



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**“PRUEBAS DE EFICACIA, IDENTIDAD Y SEGURIDAD DE LA ESPECIE MEDICINAL
Ligusticum porteri (APIACEAE)”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. KRUTZKAYA JUÁREZ REYES



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG AÑO: 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Vocal	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dr. Samuel Enoch Estrada Soto
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

Lugar donde se realizó la tesis:

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

Q.F.B. Krutzkaya Juárez Reyes
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que mediante el posgrado en ciencias químicas me ha permitido ampliar mi formación académica y profesional.

Al CONACyT por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de maestría mediante la beca con número 240011.

Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por los apoyos otorgados para realizar este trabajo. Proyectos: DGAPA-UNAM (IN218110) y CONACyT 99395.

A la Dra. Rachel Mata por la paciencia, el tiempo invertido en el desarrollo de este proyecto de tesis y por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación.

A los miembros del jurado asignado para la revisión de este proyecto de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

A la M en C. Isabel del Carmen Rivero y a la Dra. Araceli Pérez, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Robert Bye del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.

A la Q. Georgina Duarte Lisci, por su valioso apoyo durante la realización de los análisis de CG-EM y la búsqueda realizada en la base de datos para determinar la composición del aceite esencial y de los compuestos volátiles de la planta.

Dedicatorias

Índice

Índice	I
I. Lista de abreviaturas	VI
II. Lista de figuras	IX
III. Lista de tablas y esquemas	XIII
1. Resumen	1
1.1. Abstract	3
2. Antecedentes	5
2.1. <i>Ligusticum porteri</i>	5
2.1.1. Generalidades sobre la especie <i>Ligusticum porteri</i>	5
2.1.2. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos	10
2.2. Importancia de las monografías tipo OMS de plantas medicinales	21
2.3. Importancia del establecimiento de los parámetros de eficacia, seguridad y calidad de las plantas medicinales	27
3. Justificación, objetivos e hipótesis	33
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivos particulares	33
3.3. Hipótesis	34
4. Parte experimental	35



4.1. Material vegetal	35
4.2. Procedimientos generales de análisis	35
4.2.1. Análisis cromatográficos	35
4.3. Preparación de extractos a partir de la especie <i>Ligusticum porteri</i>	37
4.3.1. Preparación del extracto orgánico	37
4.3.2. Preparación de la infusión	37
4.3.3. Obtención del aceite esencial	38
4.4. Pruebas de identidad	38
4.4.1. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	38
4.4.2. Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de Headspace (espacio de cabeza) Microextracción en Fase Sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF)	38
4.5. Aislamiento y purificación de los compuestos <i>Z</i> -3-butilidenftálida (3), <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (6)	39
4.5.1. Fraccionamiento preliminar	39
4.5.2. Aislamiento de los compuestos <i>Z</i> -3-butilidenftálida (3), <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (6) a partir de la fracción de hexano primaria de <i>L. porteri</i>	40
4.5.3. Purificación de los compuestos 1, 3 y 6	40
4.6. Estudios de seguridad preclínica	42
4.6.1. Estudios de toxicidad aguda de la infusión y el aceite esencial	42

4.7. Estudios de eficacia preclínica	43
4.7.1. Potencial antinociceptivo utilizando las pruebas de placa caliente, estiramiento abdominal y tránsito intestinal	43
4.7.1.1. Potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos <i>Z</i> -3-butilidenftálida (3), <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (6) obtenidos de la especie <i>Ligusticum porteri</i> en la prueba de placa caliente	43
4.7.1.2. Potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos <i>Z</i> -3-butilidenftálida (3), <i>Z</i> -ligustílida (1) y diligustílida (6) obtenidos de la especie <i>Ligusticum porteri</i> en la prueba de estiramiento abdominal	44
4.7.1.3. Potencial espasmolítico de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y el compuesto diligustílida (6) obtenidos de la especie <i>Ligusticum porteri</i> en la prueba de tránsito intestinal	45
4.7.2. Evaluación del potencial antidiabético del aceite esencial y la infusión de <i>L. porteri</i>	46
4.7.2.1. Selección del modelo de inducción de la condición diabética en los animales de experimentación	46
4.7.2.2. Determinación de los niveles de glucosa sanguínea	46
4.7.2.3. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo	47
4.7.2.4. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral	47

(OGTT)	
4.7.2.5. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral (OSTT)	48
4.8. Análisis estadístico	49
5. Resultados y discusión.	50
5.1. Pruebas de identidad	50
5.1.1. Análisis del aceite esencial de <i>L. porteri</i> por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	51
5.1.2. Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de Headspace (espacio de cabeza) Microextracción en Fase Sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF)	58
5.2. Ensayos de seguridad preclínica	65
5.2.1. Estudios de toxicidad aguda de la infusión y el aceite esencial	65
5.3. Estudios de eficacia preclínica	67
5.3.1. Pruebas para determinar el potencial antinociceptivo	67
5.3.1.1. Evaluación del potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos Z-3-butilidenoftálica (3), Z-ligustílica (1) y diligustílica (6) obtenidos de la especie <i>Ligusticum porteri</i>	67
5.3.1.2. Potencial espasmolítico de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y el compuesto diligustílica (6) obtenidos de la especie <i>Ligusticum porteri</i> en la prueba de tránsito intestinal.	77



5.3.2. Evaluación del potencial antidiabético del aceite esencial y la infusión de <i>L. porteri</i>	81
5.3.2.1. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo del aceite esencial	82
5.3.2.2. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) del aceite esencial	83
5.3.2.3. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral (OSTT) del aceite esencial	83
5.3.2.4. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral (OSTT) de la infusión	84
6. Conclusiones	94
7. Perspectivas	96
8. Bibliografía	97
9. Anexos	109

I. Lista de Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µmol	Micro mol
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
AHPA	American Herbal Products Association (Asociación Americana de Productos a Base de Plantas)
ANADEVA	Análisis de varianza
CAR	Carboxen
CC	Cromatografía en columna
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CL ₅₀	Concentración letal media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
dL	Decilitro



DL ₅₀	Dosis letal media
DVB	Divinilbenceno
EEM	Error estándar de la media
eV	Electronvolts
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
FM	Fórmula Molecular.
G	Gramos
G _f	Glucemia al tiempo n
G _i	Glucemia al tiempo cero
H ₂ O	Agua
HS	Headspace (Espacio de cabeza)
<i>i.p.</i>	Administración intraperitoneal
ICDRA	Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos
IM	Ion molecular
IR	Índice de retención
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo
K _i	Constante de afinidad
MeOH	Metanol
mg	Miligramo



min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Número de animales
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NIST	National Institute of Standards and Technology
OGTT	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSTT	Prueba de tolerancia a la sacarosa oral
<i>p.o.</i>	Administración oral
PDMS	Polidimetilsiloxano
PGF	Prostaglandina F
ppm	Partes por millón
MEFS	Microextracción en fase sólida
SNC	Sistema Nervioso Central
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta

II. Lista de Figuras

Figura 1. Distribución del género <i>Ligusticum</i> en Norteamérica	5
Figura 2. Distribución geográfica de <i>L. porteri</i> en México y Estados Unidos de Norteamérica (Trópicos, Missouri Botanical Garden)	6
Figura 3. <i>Ligusticum porteri</i> Coulter y Rose (Apiaceae). Planta íntegra en su hábitat natural	8
Figura 4. <i>Ligusticum porteri</i> Coulter y Rose (Apiaceae). Raíz	8
Figura 5. Principales ftálicas detectadas en la especie <i>Ligusticum porteri</i>	11
Figura 6. Principales metabolitos secundarios del tipo terpenoide, detectados en la especie <i>Ligusticum porteri</i>	13
Figura 7. Principales compuestos fenólicos y otros aromáticos	16
Figura 8. Principales metabolitos secundarios del tipo cumarina, detectados en la especie <i>Ligusticum porteri</i>	17
Figura 9. Documentos oficiales referentes al control de calidad de plantas medicinales publicados por la OMS y algunos de sus países miembros	26
Figura 10. Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>L. porteri</i> obtenido por hidrodestilación	54
Figura 11. Cromatograma del aceite esencial de <i>L. porteri</i>	57
Figura 12. Compuestos volátiles identificados en las raíces de <i>L. porteri</i>	61

por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS

- Figura 13.** Cromatograma de los componentes volátiles de *Ligusticum porteri* obtenido por HS-MEFS utilizando la fibra PDMS/DVB/CAR 63
- Figura 14.** Cromatograma de los componentes volátiles de *Ligusticum porteri* obtenido por HS-MEFS utilizando la fibra PDMS 64
- Figura 15.** Modelos **a)** del estiramiento abdominal y **b)** la placa caliente ratones 68
- Figura 16.** Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Ligusticum porteri* en ratones 71
- Figura 17.** Efecto antinociceptivo del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones 72
- Figura 18.** Efecto antinociceptivo del extracto íntegro de *Ligusticum porteri* obtenido por maceración CH₂Cl₂:MeOH (1:1) en ratones 73
- Figura 19.** Efecto antinociceptivo del compuesto *Z*-ligustílida (**1**) en ratones 74
- Figura 20.** Efecto antinociceptivo del compuesto *Z*-3-butilidenftálida (**3**) en ratones 75
- Figura 21.** Efecto antinociceptivo del compuesto diligustílida (**6**) en ratones 76
- Figura 22.** Cromatograma de la infusión de *L. porteri* por CLAE. 77

Figura 23. Efecto espasmolítico del extracto acuoso de <i>Ligusticum porteri</i> en ratones	79
Figura 24. Efecto espasmolítico del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones	79
Figura 25. Efecto espasmolítico del extracto íntegro de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por maceración CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1) en ratones	80
Figura 26. Efecto espasmolítico del compuesto diligustílida (6) en ratones	80
Figura 27. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos	86
Figura 28. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones diabéticos	87
Figura 29. Curva de tolerancia a la glucosa (OGTT) luego de la administración del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos	88
Figura 30. Curva de tolerancia a la glucosa (OGTT) luego de la administración del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones diabéticos	89
Figura 31. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos	90
Figura 32. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por	91



hidrodestilación en ratones diabéticos

Figura 33. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración de la infusión de *Ligusticum porteri* en ratones normoglucémicos 92

Figura 34. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración de la infusión de *Ligusticum porteri* en ratones diabéticos 93

III. Lista de Tablas y Esquemas

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de <i>L. porteri</i> obtenido por hidrodestilación	52
Tabla 2. Compuestos volátiles identificados en las raíces de <i>L. porteri</i> por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS.	60
Tabla 3. Toxicidad aguda del extracto acuoso de <i>Ligusticum porteri</i>	66
Tabla 4. Toxicidad aguda del aceite esencial de <i>Ligusticum porteri</i> obtenido por hidrodestilación	66
Esquema 1. Aislamiento de la <i>Z</i> -ligustílida (1), <i>Z</i> -3-butilidenftálida (3) y diligustílida (6) a partir del extracto orgánico de la raíz de <i>L. porteri</i>	41

1. Resumen

Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae) es una de las plantas más ampliamente comercializadas en México donde se conoce comúnmente con los nombres de “chuchupaste”, “hierba del cochino”, “raíz de angélica” y “osha”. La raíz y hojas han sido utilizadas para ayudar a aliviar desordenes gastrointestinales, resfriados e infecciones respiratorias, heridas y recientemente diabetes.

