''	2.97 h (6.8)	27.1	2.97 h (6.8)	26.7	2.95 h (6.8)	26.7	2.95 h (6.8)	27.2
2''	1.19 d (6.8)	23.1	1.20 d (6.8)	22.7	1.18 d (6.8)	22.7	1.17 d (6.8)	23.2
3''	1.19 d (6.8)	23.1	1.20 d (6.8)	22.7	1.18 d (6.8)	22.7	1.17 d (6.8)	23.2

J values are in parentheses in Hz.

the same conditions but in the absence of the enzyme. In all cases, the test was carried out by triplicate. After incubation, the mixture of each tube was partitioned with 100 μ l CH₂Cl₂; organic phase aliquots were withdrawn and immediately analyzed by TLC on silica gel (hexane–AcOEt 8:2) to detect the presence of **2**. For each compound, the procedure was repeated using incubation periods of 4.5 and 24 h. Finally, the same set of experiments was repeated using mouse plasma instead pig liver esterase.

2.9. Pharmacological and toxicity studies

2.9.1. Animals

ICR male mice weighing 20–25 g were used in the experiments. Mice were purchased from Centro UNAM-Harlan (Harlan México, S.A. de C.V.). They were housed under standard laboratory conditions and maintained on standard pellet diet and water *ad libitum*. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the Mexican Official Norm for Animal Care and Handling (NOM-062-ZOO-1999) and in compliance with international rules on care and use of laboratory animals. After the experiments, all animals were sacrificed in a CO₂ chamber. 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. For the pharmacological studies groups of six animals were used, whereas for the toxicological tests the groups were of three mice. All doses are in mg/kg of body weight.

2.9.2. Acute toxicity study in mice

The treatments were orally administrated in two phases, in both phases four groups with three animals were used; in the first phase, mice were treated with doses of 10, 100 and 1000 mg/kg of the organic extract, essential oil or aqueous extracts; these treatments were suspended in the VEH. In the second phase, the animals received 1600, 2900 and 5000 mg/kg of the treatment according to the Lorke procedure (Lorke, 1983). In both stages, the animals were observed during 14 days. After this period of time, the lungs, heart, stomach and intestines were removed under dissection to detect any macroscopic injury.

2.9.3. Writhing test

The acetic acid-induced writhing test was performed in mice as previously described (Zimmerman, 1983; Williamson et al., 1996). The organic extract (10–316 mg/kg) suspended in the VEH was orally administered 30 min before intraperitoneal (*i.p.*) injection of 0.6% acetic acid. Control animals received a similar volume of VEH or dipirone (DIP, 100 mg/kg) *p.o.* Animals were placed in an observation box, and the abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 30 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal constrictions. The results corresponded to the area under the curve.

2.9.4. Hot plate test

The hot plate apparatus (Ugo Basile, Italy) was used to measure the antinociceptive effect (Zimmerman, 1983; Williamson et al., 1996). Mice were placed into an acrylic cylinder over a heated surface (55.5 \pm 0.2 °C), the time between placement and shaking or licking paws or/and jumping was recorded as latency response. The organic extract (10–562 mg/kg), essential oil (1–100 mg/kg), aqueous extract (10–316 mg/kg), thymol (**2**) (10–100 mg/kg) or thymol derivatives (**1**, **3** and **4–17**) (0.1–17.7 mg/kg) were orally administered 30 min before beginning each experiment. Mice were observed before and 30, 60, 90, 120 and 150 min after each drug administration. A cut off of 30 seconds was used to avoid injury. MOR (3.16 and 5 mg/kg, *i.p.*) was used as positive control. The cumulative antinociceptive effect was determined measuring the area under the curve of the course time (AUC) analysis. Curves were plotting with AUC (trapezoidal method) and doses.