El aceite esencial, obtenido de la raíz, por hidrodestilación fue analizado mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, lo que permitió identificar 31 metabolitos secundarios, que representan aproximadamente el 99% del total de la esencia. Entre los principales se encuentran compuestos del tipo de las ftálicas como la *Z*-ligustílica (1) y *Z*-3-butilidenoftálica (3) (44.61%), sesquiterpenoides y monoterpenoides. Mientras que la determinación de los componentes volátiles de la especie mediante la técnica de microextracción en fase sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF) permitió establecer que los componentes más importantes son *p*-cimeno, α -terpineno, ectocarpeno, y *trans*-verbenol.

La prueba de toxicidad de Lorke permitió comprobar que el aceite esencial y la infusión son inocuos para roedores ya que presentaron una DL₅₀ mayor a 5000 mg/Kg.

La planta presenta un potencial efecto analgésico que puede ser usado para controlar dolor a nivel visceral inflamatorio y central. El efecto antinociceptivo fue probado en dos modelos farmacológicos conocidos, el de la placa caliente y el de estiramiento abdominal. *Z*-ligustílica (1) 3-*Z*-butilidenoftálica (3) fueron los principios activos en la prueba de placa caliente, mientras que la diligustílica (6) fue más activa en la prueba de estiramiento abdominal.



Por otra parte, se comprobó, mediante la prueba de estiramiento abdominal, que el aceite esencial presenta un efecto espasmolítico moderado (316 mg/Kg) y un importante efecto antihiper glucémico en las pruebas de tolerancia tanto a la glucosa (56.2 y 100 mg/Kg), como a la sacarosa (31.6, 56.2 y 100 mg/Kg). La infusión, en cambio, no mostró efecto sobre la motilidad intestinal importante a las tres dosis ensayadas (31.6, 100 y 360 mg/Kg). En los ensayos para determinar el efecto antihiper glucémico mediante la prueba de tolerancia a la sacarosa, la infusión presentó un efecto significativo ($p < 0.05$) a la dosis de 31.6 mg/Kg. Los efectos de los preparados en la prueba OSTT son congruentes con la presencia de la ftálida **3**.

La información científica generada a través de la presente investigación aporta parte del conocimiento requerido para integrar una monografía tipo OMS y contribuir al uso racional de la especie *L. porteri*.



1.1. Abstract

Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae) is one of the most widely commercialized drugs in Mexico where it is commonly known with the names of “chuchupaste”, “hierba del cochino”, “raíz de angelica” and “osha”. The roots and leaves have been used to help alleviate gastrointestinal disorders, flu and other respiratory infections, wounds and, recently for diabetes.

The essential oil obtained from the root, by hydrodistillation was analyzed by the technique of Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry, identified 31 secondary metabolites, which represent approximately 99% of the essence. Among the main are compounds of the type phthalides such as *Z*-ligustilida (**1**) and *Z*-3-butylidenftálida (**3**) (44.61%), sesquiterpenoids and monoterpenoid. While the determination of the volatile components of the species by the technique of Solid Phase Microextraction (HS-SPME) established that the most important components are p-cymene, α -terpinene, ectocarpene, and trans-verbenol

Lorke's acute toxicity test of the essential oil and the infusion of the plant revealed that they were safe for rodents. The LD₅₀ was higher than 5000 mg/kg in both cases.

The plant showed potential analgesic effect which could be useful for controlling inflammatory visceral and central pains. The antinociceptive effect was tested in two well-known pharmacological models, the hot plate and writhing tests. *Z*-ligustilide (**1**) and 3-*Z*-butylidenphthalide (**3**) were two of the active principles in the hot plate tests, while diligustilide (**6**) was more active in the writhing.

The essential oil and infusion of the plant were also assessed for their antidiabetic and spasmolytic actions. The antidiabetic effect was determined using an

acute hypoglycemic as well as sucrose and glucose tolerance tests, in both normal and diabetic mice. The preparations showed significant antihyperglycemic effect in the OSTT, consistent with the presence of phthalide **3**. The spasmolytic action was determined using the charcoal intestinal transit test; the best effect was observed with the oil which decreased charcoal transit by 1085 mg/Kg, with respect to the control group.

The scientific information generated through this research provides some of the information required to integrate the pharmacopeia and WHO monographs of *L. porteri*, which in turn will contribute to the rational use of this important species.

2. Antecedentes

2.1. *Ligusticum porteri*

2.1.1. Generalidades sobre la especie *Ligusticum porteri*

El género *Ligusticum* (Apiaceae) consiste de 40 a 60 especies perennes distribuidas en las regiones boreales y montañosas del mundo (Turi y Murch, 2010). En América del Norte las especies del género se distribuyen en Canadá, Estados Unidos y México, donde se les conoce como “osha” y son altamente apreciadas con fines alimenticios, de caza, mágico-religiosos y medicinales. Entre las comunidades de Aspen en Gunnison County, Colorado *Ligusticum porteri* Coulter & Rose es la especie dominante (Figura 1) (Crawford *et al.*, 1998).

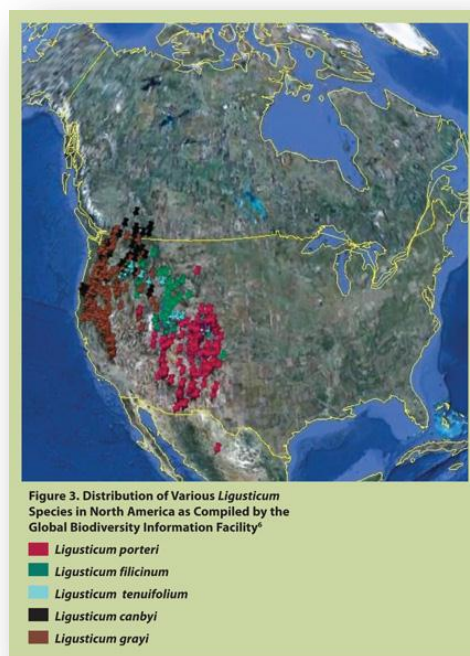


Figura 1. Distribución del género *Ligusticum* en Norteamérica (Turi y Murch, 2010)

Ligusticum porteri es una planta propia de climas templados, con poblaciones en bosques de pino encino en el Norte de la Sierra Madre Occidental y en el Sur de las Montañas Rocallosas, en Estados Unidos en los estados de Colorado, Wyoming, Sur de Idaho, Sur de Utah, Nuevo México, Este de Nevada y Sur de Arizona (Mathias y Constance, 1994; Cronquist *et al.*, 1997) (**Figura 2**). En México se encuentra en Sonora (Sierra del Chuchupate, El Talayote, Las Cuevitas, Sierra del Orquetudo y Mesa del Campanero), Chihuahua (San Antonio, Santa Clara, Ureina y Rancho Blanco) y Durango (Canoas, Gavilanes, La Guajolota, Los Charcos, Llano Grande, San Bernardino de Milpillas Chico, San Francisco de Ocotán y Santa María de Ocotán) (Zolla, 1994).

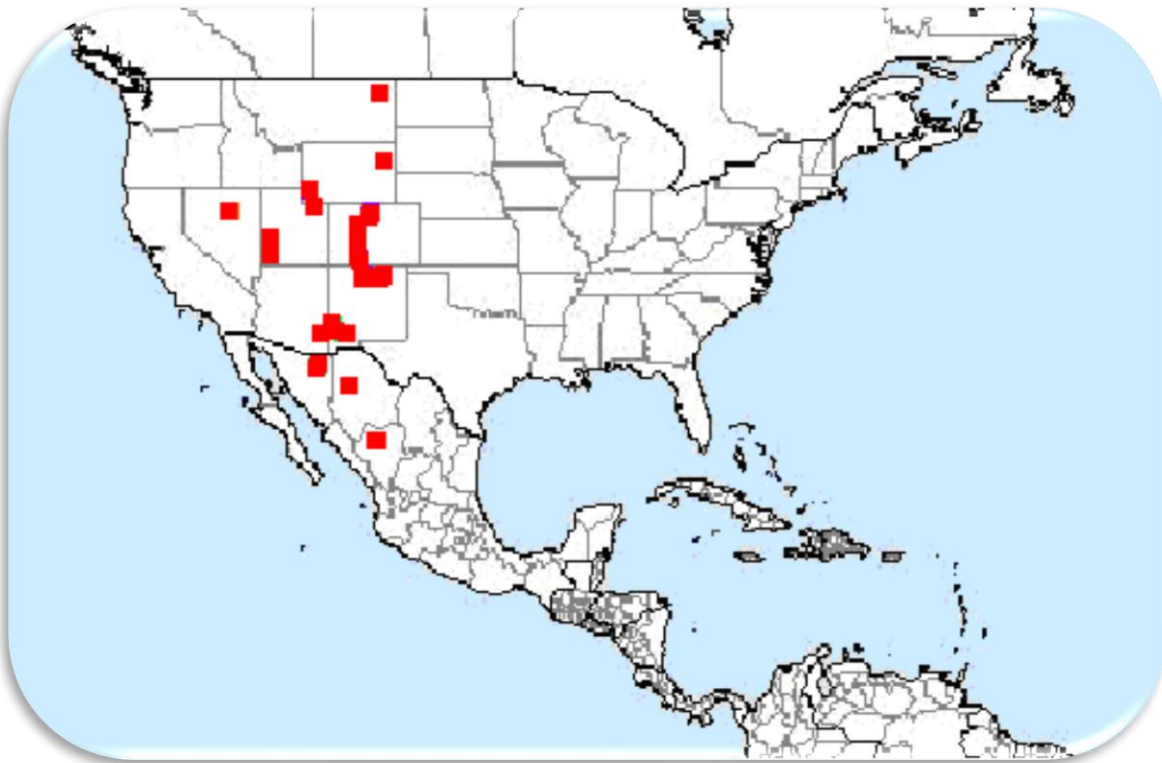


Figura 2. Distribución geográfica de *L. porteri* en México y Estados Unidos de Norteamérica (Trópicos, Missouri Botanical Garden).

Ligusticum porteri (**Figura 3**) es una hierba monóica, perenne. Su tallo es firme, caulescente, ramificado libremente, de 50 a 100 cm de altura, glabro a través de la inflorescencia puberulenta. Su raíz es axonomórfica, perenne, con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronadas sobre la raíz principal. Sus hojas son ovadas en el contorno general, excluyendo los pecíolos, de 15 a 28 cm de largo y de 12 a 20 cm de ancho, trenadas-pinnadas, en foliolos ovados, mayormente distintos, sésiles a peciolados, con un tamaño de 2.5 a 5 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho, regularmente incididos. Lóbulos obtusos o agudos, completamente o dentados; pecíolos de 10 a 30 cm de largo; hojas caulinas como las basales, con divisiones poco lobadas; pedúnculos firmes, alternados y algunas veces verticilados, de 6 a 30 cm de largo, ligeramente hinchados en el ápice; involucre ausente u ocasionalmente solitario en una bráctea decidua; involucelo ausente o en varias bracteetas lineales, de 2 a 7 mm de largo, igualmente o más cortos que las flores y frutos. Su inflorescencia es de umbelas compuestas. Sus flores son blancas. Estambres 5. Ovarios 2. Sus frutos son esquizocárpicos, oblongos, de 5 a 8 mm de largo, de 2 a 4 mm de ancho, teretes, las costillas estrechamente aladas; de 4 a 6 tubos aceitosos en los intervalos, de 8 a 10 en la comisura. Sus semillas son aplanadas dorsalmente en la sección transversal, acanaladas bajo los tubos (Constance *et al.*, 1976; Cronquist *et al.*, 1997; Galaviz *et al.*, 1994; Mathias y Constance, 1994).

Como la mayoría de las plantas con un rango de distribución amplio, *L. porteri* se conoce con distintos nombres comunes, de tal forma que los Tarahumaras de Chihuahua la llaman “wasia”, “chuchufate”, “osha”, “chuchupate”, y “chuchupaste”. En el Distrito Federal se comercializa bajo los nombres de “chuchupate”, “chuchupaste” y “raíz de cochino”. En Durango se denomina “raíz de angélica”, “raíz de cochino” y “yerba del cochino”. En Colorado y Nuevo México, Estados Unidos de América del Norte, se le conoce como “chuchupatle”, “chuchupatli”, y “osha” mientras que en Texas se le llama “raíz de angélica” (**Figura 4**) (Linares y Bye, 1987; Olivas, 1999).



Figura 3. *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae). Planta íntegra en su hábitat natural.



Figura 4. *Ligusticum porteri* Coulter y Rose (Apiaceae) Raíz.

Ligusticum porteri es una planta “rara” de acuerdo a la Lista Roja de Plantas Amenazadas de 1997 de la IUCN (*International Union for Conservation of Nature*), lo que significa que la población mundial de la especie es pequeña, y aunque no está en

peligro de extinción, es vulnerable. Las especies designadas como “raras” tienen un tipo de hábitat específico, una distribución restringida o se encuentran dispersas en un área muy extensa (Walter y Gillet, 1998).

El conocimiento para la propagación y cultivo de *L. porteri* es limitado, de allí la importancia de preservarla (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2004) (Panter *et al.*, 2004; West y Jackson, 2004).

La raíz de la yerba del cochino se utiliza en las prácticas médicas populares, sola o en combinación con otras plantas como *Croton niveus*, *Juliana adstringens* y *Brickellia cavanillesii*. Los usos más importantes incluyen el alivio de dolores de estómago, el tratamiento de la tos, insomnio, resfriados, diarrea y otros desórdenes gastrointestinales. También se ha descrito su aplicación como antiséptico, carminativo, y antídoto contra la picadura de alacrán (Appelt, 1985; Argueta *et al.*, 1994; Bye, 1986; Galaviz *et al.*, 1994; Olivas, 1999). De acuerdo a Linares y Bye (1987) la planta es apreciada para la prevención de infecciones en cortaduras y heridas aplicando de manera tópica la raíz pulverizada; la misma parte de la planta se recomienda también para limpiar las orejas con garrapatas y matar los piojos en las comunidades Tarahumara y Zuni de Chihuahua; en esta región lo usan también como antiséptico, energético, analgésico y para tratar la diarrea, resfriados, bronquitis, neumonía, tuberculosis, diabetes y úlceras (Olivas, 1999). El uso del chuchupate como agente antidiabético y energético parece ser reciente y, según Olivas, para la diabetes se hierve la raíz y se toma diariamente durante tres meses y como energético se puede usar como cocción o mascar un pedazo de raíz y escupir. Cabe mencionar que en 2005 Andrade-Cetto y Heinrich mencionan el uso de la planta como antidiabético, sin citar el trabajo de Olivas.

En Durango, la infusión de la droga cruda se bebe para aliviar el dolor de estómago (Olivas, 1999) y para tratar los cólicos en niños (Argueta *et al.*, 1994); Olivas señala

también que en ese estado la raíz aplicada tópicamente es útil para las heridas, cortadas y quemaduras. En Sonora, los Pima de Yecora, utilizan el cocimiento de la raíz en la mañana y en la tarde para el tratamiento del resfriado, tos, estómago suelto y falta de sueño; para las picadas de alacrán o reumas, toman un vaso del cocimiento de la raíz, tres veces al día (Galaviz *et al.*, 1994). En Zacatecas, la infusión o decocción de las ramas, se usa para aliviar el dolor de estómago, pulmón y riñón; así como para el tratamiento de las heridas en forma tópica.

El chuchupate también se emplea en otras regiones del mundo; así en las prácticas fitoterapéuticas contemporáneas de Francia, *L. porteri* se usa por sus propiedades tónicas amargas y desinfectantes; así como para el alivio de los cólicos estomacales. La raíz machacada en agua caliente sirve como enjuague para aliviar infecciones de la garganta y la laringe. En caso de afecciones inflamatorias de las vías respiratorias superiores también se recomienda una preparación de la raíz en miel, añejada durante seis meses (Goetz, 2005).

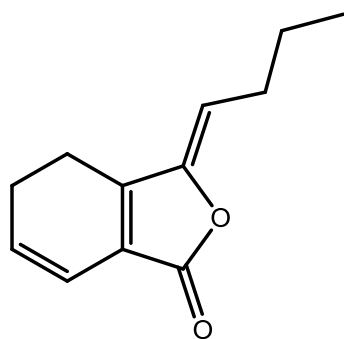
De acuerdo a la Asociación Americana de Productos a Base de Plantas (AHPA) durante el período 1997-2006, la recolección y demanda de *L. porteri* incrementó de manera importante (Silver, 2007), es muy probable que esta tendencia se haya mantenido en los últimos cinco años; actualmente la droga cruda se vende entre 30 y 50 dólares por libra (Terrell y Fennell, 2009).

2.1.2. Antecedentes fitoquímicos y farmacológicos

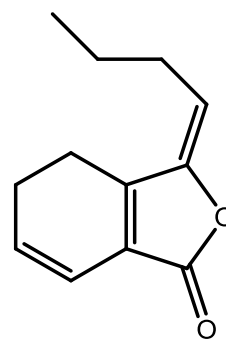
La especie *L. porteri* ha sido objeto de algunas investigaciones desde el punto de vista químico. Los metabolitos aislados y caracterizados en estos estudios incluyen: ftálicas, terpenoides, fenil propanoides y cumarinas (Cegiela-Carlio *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 1992; Delgado *et al.*, 1988; Hernández-Vazquez, 1999; Hou *et al.*, 2004;

Rios y Delgado, 1999; Zschoke *et al.*, 1998; Reza-Garduño, 1987; León, 2011). Los fenilpropanoides y las ftálidas son los constituyentes mayoritarios, en particular la diligustílica (6), la *Z*-3-butilidenftálida (3) y la *Z*-ligustílica (1). En las Figuras 5-8 se enlistan los constituyentes caracterizados en la planta a la fecha.

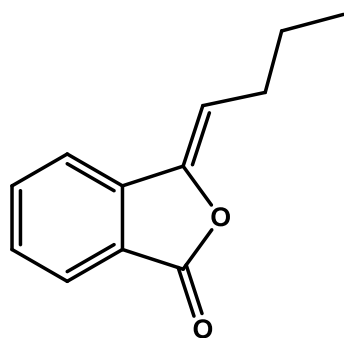
Figura 5. Principales ftálidas detectadas en la especie *Ligusticum porteri*.



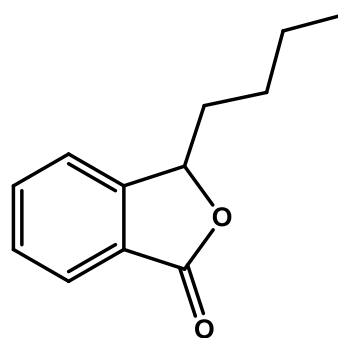
Z-Ligustílica (1)



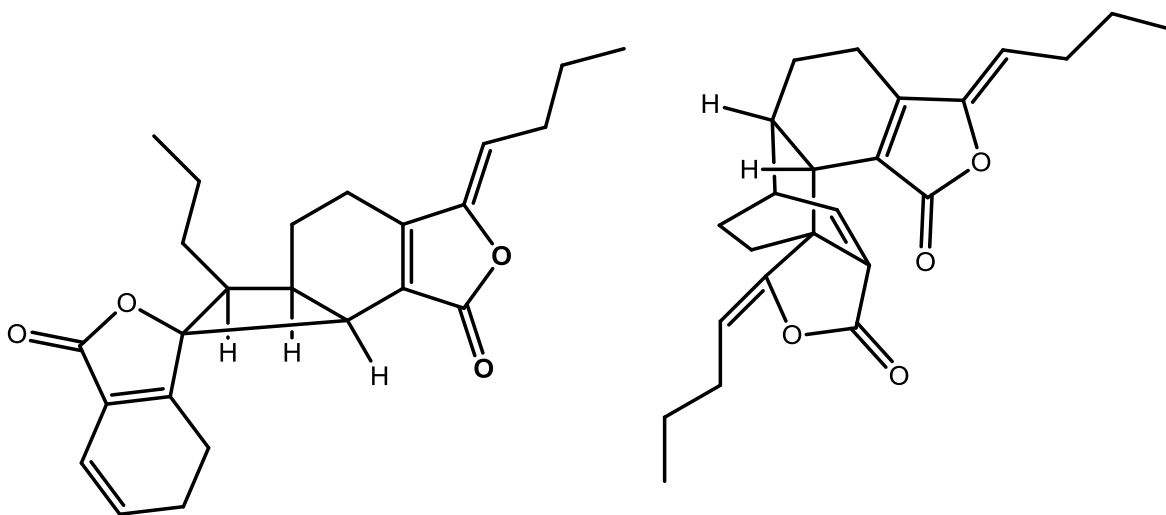
E-Ligustílica (2)