2.9.5. Preliminary studies on the mode of action of hofmeisterin III (1)

Naloxone (NLX, 1 mg/kg, in VEH), glibenclamide (GLIB, 10 mg/kg, in DMSO 2% and VEH) or L-NAME (L-NAME, 30 mg/kg, in VEH) were *i.p.* administrated 15 min before the oral treatment with compound **1** (1 mg/kg). In each case, the antinociceptive effect was recorded as describe above (Déciga-Campos et al., 2007).

2.9.6. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM for the number ($n=6$) of animals in all groups. In all cases the results of treated-animal (com-

pounds, extracts and reference drugs) groups were compared with the VEH groups. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* to determine the source of significant differences where appropriate; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ were considered statistically significant. Prism Graph-Pad (version 4.0) software was used for statistics and plotting.

3. Results and discussion

As part of our investigations dealing with the preclinical efficacy, quality control and safety of selected Mexican medicinal plants, the present study was undertaken to determine the acute toxicity and the antinociceptive action of *Hofmeisteria schaffneri*. The antinociceptive activity was selected on the basis of its extensive use for treating painful complaints. In all cases the primary target for testing was the plant crude extracts considering their similarity with the preparations used in traditional medicine, although some major pure compounds isolated from the plant were also evaluated in order to find out the active principles.

3.1. Acute toxicity

Investigation of the acute toxicity is the first step in the toxicological investigations of herbal drugs. Lorke's method is perhaps the most widely used approach since the experiments are carried out with a minimum number of experimental animals (Lorke, 1983). Thus, to assess any potential toxic effects of the plant mice were treated orally with *Hofmeisteria schaffneri* essential oil as well as with the organic and aqueous extracts using doses in the range of 10–5000 mg/kg. After 14 days, treated mice did not present any visible toxic effect. Furthermore, no lesions or bleedings were observed in internal organs such as lungs, kidneys, liver, heart and stomach. Since no death or damage was observed throughout the experiments, the LD₅₀ for each preparation tested was higher than 5000 mg/kg revealing that they were not toxic to mice after exposure for short space of time.

3.2. Antinociceptive effect using writhing and hot plate tests

The potential antinociceptive effect produced by extracts and essential oil was assessed using two well known models of nociception, the writhing and the hot plate tests. The former is an inflammatory visceral pain model and is very useful to detect painful complaints due to inflammatory disorders of internal organs such as the stomach or intestines (Al-Chaer and Traub, 2002). This method shows good sensitivity for weak analgesics, but shows poor specificity because abdominal constrictions could be suppressed by smooth muscle relaxants so results could be misunderstood. This problem can be overcome using other models of nociception such as the hot plate test. Human preclinical pain tests have frequently employed heat stimulation for physiological, pathological and pharmacological assessments (Arendt-Nielsen and Chen, 2003). In addition, this model measures animal behavior and has good sensitivity and specificity.

Graded doses of the organic extract (10–562 mg/kg, *p.o.*) did not decrease acetic acid induced contortions in mice (Table 2). Therefore, the essential oil and aqueous extracts were not further evaluated.

On the other hand, the organic extract significantly increased ($P < 0.001$) the latency to thermal stimuli when tested at the doses of 177 and 562 mg/kg; the effect was dose-dependent. The essential oil and aqueous extract were also very active in the hot plate test at doses ranging from 1 to 316 mg/kg (Table 3), however, the effect was not dose dependent (Table 3).

Since the essential oil was the most active its major components (Pérez-Vásquez et al., submitted for publication), namely hofmeis-

Table 2
Effect of the organic extract of *Hofmeisteria schaffneri* in the contortions induced by acetic acid.