Z-3-Butilidenftálida (3)

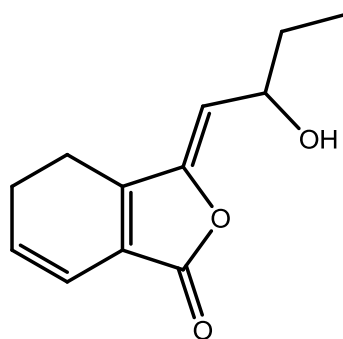


Butilftálida (4)

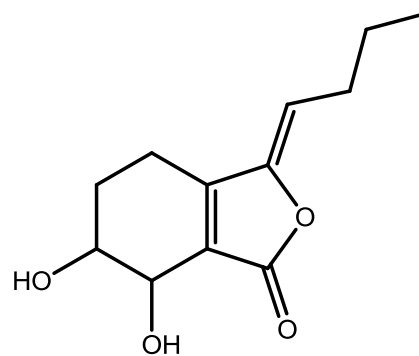
Figura 5. Principales ftálicas detectadas en la especie *Ligusticum porteri*.(continuación)

Riligustilida (5)

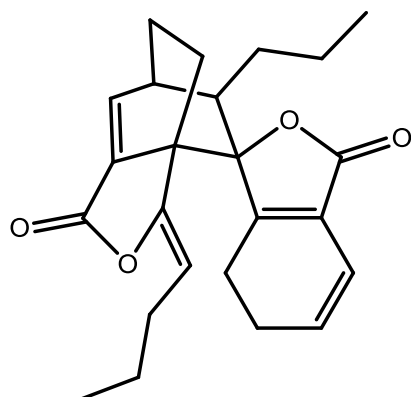
Diligustilida (6)



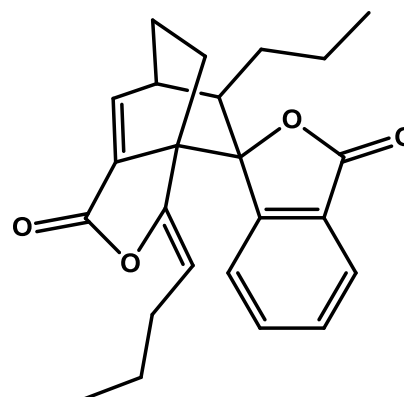
Senquiunólida F(7)



Senquiunólida I (8)

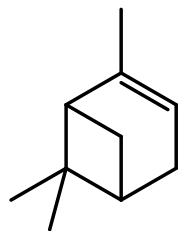


Toquinólida B (9)

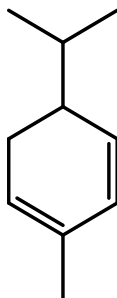


4,5-Deshidrotoquinólida (10)

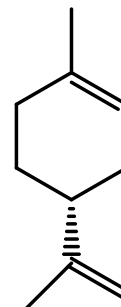
Figura 6. Principales metabolitos secundarios del tipo terpenoide, detectados en la especie *Ligusticum porteri*



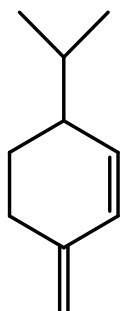
α -Pinoeno (11)



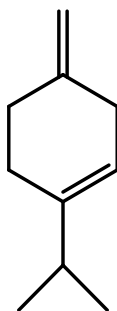
α -Felandreno (12)



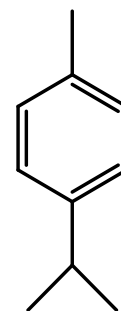
Limoneno (13)



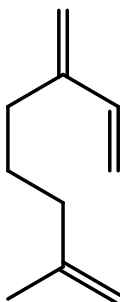
β -Felandreno (14)



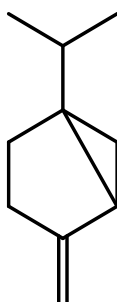
α -Terpineno (15)



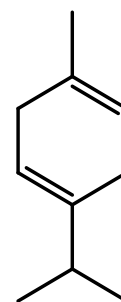
p-Cimeno (16)



Mirceno (17)

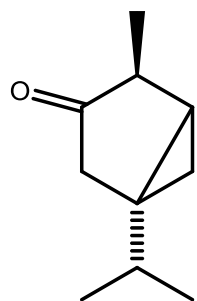


Sabineno (18)

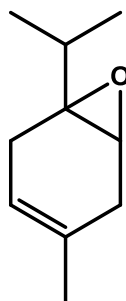


γ -Terpineno (19)

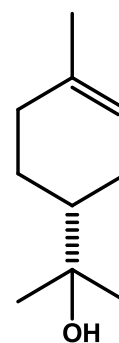
Figura 6. Principales metabolitos secundarios del tipo terpenoide, detectados en la especie *Ligusticum porteri*



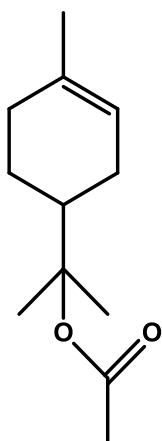
cis-Tujona (20)



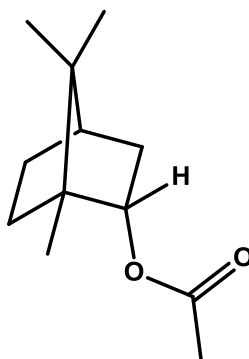
1,2-Epóxido de α -felandreno (21)



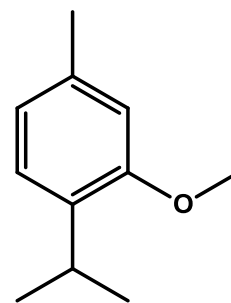
α -Terpineol (22)



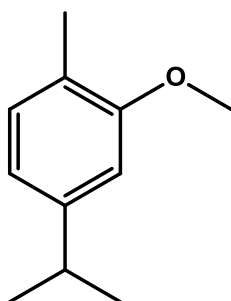
Acetato de α -terpinilo (23)



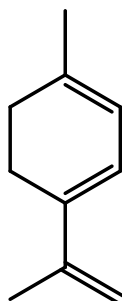
Acetato de bornilo (24)



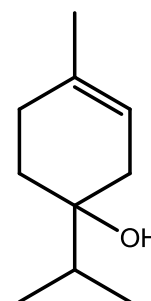
Metil éter del timol (25)



Metil éter de carvacrol (26)

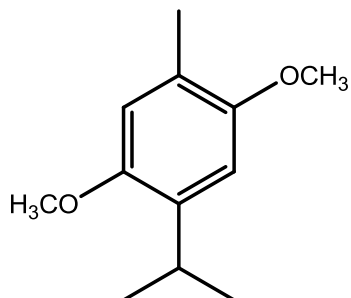


1,3,8-Mentatrieno (27)

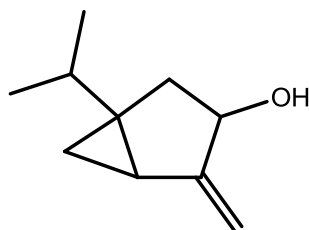


Terpinen-4-ol (28)

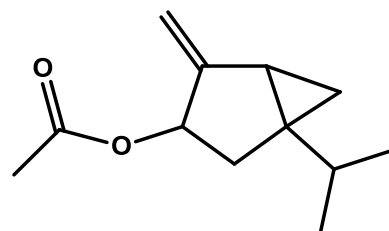
Figura 6. Principales metabolitos secundarios del tipo terpenoide, detectados en la especie *Ligusticum porteri* (Continuación)



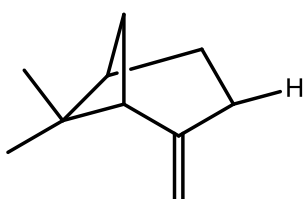
2,5-Dimetoxi-*p*-cimeno (29)



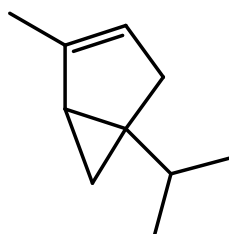
Sabinol (30)



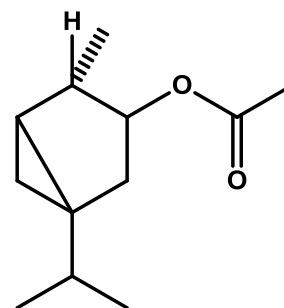
Acetato de sabinilo (31)



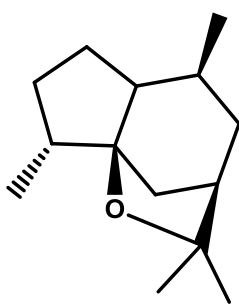
β -Pineno (32)



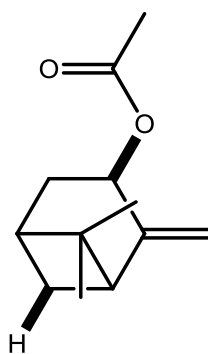
α -Tujeno (33)



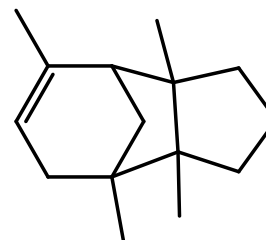
Acetato de isotujilo (34)



Ligulóxido (35)

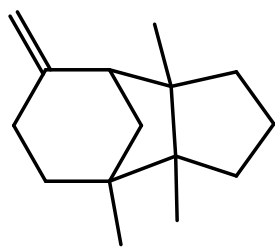


Acetato de *trans*-
pinocarveilo (36)

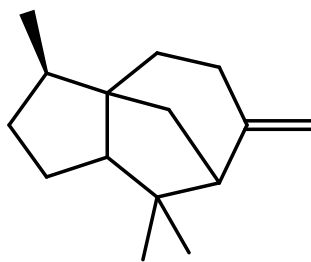


α -Barbateno (37)

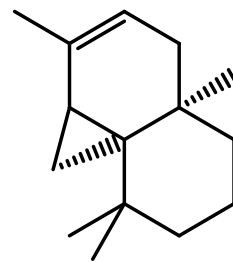
Figura 6. Principales metabolitos secundarios del tipo terpenoide, detectados en la especie *Ligusticum porteri* (Continuación)



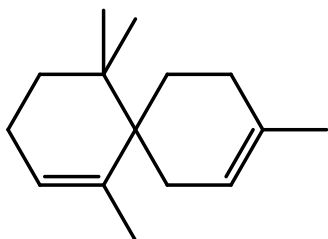
β -Barbateno (38),



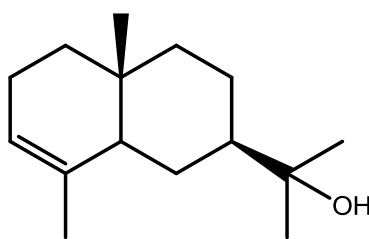
β -Funebreno (39)



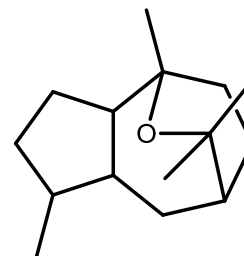
Widreno (40)



α -Chamigreno (41)

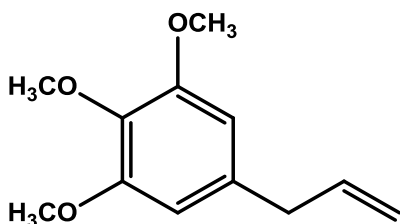


α -Eudesmol (42)

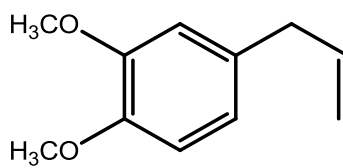


Kesano (43)

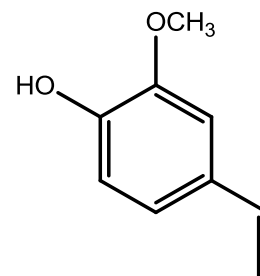
Figura 7. Principales compuestos fenólicos y otros aromáticos



Elemicina (44)

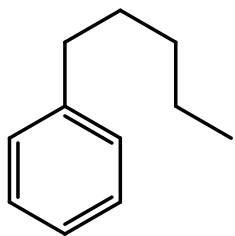


o-Metileugenol (45)

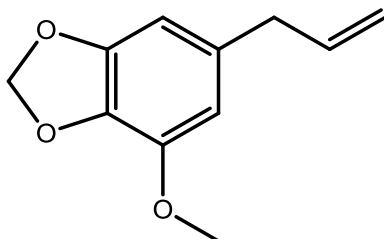


4-Vinilguayacol (46)

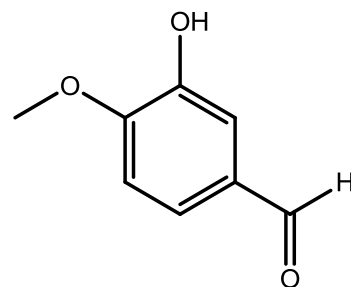
Figura 7. Principales compuestos fenólicos y otros aromáticos (continuación)



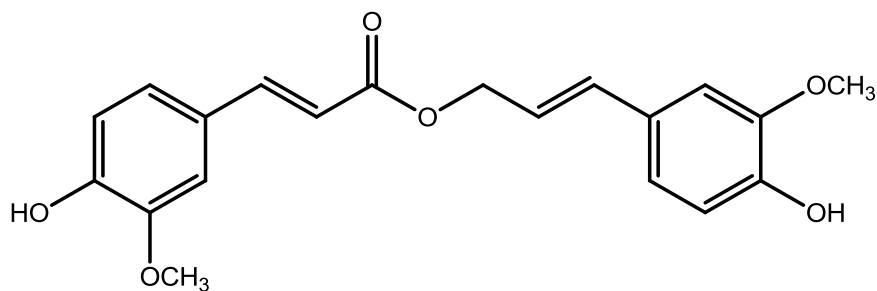
Pentilbenceno (47)



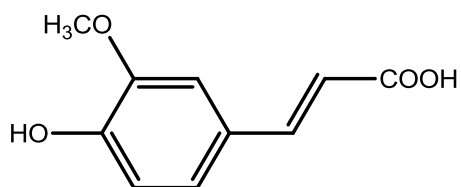
Miristicina (48)



Isovainillina (49)

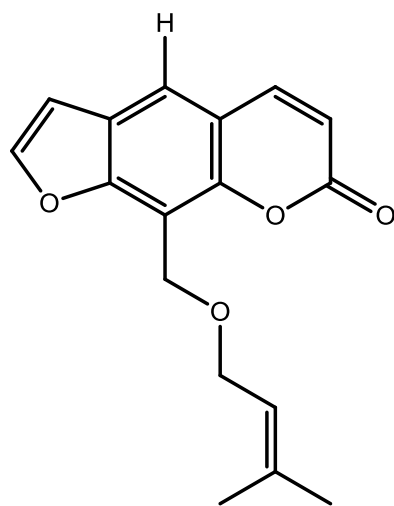


Ferulato de coniferilo (50)

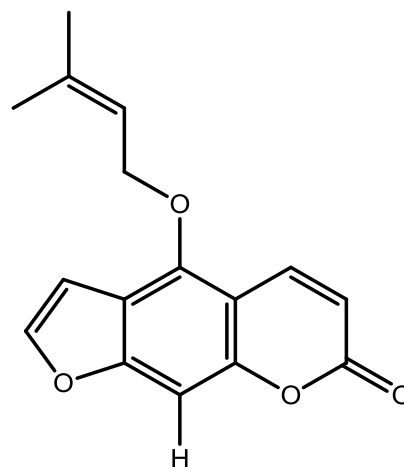


Ácido-4-hidroxi-3-metoxicinámico (51)

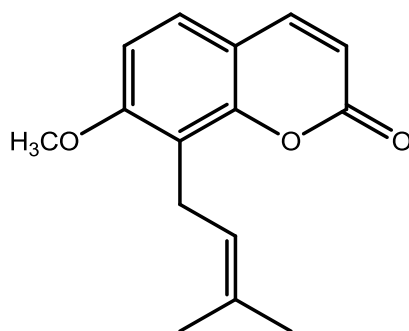
Figura 8. Principales metabolitos secundarios del tipo cumarina, detectados en la especie *Ligusticum porteri*



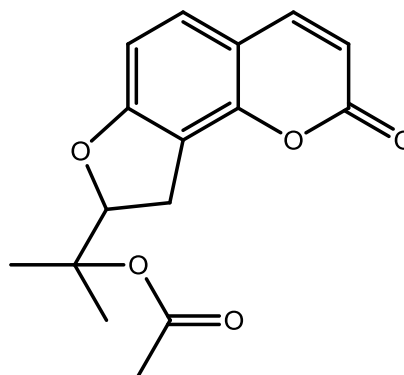
Imperatoina (52)



Isoimperatoina (53)



Osthol (54)



Acetato de columbianedina (55)

En 2011 Rivero *et al.* reportaron el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de utilidad para determinar simultáneamente diligustílida (6), *Z*-ligustílida (1) y *Z*-3-butilidengtálida (3), las ftálicas bioactivas mayoritarias de la raíz de la planta (Rivero *et al.*, 2011).

La especie ha sido también objeto de varias investigaciones de tipo farmacológico, algunas orientadas a determinar la eficacia de extractos y algunos compuestos aislados a

partir de la especie. Así, Cégiela-Carlioz y colaboradores (2005) demostraron que el aceite esencial (100 µg/Kg) de las raíces, preparado por arrastre de vapor o por extracción con disolventes, potencia la actividad de los antibióticos fluoroquinolona y norfloxacino 2 y 4 veces, respectivamente, frente a una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a norfloxacino. En otro estudio se encontró que los extractos acuosos y metanólicos preparados a partir de las raíces no afectan el crecimiento de células humanas cancerosas de mama MCF-7/AZ ni de colon HCT8/E11 (Daniels *et al.*, 2006). En 2007 como parte de un estudio conducente a establecer la toxicidad preclínica de una serie de plantas utilizadas en las prácticas médicas populares de México, se comprobó que el extracto íntegro presenta una dosis letal media (DL₅₀) de 1085 mg/Kg establecida por el método de Lorke en ratones. El extracto no presentó toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* ya que la CL₅₀ fue de 777.98 µg/mL ni provocó efectos genotóxicos cuando se analizó mediante la prueba de Ames (Deciga-Campos *et al.*, 2007). Por otro lado, la *Z*-ligustílida (1) fue moderadamente tóxica para *Artemia salina* (CL₅₀ de 20.10 ppm), mientras que la riligustílida (5) y la diligustílida (6) no, ya que presentaron una CL₅₀ mayor a 1000 ppm (Delgado *et al.*, 1992).

Zuluaga-Quiceno (2009) evaluó el potencial antibacteriano de la especie contra la bacteria *Helicobacter pylori*. Los resultados obtenidos indicaron que el extracto orgánico evaluado presenta una actividad anti-*H. pylori* significativa (CL₅₀ 31.25 µg/mL) y el compuesto diligustílida (6), presentó también actividad anti-*H. pylori* significativa (CL₅₀= µg/mL) (Li *et al.*, 2005; Zuluaga, 2009).

Recientemente se demostró que el extracto orgánico de las raíces de *L. porteri* administrado por vía oral en ratones normales y diabéticos, presenta un efecto hipoglucemiante y antihiper glucémico significativo. Los compuestos diligustílida (6), *Z*-ligustílida (1), y *Z*-3-butilidenftálida (3) fueron los responsables de la actividad antihiper glucémica. La *Z*-3-butilidenftálida (3) fue el producto más activo; a la dosis de

56.2 mg/kg disminuyó los niveles de glucosa en ratones diabéticos [NAD (50 mg/Kg), STZ (100 mg/Kg)] después de una carga oral de sacarosa sugiriendo que su efecto antidiabético se debe a la inhibición de las α -glucosidasas a nivel intestinal. De acuerdo a ensayos *in vitro*, el producto **3** inhibió la glucosidasa de levadura (CI_{50} 2.35 mM) de una manera no competitiva con una K_i de 4.86 mM. Un análisis de acoplamiento predijo que la ftálica **3** se une a un lugar cercano al sitio catalítico, pero diferente a la zona de unión de la acarbosa, con una K_i de 11.48 mM (Brindis *et al.*, 2011).

Además de los estudios mencionados, cabe destacar que las ftálicas *Z*-ligustílica (**1**) y diligustílica (**6**) poseen propiedades neuroprotectoras, relajantes del músculo liso, y antisépticas (Chan *et al.*, 2007; Kuang *et al.*, 2006; Or *et al.*, 2011).

Kuang *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2009 y Kuang *et al.*, 2006 reportan la actividad del compuesto **1** contra el Alzheimer, lo mencionan como un candidato potencial para estudios preclínicos destinados a la prevención y tratamiento de los problemas causados por esta enfermedad.

Du *et al.*, 2006 demostró que el compuesto **1** presenta efecto sobre músculo liso uterino inhibiendo la contracción del mismo, posteriormente reportan la actividad antiespasmódica y antiinflamatoria del compuesto (Du *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2006).