Treatment	Doses (mg/kg)	AUC ± E.E
VEH		3725 ± 100
Organic extract	316	3440 ± 289.1
	100	3202.5 ± 1033.8
	31.6	4162.5 ± 855.8
	10	3842.5 ± 595
DIP		770 ± 269.9*

Data are expressed as the mean ± SEM for the number ($n = 6$) of animals in every group. ANOVA followed by Dunnett *post hoc* * $P < 0.05$.

terin III (1), thymol (2), 8,9-epoxy-10-acetoxymethyl angelate (3), thymyl isovalerate (4), thymyl isobutyrate (5) were tested at different doses. For this endeavor, compounds 4 and 5 were synthesized by condensing thymol with isovaleryl and isobutyryl chlorides, respectively. The spectral properties of 4 and 5 were identical to those described by Mathela (Mathela et al., 2008). Compounds 1–3 were isolated from the plant material as previously described (Pérez-Vásquez et al., 2008).

Compound 1 (0.1–17 mg/kg) was the most active increasing significantly the latency to thermal stimulus in a dose dependent manner up to the dose of 1 mg/kg. At higher doses (3.16 and 17.7 mg/kg) the effect remains constant (Table 4). The pharmacological effect of 1 was also assessed after pretreatment (15 min before) of mice with NLX (1 mg/kg), a non-selective opiate receptor antagonist, GLIB (10 mg/kg), a Na⁺ channel blocking, or L-NAME (30 mg/kg), an inhibitor of nitric oxide synthase. According to the results in Table 5, L-NAME and GLIB were not able to decrease the antinociceptive activity of 1. However, the effect of 1 was significantly reversed by the treatment with NLX suggesting that its mode of action involves opioids receptors and/or an increment of endogenous opioids.

Compounds 4 and 5 (0.1–17 mg/kg) showed similar activity than hofmeisterin III (1) while 2 (10–100 mg/kg) was less active; finally, compound 3 (0.316–17.7 mg/kg) did not show any activity suggesting that the esterification of the free phenolic group of thymol improved the activity (Table 4). Altogether this information reveals

Table 3
Antinociceptive effect of extracts and essential oil from *Hofmeisteria schaffneri* as detected in the hot plate test.

Treatment	Doses (mg/kg)	AUC ± E.E
VEH		983.1 ± 39.6
Organic extract	31.6	1136.4 ± 62.3*
	56.2	1268.1 ± 65.6*
	100	1381.1 ± 79.9*
	177	1661.6 ± 100.8***
	562	1914.6 ± 117.8***
MOR	3.16	2638.1 ± 200.1***
VEH		983.1 ± 39.6
Aqueous extract	10	1788.7 ± 172.9***
	56.2	1974.4 ± 116.3***
	100	2212.5 ± 61.2***
	177	2107.6 ± 89.3***
	316	2071.9 ± 124***
MOR	3.16	2638.1 ± 200.1***
VEH		1494.5 ± 97.6
Essential oil	1	2280 ± 158**
	3.16	2328.7 ± 152.5***
	17.7	2353.1 ± 124.7***
	31.6	1755.9 ± 138.7
	100	1618.3 ± 126.8
MOR	3.16	3078.7 ± 177.8***

Data are expressed as the mean ± SEM for the number ($n = 6$) of animals in every group. ANOVA followed by Dunnett *post hoc* * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Table 4
Antinociceptive effect of compounds **1–5**, **13**, **15** and **17** as detected in the hot plate test.