En el año 1987 fue reportada la actividad contra la agregación plaquetaria del compuesto butilidenoftálica (**3**) (Teng *et al.*, 1987)

En 2002 Kwon y Ahn reportaron la actividad acaricida del compuesto **3**, observando una Dosis Letal Media (DL_{50}) de $6.77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de $6.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para adultos de *Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* respectivamente, el efecto obtenido fue comparable con el del control benzoato de bencilo (Kwon y Ahn, 2002).

Los compuestos **1** y **3** presentan actividad insecticida contra larvas y adultos de *Drosophila melanogaster* en Concentraciones Letales Medias (CL₅₀) de 4.99 y 9.90 µmol/mL en larvas; el compuesto **3** presenta una CL₅₀ de 5.93 µmol/mL en adultos, esta actividad fue similar a la obtenida con el control positivo (Rotenona) que dio una CL₅₀ de 3.68 µmol/mL (Tsukamoto *et al.*, 2005).

2.2. Importancia de las monografías tipo OMS de plantas medicinales

En el presente, los sistemas tradicionales de medicina han adquirido mucha importancia. Se estima que en países en vías de desarrollo, una gran proporción de la población recurre a las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de la salud; en los países desarrollados se ha notado un incremento notable del uso de las terapias alternativas o complementarias que emplean plantas medicinales como principal recurso terapéutico (Goldfrank, 1982; Vulto y Smet, 1988; Mentz y Schenkel, 1989; Rates, 2001; WHO, 1999). De tal forma, que en las últimas dos décadas la herbolaria medicinal ha tenido gran auge en países industrializados, como los EE.UU., Canadá, Australia, Japón y varios de la Comunidad Europea (Eisenberg *et al.*, 1998; MacLennan *et al.*, 1996; Millar, 1997). El gran incremento en el uso de hierbas medicinales es también un negocio muy lucrativo; en China estos productos constituyen entre 30 y 50% del consumo de medicamentos, lo que equivale a un valor en ventas de 14 billones de dólares en 2005. En el año 2006 la venta llegó a 1 billón de dólares en Japón; mientras que los australianos gastaron 1.86 mil millones en el periodo 2004-2005. Durante 2007 en el Reino Unido y Brasil el gasto fue de 230 y 160 millones, respectivamente (WHO, 2011).

Son muchas las razones que han contribuido a este repunte de la medicina herbolaria; por un lado un gran porcentaje de la población no tiene acceso a los

tratamientos farmacológicos convencionales; así mismo un sector importante de la población mundial considera que la medicina convencional provoca numerosos efectos secundarios, y tiene la idea errónea de que los productos naturales son inocuos. No obstante el amplio uso de las plantas medicinales y productos herbolarios, son pocas las especies medicinales que han sido científicamente analizadas para comprobar su eficacia, inocuidad y composición química. Tampoco se tienen datos sobre sus efectos adversos, interacciones planta-fármaco, y no existe un monitoreo en lo referente al deterioro, contaminación con metales tóxicos o compuestos activos de origen sintético y adulteración (por identificaciones erróneas o sustitución intencional con otras especies) (Arab, 2000; Jordan *et al.*, 2010; Shetti *et al.*, 2011). En el mismo sentido, en la mayoría de los países los medicamentos herbolarios no están bien regulados y su uso no siempre ha sido autorizado por los organismos encargados de aplicar los procedimientos de seguridad y eficacia correspondientes y muchos artículos apuntan a la falta de calidad en la producción, comercialización y prescripción de los productos fitoterapéuticos.

El problema es aún mayor si se considera que los países tienen diferentes maneras de definir lo que es una planta medicinal, una hierba o un producto derivado de éstas, y han adoptado distintos caminos para la autorización, producción y comercialización de estos materiales. Por lo tanto, los criterios para asegurar su calidad, inocuidad y eficacia pueden diferir considerablemente (WHO, 1998).

Lo antes expuesto indica claramente la necesidad de tener información fidedigna y estandarizada sobre la seguridad y eficacia de las especies medicinales, incluyendo estudios clínicos y farmacológicos; sin embargo, este tipo de investigación no se obtiene con la velocidad suficiente para satisfacer las necesidades de salud pública; debido a esto se han realizado estudios epidemiológicos que tienen el objetivo de recopilar información sobre las formas de administración, dosificación y preparación, que le da la

población a las plantas medicinales y a partir de los conocimientos adquiridos poder determinar los beneficios y riesgos de estos productos (Rates, 2001).

Con la finalidad de aportar las metodologías necesarias para la investigación y aseguramiento de la calidad, eficacia y seguridad de los productos herbolarios, la OMS ha publicado una serie de documentos y ha incrementado los esfuerzos para promover el monitoreo de la seguridad de los productos herbolarios, en el contexto del Programa Internacional de Monitoreo de Fármacos. Así surgió el documento “*Guidelines for the assessment of herbal medicines*” que contiene los lineamientos generales para establecer el control de calidad de los medicamentos herbolarios. Este documento fue adoptado en la sexta reunión de la ICDRA celebrada en el año de 1991 en Ottawa, Canadá. En esta reunión se recomendó que la OMS desarrollara los modelos de monografías científicas de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo, con la finalidad de establecer los parámetros de inocuidad, eficacia, control y aseguramiento de la calidad de dichas plantas (WHO, 1999).

Para 1999 se publicó un primer tomo con 28 monografías de plantas medicinales de amplio uso en el mundo. Estas servirían de modelo para que los países miembros elaborasen los documentos de sus plantas autóctonas. En el año 2001 se publicó un segundo tomo con 30 monografías más, un tercer volumen fue publicado en 2007 con 31 nuevas plantas y durante 2009 se publicó un cuarto volumen con 28 nuevas monografías; existe además un documento publicado en 2010, que incluye la información sobre 30 plantas de amplio uso en los nuevos estados independientes; de las cuales 13 son nuevas especies y las 17 restantes representan versiones actualizadas de monografías publicadas anteriormente (WHO, 1999; 2002b; 2007; 2009; 2010).

Estos documentos, además de proporcionar información científica sobre la seguridad, eficacia, y control de la calidad de plantas medicinales ampliamente

utilizadas alrededor del mundo, constituyen herramientas valiosas para los sectores gubernamentales de sus países miembros en lo referente a la regulación, adecuación e incorporación de los remedios tradicionales al sistema de salud oficial. Además instituyen modelos idóneos para ayudar a las naciones partícipes a desarrollar las monografías de sus especies vernáculas para lograr armonizar a nivel global el uso de hierbas medicinales respecto a seguridad, eficacia y control de calidad y así regular el creciente comercio de drogas vegetales entre la sociedad en general. Es importante mencionar que debido a la falta de regulación de los productos herbolarios a menudo se pueden encontrar productos adulterados, de sustitución o contaminados con microorganismos, plaguicidas y metales tóxicos (Wichtl, 2006).

Cada monografía consta de dos partes, la primera se refiere a la identificación y aseguramiento de calidad: aspectos botánicos, distribución geográfica, ensayos de identidad, requisitos de pureza, análisis químicos y compuestos activos y mayoritarios de las plantas. La segunda parte resume una extensa revisión de trabajos científicos, e incluye los usos tradicionales no demostrados científicamente, datos farmacológicos y clínicos, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas y posología de cada planta (WHO, 1999).

Como respuesta a las iniciativas de la OMS, y debido al interés del público por consumir productos herbolarios adecuados, muchos países han publicado una serie de documentos de carácter oficial (**Figura 9**) que tratan de resumir los aspectos más relevantes de los métodos de análisis para determinar la identidad, pureza, composición y eficacia de las drogas crudas y sus preparados fitofarmacéuticos. En general, los parámetros utilizados para asegurar la calidad de las drogas crudas y sus preparados implican pruebas de identidad (botánica y química para el establecimiento de huellas digitales), pruebas de pureza (para identificar adulterantes y/o contaminantes) y pruebas

de composición (que permitan establecer el contenido de principios activos y/o compuestos marcadores).

No obstante los esfuerzos de la OMS, la medicina herbolaria ha evolucionado de manera diferente alrededor del mundo, siendo la medicina tradicional de la República Popular de China, una de las fuentes más valiosas y mejor documentadas, con más de 7,000 especies de plantas medicinales. Por otra parte, la Comunidad Europea ha dado un enfoque distinto al establecimiento de criterios armonizados para la evaluación de las fitomedicinas para con ello apoyar a la investigación científica y contribuir a la aceptación de la fitoterapia en el continente europeo. En los Estados Unidos de Norteamérica también se ha avanzado de manera importante en el aseguramiento de la calidad, seguridad y eficacia de los productos medicinales, al promover mediante una serie de textos científicos el uso responsable de estos medicamentos.

México, país con una enorme tradición en el uso de hierbas con fines curativos, no ha quedado exento de la influencia de todos los cambios ocurridos en el desarrollo y comercialización de los fitomedicamentos. Como una respuesta al llamado de la OMS México creó la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, siendo ésta la primera en su tipo de toda América Latina. Su objetivo es el de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deben cumplir las plantas y sus derivados, que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, para contribuir al mejoramiento de la calidad de este tipo de productos y a su uso racional.

Este documento contiene información sobre: Seguridad de uso en plantas medicinales, precaución en el manejo de aceites esenciales, una relación de especies de uso etnobotánico, información sobre la preparación de tisanas, el almacenamiento de drogas vegetales, además de 20 monografías generales de análisis específicos, 41 monografías de plantas y 23 monografías de aceites esenciales (FEUM, 2001).

Sin embargo, la información contenida en estas monografías resulta insuficiente.