Treatment	Doses (mg/kg)	AUC ± E.E
VEH		1494.5 ± 97.6
Hofmeisterin III (1)	0.1	1775.6 ± 85.7
	0.316	1976.2 ± 78*
	1	2460 ± 83.7***
	3.16	2465.6 ± 61.3***
	17.7	2546.2 ± 114.4**
MOR	3.16	3078.7 ± 177.8***
VEH		1726.9 ± 84.5
Thymol (2)	1	1427.4 ± 169.5
	10	2116.9 ± 68.1
	56.2	2096.2 ± 133.5
	100	2420.6 ± 102.6**
MOR	3.16	2783.1 ± 148.3***
VEH		1547.3 ± 116.7
8,9-Epoxy-10-acetoxythymyl angelate (3)	0.316	1778.3 ± 108.7
	1	1804 ± 107.7
	3.16	1662.7 ± 166.5
	17.7	1790.9 ± 189.9
MOR	3.16	2371.6 ± 122.1***
VEH		1597.6 ± 52.2
4	0.1	1889.2 ± 271.4
	0.316	2196.2 ± 141*
	1	2245.4 ± 178.1*
	17.7	2114.1 ± 113.1*
MOR	5	3372.8 ± 100***
VEH		1483.3 ± 91.6
5	0.316	1474.9 ± 260.8
	1	1998.8 ± 86.1*
	3.16	1964.1 ± 207.6*
	17.7	1948.6 ± 125*
MOR	5	3221.4 ± 133.4***
VEH		1483.3 ± 91.6
13	0.316	1642.7 ± 281.8
	1	1986 ± 55.3*
	17.7	1709.8 ± 86.9
MOR	5	3221.4 ± 133.4***
VEH		1371.4 ± 120
15	0.316	1773.4 ± 122.6
	1	2253.3 ± 133.7**
	17.7	1759.6 ± 209.2
MOR	5	2900.9 ± 178***
VEH		1371.4 ± 120
17	0.316	1670.7 ± 62.1
	1	2101 ± 223.9**
	17.7	1775.1 ± 74.1
MOR	5	2900.9 ± 180***

Data are expressed as the mean ± SEM for the number (n=6) of animals in every group. ANOVA followed by Dunnett post hoc *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

that the thymyl esters of *Hofmeisteria schaffneri* are responsible of the antinociceptive activity of the different preparations tested in this work.

Thymol (**2**) was only active at the dose of 100 mg/kg, however it has been previously shown that this compound partially block

Table 5
Antinociceptive effect of hofmeisterin (**1**) from *Hofmeisteria schaffneri* in the presence of GLIB (10 mg/kg), NLX (1 mg/kg) or L-NAME (30 mg/kg).

Treatment	AUC ± E.E
VEH	1373.7 ± 78.2
1 (1 mg/kg)	1950.2 ± 123.4**
1 (1 mg/kg) + GLIB (10 mg/kg)	1716.7 ± 433.7*
1 (1 mg/kg) + NLX (1 mg/kg)	1380 ± 96.2
1 (1 mg/kg) + L-NAME (30 mg/kg)	1817.9 ± 314.6**
MOR (3.16 mg/kg)	3070 ± 96.2***

Data are expressed as the mean ± SEM for the number (n=6) of animals in every group. ANOVA followed by Dunnett post hoc *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

voltage-operated Na⁺ (Haeseler et al., 2002) and K⁺ (Elliot and Elliot, 1997) channels and directly activates γ -aminobutyric acid GABA_A receptors (Mohammadi et al., 2001). It was also suggested that the demonstrated effects accounted for its pain-reliever properties and contributed to its sedative–hypnotic actions (Haeseler et al., 2002). On the other hand, thymol inhibited prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp. This inhibition was reversible and probably related with the analgesic effect of thymol in endodontic therapy (Anamura et al., 1988). Furthermore, Beer et al. (2007) speculated that thymol could have analgesic effect due to its agonistic effect on α 1-, α 2- and β -adrenergic receptors.

3.3. Antinociceptive effect of thymol derivatives (**6–17**) in hot plate test

Structural modification of a lead molecule could improve its efficacy since the pharmacokinetics parameters as well as the interaction with the molecular targets could be improved. Therefore, 12 analogs of compound **1**, namely **6–17**, were prepared condensing thymol with the corresponding acid chlorides in a single step reaction. The resulting esters were then evaluated in the same pharmacological model. Compounds **9**, **10**, **11** and **13** are new chemicals entities but compounds **6** (Paolini et al., 2005), **7** (Schmitz et al., 1979; Paolini et al., 2007), **8** (Rice and Coats, 1994; Ateeque et al., 2002), **12** and **14** (Viana et al., 1981; Ateeque et al., 2002), **15** (Sheng et al., 1984), **16** (Kumar et al., 2008) and **17** (Viana et al., 1981; Ateeque et al., 2002) have been reported as natural or synthetic products and their spectral data are in agreement with those previously described. Compounds **9–11** and **13** were identified by spectral means. In all cases their IR exhibited the typical phenolic ester carbonyl at \sim 1760 cm⁻¹. The NMR spectra (Table 1) were very similar to those of the other thymyl esters under study with the aromatic region displaying the characteristic ABX system of the trisubstituted benzene ring of thymol (Table 1). The spectra differed only in the resonances due to the acid residues which were easily assigned to a tiglic, 2-methylvaleric, 3-methylvaleric, 4-methylvaleric and hexanic acids, respectively by comparison with the information previously reported for similar structures (Mathela et al., 2008; Martinez et al., 1988; Paolini et al., 2005, 2007; Schmitz et al., 1979; Rice and Coats, 1994; Viana et al., 1981; Ateeque et al., 2002; Sheng et al., 1984; Kumar et al., 2008).

Testing all analogs (**6–17**) at three different doses in the range of 1–17.7 mg/kg revealed that only compounds **13**, **15** and **17** were active. These results indicated that the nature of the ester chain did not have a clear impact on the antinociceptive activity (Table 4).

Considering that the stability of drugs in biological systems plays an important role in their activity (Di et al., 2005) and that degradation of drug esters in biological matrices is mainly attributed to their hydrolysis by esterases, the stability *in vitro* of the most active (**1**, **4** and **5**), and one inactive (**6**) thymyl esters was assessed during 24 h. The stability study was qualitatively performed measuring the susceptibility to hydrolysis of esters **1** and **4–6** in the presence of a commercial pig liver esterase solutions in two buffers (pH 7.4 and 5.0) as well as in mouse plasma at 37 °C (Di et al., 2005). The hydrolysis of the esters was monitored on a period of 24 h by TLC.

According to the results summarized Table 6, in general, the ester compounds were unstable in blood plasma; only compound **1** was stable during the first hour of the experiment. In the presence of the enzyme the degradation time was different for each compound. Thus, compound **1** was stable in the control solutions (pH 5.0 and 7.4) throughout the experiment; however, it was totally hydrolyzed in the enzymatic solution (pH 7.4) and mouse plasma after 4.5 h. On the other hand, at pH 5.0 this compound was partially hydrolyzed after the same period of time and completely hydrolyzed after 24 h. These results suggested that compound **1** could have an acceptable stability in the gastro-intestinal tract.

Table 6
In vitro stability of thymol esters derivatives toward pig liver esterase.

Compounds	pH 7.4						pH 5.0						Mouse plasma						
	1 h		4.5 h		24 h		1 h		4.5 h		24 h		1 h		4.5 h		24 h		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
1	–	–	++	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	++	++	++	++	++	–	–	–	–	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
5	+	–	++	+	++	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	++	–	++	–	++	++	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4NPA	++	–	++	–	++	–	–	–	–	++	–	++	–	++	–	++	–	++	–

A: esterase or mouse plasma; B: buffer or distilled water; h: hours.
 –: not hydrolyzed; +: partially hydrolyzed; ++: totally hydrolyzed.

Compound **5** was stable in buffer solution at pH 5.0 but partially hydrolyzed at pH 7.4 after 4.5 h. With regard to mouse plasma and enzymatic solutions, this compound was totally hydrolyzed at 1 and 4.5 h, respectively. Therefore one would expect a similar gastrointestinal stability than for compound **1**. Finally, esters **4** and **6** were completely hydrolyzed in all test conditions; this result raised the possibility that these compounds might hydrolyze before intestinal absorption.