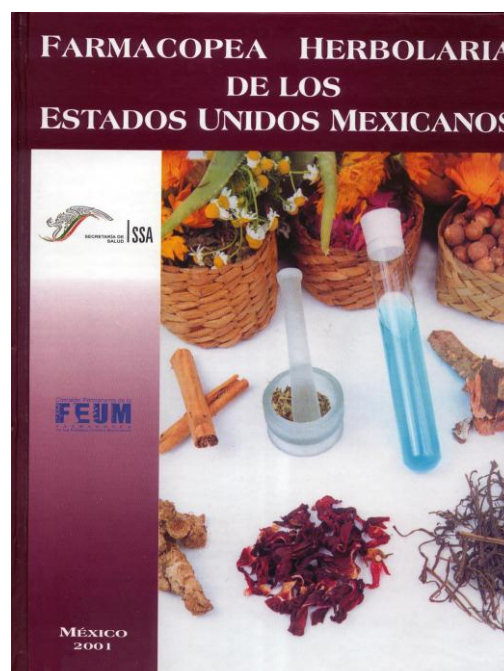
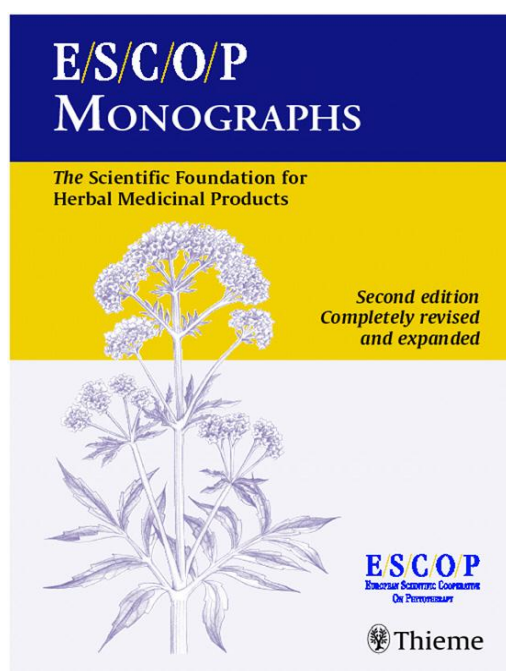
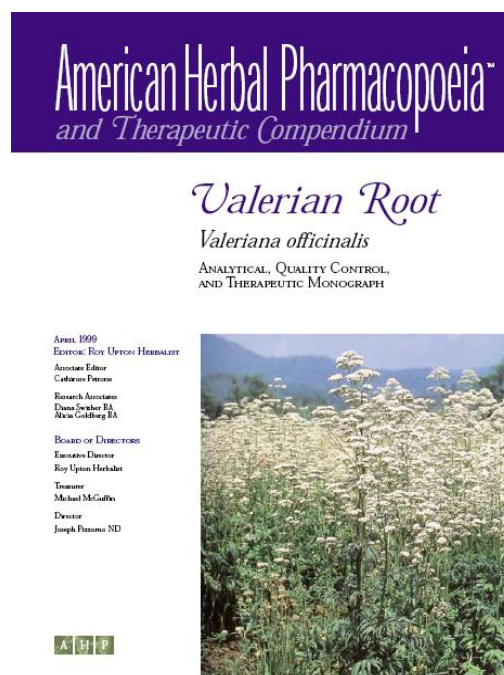
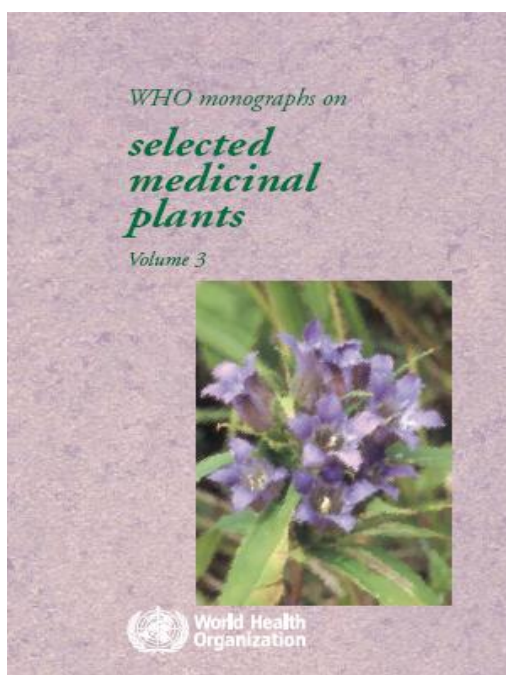


Figura 9. Documentos oficiales referentes al control de calidad de plantas medicinales publicados por la OMS y algunos de sus países miembros.

2.3. Importancia del establecimiento de los parámetros de eficacia, seguridad y calidad de las plantas medicinales

El control de calidad de las plantas medicinales es vital para asegurar su seguridad y eficacia; la falta de calidad puede repercutir en una alta incidencia de reacciones adversas atribuidas en particular a adulteraciones o a la contaminación con sustancias tóxicas. Las especificaciones y métodos para el control de calidad de productos medicinales terminados, particularmente para mezclas, son más complejas que para otros productos farmacéuticos. La calidad de estos productos se ve influenciada por las características de la droga cruda utilizada y las buenas prácticas de cultivo y recolecta, entre otras.

La evaluación de la calidad engloba aspectos como la evaluación farmacéutica, el material vegetal, los tipos y formas de preparación de los productos herbolarios, el producto terminado y la estabilidad de los mismos; debe estar sustentada en monografías farmacopéicas, el documento “*Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*” establece que en caso de que no se disponga de una, se deberá presentar un manuscrito con el formato de los documentos oficiales (WHO, 2002a).

Para asegurar la calidad, el material vegetal debe ser identificado correctamente mediante el uso de la definición botánica, la definición y descripción de la parte de la planta utilizada para la preparación del medicamento, indicando también el estado en el que se emplea dicha droga. Esto con la finalidad de evitar sustituciones que pueden aumentar la toxicidad del material original, llegando a provocar efectos en detrimento de la salud de quien utiliza dichos preparados, ejemplos de este tipo de efectos no deseados son la hepatitis, fibrosis renal o envenenamiento por podofilotoxina entre otros (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

También es parte del aseguramiento de la calidad la especificación de los constituyentes activos característicos y de ser posible los límites de contenido; en este sentido es de importancia la determinación de límites de contenido de sustancias extrañas, impurezas y microorganismos que pueden llegar a ser causantes de efectos tóxicos.

En este contexto, uno de los aspectos de mayor relevancia para evaluar la calidad de las drogas crudas y preparados herbolarios es el estudio de los marcadores químicos, que son indicadores utilizados para diferenciar a las drogas crudas de sus posibles sustitutos (Li *et al.*, 2008). Estos marcadores químicos se clasifican en ocho categorías que se enumeran a continuación:

- a) Componentes terapéuticos, son los compuestos responsables de la actividad de un medicamento herbolario.
- b) Componentes activos, los compuestos individuales que pueden o no presentar los efectos terapéuticos; sin embargo, en combinación contribuyen con los componentes activos en el efecto farmacológico.
- c) Componentes sinérgicos, aquellos que no contribuyen a los efectos terapéuticos o actividad biológica directamente. Sin embargo, actúan como coadyuvantes de la actividad modulando los efectos terapéuticos.
- d) Componentes característicos, aquellos compuestos específicos y/o restringidos que pueden o no presentar el efecto terapéutico.
- e) Componentes mayoritarios, son los compuestos más abundantes presentes en un producto herbolario, pueden ser los componentes característicos y presentar alguna actividad biológica, además pueden usarse para análisis cualitativos, cuantitativos, identidad y evaluación de la estabilidad.

- f) Componentes iniciadores, son los compuestos precursores o productos de una reacción química o enzimática. Son utilizados para evaluar la calidad y la estabilidad durante los períodos de almacenamiento largos.
- g) Componentes tóxicos, compuestos responsables de la toxicidad o efectos adversos.
- h) Componentes generales, son los componentes comunes y específicos presentes en una especie particular, género o familia.

Finalmente el proceso de fabricación de los productos herbolarios debe ser descrito detalladamente, mencionando las sustancias añadidas a la formulación; es necesario también, contar con un método de identificación y análisis de la preparación.

Una de las características prioritarias con las que un producto herbolario debe cumplir es la seguridad. La OMS, en el documento “*Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional*”, establece que la evaluación de la inocuidad de productos herbolarios deberá seguir los mismos lineamientos que sigue cualquier producto medicinal. En el caso de los productos herbolarios, de los cuales se tiene información comprobable de su uso tradicional durante varios años sin que se haya demostrado la presencia de efectos adversos, se puede permitir que dicho producto quede exento de las medidas de reglamentación restrictivas, a menos que se presenten pruebas que exijan una nueva evaluación. En este sentido es también relevante documentar efectos secundarios notificados conforme a los procedimientos normales de farmacovigilancia, la fuente más común de información sobre efectos adversos e interacción con medicamentos son los ensayos clínicos y reportes de la población.

Existen varios enfoques para evaluar esta característica. Los efectos tóxicos de una preparación a base de plantas puede ser atribuida principalmente a las características

peligrosas de los constituyentes de la misma y a las malas prácticas de manufactura o contaminación (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

La evaluación de la toxicidad va a consistir de varias metodologías, entre las que se encuentran: técnicas *in vivo*, *in vitro*, en líneas celulares, estandarizaciones y modelos adecuados para evaluar toxicidad.

La OMS establece las características con las que deben cumplir dos de la metodologías más utilizadas para determinar la toxicidad de un producto medicinal (WHO, 2002a).

En la prueba de toxicidad aguda es necesario utilizar al menos dos especies de animales, incluidos hembras y machos, en grupos de por lo menos cinco animales por sexo; en cuanto a la vía de administración se establece que sea oral debido a que es la de mayor uso, pero en ocasiones es importante también realizar los ensayos por vía parenteral; en roedores las dosis deben ser las necesarias para determinar la dosis letal media, en otros animales se debe utilizar un número suficiente de dosis diferentes para observar los signos manifiestos de toxicidad. La muestra se administra una o más veces durante 24 horas y se observan los signos de toxicidad, su gravedad, aparición, progresión y reversibilidad; los animales deben ser observados durante al menos siete a catorce días al término de los cuales se practica la autopsia y de ser necesario un examen histopatológico de los órganos que presenten cambios macroscópicos.

En la prueba de toxicidad a largo plazo es necesario utilizar al menos dos especies de animales, incluidos hembras y machos, en grupos de por lo menos diez roedores y tres animales por sexo. La muestra se administra durante el periodo previsto de uso clínico, por lo general la sustancia de prueba se administra durante siete días y las dosis deben ser tres diferentes. Se debe observar signos generales como peso corporal e ingesta de alimento y agua; se realizarán análisis hematológicos y pruebas de las funciones renal

y hepática. Se practica la autopsia y de ser necesario un examen histopatológico de los órganos que presenten cambios macroscópicos.

Con la finalidad de asegurar la eficacia de los productos medicinales a base de plantas es importante especificar y describir los efectos farmacológicos y clínicos. En el caso de medicamentos tradicionales para el tratamiento de trastornos leves o con indicaciones inespecíficas, los requisitos para comprobar su eficacia pueden ser menos estrictos, teniendo en cuenta la antigüedad de su uso. En estos casos solo se solicitará anécdotas o tradición oral; y la realización de pruebas de eficacia preclínica basadas en ensayos farmacológicos sencillos. En los casos en los que no se haya determinado el uso tradicional, será necesario realizar pruebas clínicas, reportes de casos, series de casos y ensayos clínicos aleatorizados (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

Las anécdotas o tradición oral no son tomados en cuenta en la medicina convencional, pero son importantes componentes de la evaluación de la eficacia en la medicina herbolaria; esto debido a que no ha habido mucha investigación acerca de una gran cantidad de especies de plantas, y el conocimiento sobre los usos y beneficios de las mismas están limitados a curanderos de tribus que en la mayoría de las veces viven en comunidades aisladas.