On the whole, the results indicated that the better antinociceptive activity of compounds **1** and **5** could be partially due to a better stability, however in the case of **4** other factors might be involved such as a better absorption *in vivo*, although substrate specificity differences *in vitro* could not be ruled out. Further work is in progress to determine the bioavailability of these esters *in vivo*.

4. Conclusions

The present investigation provided evidence of the efficacy of several preparations of *Hofmeisteria schaffneri* as antinociceptive agents. The most active preparation was the essential oil which contained large amount of hofmeisterin III (**1**) and other thymyl derivatives. According to the experimental results, ester **1** was the major antinociceptive active principle of the essential oil. Its pharmacological effect seems to be partially mediated by an opioid mechanism since naloxone inhibits its action. In addition, this compound was more effective as antinociceptive agent than several synthetic and natural analogs discovered in the present work; and although it was not possible to establish a clear structure–activity relationship, the stability tests revealed that **1** is less susceptible to enzymatic degradation and, probably more bioavailable than the remaining analogs tested in this investigation.

The phyto-preparations analyzed in this study were not toxic according to the Lorke's test, therefore the plant they might be secure for human consumption considering its long term use and the lack of acute toxicity for mice.

Altogether, the antinociceptive effect demonstrated in this work for *Hofmeisteria schaffneri* and some of its metabolites are in agreement with the popular use of this species in Mexican folk medicine for the treatment of painful stomach complaints.

Acknowledgements

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN218110-3) and CONACYT (99395). We thank Isabel Rivero for its valuable technical assistance. E. Linares and R. Bye acknowledge the assistance of their collaborators in the State of Mexico as well as the support through grants from Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza and The New York Botanical Garden (PREVELAC) during the initial phase of the project. G. Angeles-López acknowledges a fellowship from CONACYT.

References

- Al-Chaer, E.D., Traub, R.J., 2002. Biological basis of visceral pain: recent developments. *Pain* 96, 221–225.
- Anamura, S., Dohi, T., Shirakawa, M., Okamoto, H., Tsujimoto, A., 1988. Effects of phenolic dental medicaments on prostaglandin synthesis by microsomes of bovine tooth pulp and rabbit kidney medulla. *Archives of Oral Biology* 33, 555–560.
- Arendt-Nielsen, L., Chen, A.C.N., 2003. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptors in human. *Clinical Neurophysiology* 33, 259–268.
- Ateeque, A., Aggarwal, K.K., Suchil, K., 2002. Carbon-13 and proton NMR shift assignments of some thymol derivatives. *Indian Perfumer* 46, 145–151.
- Beer, A.M., Lukanov, J., Sagorchev, 2007. Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 14, 65–69.
- Déciga-Campos, M., Palacios-Espinosa, J.F., Reyes-Ramírez, A., Mata, R., 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. *Journal of Ethnopharmacology* 114, 161–168.
- Di, L., Kerns, E.H., Hong, Y., Chen, H., 2005. Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *International Journal of Pharmaceutics* 297, 110–119.
- Elliot, A.A., Elliot, J.R., 1997. Voltage-dependent inhibition of RCK1 K⁺ channels by phenol, p-cresol, and benzyl alcohol. *Molecular Pharmacology* 51, 475–483.
- Haeseler, G., Maue, D., Grosskreutz, J., Bufler, J., Nentwig, B., Piepenbrock, S., Dengler, R., Leuwer, M., 2002. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *European Journal of Anesthesiology* 19, 571–579.
- Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., Puccetti, L., De Simone, G., Supuran, C.T., 2008. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 18, 2267–2271.
- Jewell, C., Prusakiewicz, J.J., Ackermann, C., Payne, N.A., Fate, G., Williams, F.M., 2007. The distribution of esterases in the skin of the minipig. *Toxicology Letters* 173, 118–123.
- King, R., 1967. Studies in the Eupatorieae (Compositae) IV. *Hofmesiteria*. *Rodora* 69, 352–371.
- Kumar, A., Singh, S.P., Chhokar, S.S., 2008. Thymol and its derivatives as antimicrobial agents. *Natural Product Communications* 3, 823–828.
- Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology* 54, 276–287.
- Martínez, M., Naveda-Díaz, V.E., Joseph-Nathan, P., 1988. Thymol derivatives from *Calea zacatechichi* Schdl. *Revista Latinoamericana de Química* 19, 56–57.
- Mendoza-Castelán, G., García-Pérez, J., Estrada-Lugo, E., 1997. Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el Mercado de Sonora. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco, p. 136.
- Mathela, C.S., Tiwari, A., Padalia, R.C., Chanotiya, C.S., 2008. Chemical composition of *Inula cuspidate* C.B. Clarke. *Indian Journal of Chemistry* 47B, 1249–1253.
- Mohammadi, B., Haeseler, G., Leuwer, M., Dengler, R., Krampfl, K., Bufler, J., 2001. Structural requirements of phenol derivatives for direct activation of chloride currents via GABA_A receptors. *European Journal of Pharmacology* 421, 85–91.
- NOM-062-ZOO-1999. Secretaría de Salud Norma Oficial Mexicana, 1999. México.
- Paolini, J., Costa, J., Bernardini, A.F., 2005. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1076, 170–178.
- Paolini, J., Muselli, A., Bernardini, A.F., Bighelli, A., Casanova, J., Costa, J., 2007. Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 479–487.
- Pérez-Vásquez, A., Reyes, A., Linares, E., Bye, R., Mata, R., 2005. Phyto-toxins from *Hofmeisteria schaffneri*: isolation and synthesis of 2'-(2'-hydroxy-4'-methylphenyl)-2'-oxoethyl acetate. *Journal of Natural Products* 68, 959–962.
- Pérez-Vásquez, A., Linares, E., Bye, R., Cerda-García-Rojas, C.M., Mata, R., 2008. Phyto-toxic activity and conformational analysis analogs from *Hofmeisteria schaffneri*. *Phytochemistry* 69, 1339–1347.

- Pérez-Vásquez, A., Capella, S., Linares, E., Bye, R., Angeles-López, G., Mata, R., submitted for publication. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Hofmeisteria schaffneri*. Journal of Pharmacy and Pharmacological.
- Rice, P.J., Coats, J.R., 1994. Structural requirements for monoterpenoid activity against insects. Symposium Series 557, 92–108.
- Schlacher, A., Stanzer, T., Osprian, I., Mischitz, M., Klingsbichel, E., Faber, K., Schwab, H., 1998. Detection of a new enzyme for stereoselective hydrolysis of linalyl acetate using simple plate assays for the characterization of cloned esterases from *Burkholderia gladioli*. Journal of Biotechnology 62, 47–54.
- Schmitz, R., Schaden, G., Horst, K., 1979. Thymyl esters of 2-methylbutyric and 3-methylbutyric acids in the essential oils from subterranean parts of *Arnica alpina* (L.) Olin. Archiv der Pharmazie 312, 65–68.
- Sheng, P., Ding, J., Wu, Y., Niu, F., 1984. Constituents of the essential oil of *Cyathocline purpurea*. Acta Botanica Yunnanica 6, 223–228.
- Viana, G.S.B., Matos, F.F., Matos, F.J., Silveira, E.R., Craveiro, A.A., Alencar, J.W., 1981. Pharmacological effects of thymol and its acetate, butyrate, and benzoate esters. Ciencia e Cultura 33, 104–106.
- Williamson, E.M., Okpako, D.T., Evans, F.J., 1996. Pharmacology Methods in Phytotherapy Research. John Wiley and Sons, New York, p. 228.
- WHO, 1998. Quality Control for Medicinal Plant Materials. WHO publications, Geneva, p. 117.
- Zimmerman, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 16, 109–110.