Los informes de casos son el punto de partida de las pruebas de eficacia; éstos pueden representar las primeras pistas en la identificación de efectos secundarios desconocidos. Estos informes pueden ser retrospectivos o prospectivos.

Las series de casos son el conjunto de los informes de casos individuales y van a permitir explorar una asociación particular de efectos adversos o beneficios, con este tipo de información es posible la formulación de una hipótesis.

Los ensayos clínicos aleatorizados son la mejor opción para evaluar la eficacia de los medicamentos herbolarios; sin embargo, no siempre pueden ser implementados.

3. Justificación, Objetivos e Hipótesis

Durante siglos, la medicina herbolaria tradicional y sus preparados han desempeñado un papel muy importante en los distintos sistemas de salud a nivel mundial en países como China, Estados Unidos de Norteamérica, México y Europa, como la fuente primaria para el tratamiento de diversas enfermedades, representando un importante recurso terapéutico. Sin embargo, a pesar del amplio uso de estas plantas medicinales son pocos los medicamentos herbolarios que han sido evaluados sistemáticamente para comprobar su seguridad y eficacia (tanto clínicas como preclínicas). También son pocas las especies analizadas con la finalidad de establecer sus criterios de calidad. La investigación científica necesaria para estos estudios es muy compleja y de carácter multidisciplinario ya que involucra análisis botánicos y etnomédicos, estudios toxicológicos, farmacológicos y químicos, el establecimiento de los procedimientos de control de calidad y estandarización de las drogas crudas en función de su composición, como los aspectos más relevantes.

Con base en las consideraciones anteriores el presente trabajo de investigación tiene como objetivo primordial establecer algunos parámetros de calidad, inocuidad y eficacia preclínicas de la especie medicinal *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae), la cual es ampliamente comercializada en el México actual para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales y diabetes.

La información generada contribuirá a la elaboración de una monografía tipo OMS de la especie medicinal *L. porteri*.

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

- i. Determinar la composición del aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de la droga cruda de *L. porteri* mediante la técnica de cromatografía de

- gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Este estudio permitirá generar el perfil cromatográfico del aceite esencial y será de utilidad para las pruebas de identidad química de la planta.
- ii. Obtener el perfil de los compuestos volátiles presentes en la planta mediante la técnica de Headspace Microextracción en Fase Sólida acoplada a Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. (HS-MEFS-CG-EM-TOF). El cual será también de utilidad para las pruebas de identidad química de la planta.
 - iii. Determinar la toxicidad aguda en ratones del aceite esencial y la infusión, preparados a partir de la especie *Ligusticum porteri*, con la finalidad de complementar los estudios de inocuidad preclínica de la planta.
 - iv. Determinar el potencial antinociceptivo del extracto orgánico íntegro, la infusión, el aceite esencial y los tres compuestos mayoritarios de la especie, mediante la aplicación de los modelos de estiramiento abdominal y placa caliente.
 - v. Corroborar el potencial espasmolítico del aceite esencial y la infusión mediante la prueba de tránsito intestinal en ratones.
 - vi. Determinar el efecto del aceite esencial y la infusión de *Ligusticum porteri* mediante estudios de tipo agudo y de tolerancia tanto a la glucosa como a la sacarosa en ratones normales y diabéticos. Este análisis complementará los estudios del potencial antidiabético de la planta ya que previamente en nuestro grupo de trabajo se investigó el potencial antidiabético del extracto íntegro y algunos compuestos.

Hipótesis.

Los usos tradicionales de *Ligusticum porteri* sugieren la presencia de compuestos con actividad antinociceptiva y espasmolítica.

4. Parte experimental

4.1. Material vegetal

Las muestras de raíz de la especie *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) utilizadas en el presente estudio se obtuvieron por recolección y de manera comercial. La muestra A fue recolectada en el municipio de Basigochi, Chihuahua, México en octubre de 2005, la identificación y clasificación de la especie estuvo a cargo del Dr. Robert Bye, investigador del Instituto de Biología; una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del herbario nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM (voucher: Bye 31733). Las muestras B y C se adquirieron comercialmente en los establecimientos “La flor Azteca” y “Plantas medicinales” respectivamente, ubicados en el mercado de Sonora de la ciudad de México, en Julio de 2010.

La fragmentación de material vegetal se realizó en un molino Willey Modelo 4.

4.2. Procedimientos generales de análisis

4.2.1. Análisis cromatográficos

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 μm ASTM).

Los análisis cromatográficos por CCF analítica y de tipo preparativo CCFP se realizaron sobre placas de aluminio y de vidrio, respectivamente, de 0.25 mm de grosor recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck, malla 3.5-7.0 μm ASTM) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales y

empleando diversos sistemas de elución (Cseke *et al.*, 2006), como agente revelador se empleó una solución de sulfato sérico amoniacal. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110 °C durante un minuto.

La obtención de los perfiles por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), se realizó utilizando el método analítico previamente descrito por Rivero *et al.* (2011), en un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un detector de UV Dual 2487; utilizando una columna Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, tamaño de partícula de 5 µm), de 4.0 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud equipada con un guarda columna compatible (Hibar® LichroCART® 4-4). La elución se realizó empleando un gradiente a base de una mezcla binaria constituida por ACN-H₂O (con 0.5% ácido acético, HAc) (**Anexo II**). La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron 260 y 280 nm. El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se realizó en un cromatógrafo marca Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO Pegasus 4D. La columna utilizada una columna capilar de fase 5% fenil-metil silicón (DB-5) con las siguientes dimensiones 10 m de longitud, 0.18 mm de diámetro y 0.18 µm de espesor de película. El programa de temperatura del horno fue 40 °C (1 min), 20 °C/min hasta 300 °C (5 min). Tipo de inyección Split (con división de flujo), 1:20. Se empleó helio como gas acarreador (Praxair, grado 5.0 Ultra alta pureza) con un flujo de 1 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C. El tipo de ionización fue Ionización electrónica, el voltaje para el registro de los espectros de masas utilizado fue de 70 eV, el detector (analizador másico) de tiempo de vuelo (TOF). La adquisición espectral fue de 20 espectros/seg. El retraso de encendido del filamento de 0

min. La temperatura de la cámara de ionización fue de 200 °C. Las masas se registraron en un rango de 33 a 800 uma.

La identificación de los componentes mayoritarios se realizó mediante la comparación de los índices de retención obtenidos para los metabolitos detectados con aquellos previamente descritos y por coelución con muestras auténticas. En todos los casos se analizaron los espectros de masas con los reportados en diferentes fuentes de información como la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST).

4.3. Preparación de extractos a partir de la especie *Ligusticum porteri*

4.3.1. Preparación del extracto orgánico

2.9 Kg de raíz de *L. porteri* seca y molida (muestra A) se extrajeron mediante un proceso de maceración utilizando una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) a temperatura ambiente. El extracto orgánico resultante se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose 398.0 g de un residuo viscoso de color marrón y aroma característico.

4.3.2. Preparación de la infusión

La infusión se preparó a partir de las raíces de la especie (Muestra B). Para ello se adicionaron 36 gramos de material vegetal molido a un litro de agua hirviendo, esta mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos; al término de este tiempo se realizó una filtración por gravedad para separar el residuo vegetal. La fracción acuosa obtenida se concentró a sequedad para obtener 2 gramos del extracto seco.

4.3.3. Obtención del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial se utilizó un proceso de hidrodestilación a partir de 200 gramos de raíz seca y molida de *L. porteri* y 2 litros de agua destilada, utilizando un equipo Clevenger con una temperatura de 90°C durante 5 horas. El aceite se extrajo de un litro de destilado mediante un proceso de reparto con 300 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) por triplicado. El disolvente fue eliminado por evaporación *in vacuo* mediante el uso de rotaevaporador (Laborota 4000, Heidolph) para obtener un líquido viscoso de color amarillo cuyo peso fue de 10 g.

4.4. Pruebas de identidad

4.4.1. Análisis del aceite esencial por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

El análisis de la composición del aceite esencial obtenido a partir de la muestra C de *L. porteri*, se realizó por CG-EM (Apartado 4.2.1 de esta sección). La identificación de los componentes mayoritarios presentes en la esencia se realizó mediante la comparación de los espectros de masas generados por los compuestos con aquellos de la biblioteca del equipo. Finalmente, la cuantificación de estos constituyentes se realizó mediante la medición de las correspondientes áreas bajo la curva de cada pico, obtenidas por el software del equipo (ChromaTOF®).

4.4.2. Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de Headspace Microextracción en Fase Sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF)

Para la separación e identificación de los compuestos volátiles mediante (HS-MEFS-CG-EM-TOF) se utilizaron fibras de diferentes polaridades: una PDMS (100 μm), y PDMS-

DVB-CAR (50/30 μm) (Supelco Technology, St. Louis, Mo., U.S.A.). Las fibras se acondicionaron en un puerto de inyección de CG durante dos horas antes de ser utilizadas a una temperatura de 300°C (PDMS) y 250 °C (PDMS-DVB-CAR). Una vez realizada la extracción de la muestra (1 min) la fibra se trasladó al puerto de inyección de CG para realizar la desorción (3 min) y análisis cromatográfico utilizando el cromatógrafo de gases Agilent 6890N antes mencionado.

Con la finalidad de mejorar el proceso de extracción se realizaron variaciones a la preparación de la muestra:

En la primera se colocaron en un frasco vial de 20 mL 500 mg de droga cruda, 75 mg de NaCl (para incrementar la eficiencia en la extracción y favorecer el reparto entre los analitos y las fibras) y 5 mL de agua destilada, a continuación la aguja del dispositivo de MEFS se colocó a través del septum en el vial de modo que al exponer la fibra ésta no tuviese contacto con la mezcla, la fibra se expuso durante 30 minutos a una temperatura de 45 °C con agitación constante a 800 rpm.

En un segundo ensayo se cambió el tiempo de extracción a 1 minuto con una temperatura de 45 °C y agitación constante a 800 rpm.

Finalmente, se establecieron las condiciones para la extracción en un tiempo de 1 minuto a temperatura ambiente con agitación constante (800 rpm).

4.5. Aislamiento y purificación de los compuestos *Z*-3-butilidenoftálida (3), *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (6)

4.5.1. Fraccionamiento preliminar

El extracto orgánico seco obtenido se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante particiones sucesivas. Para lo cual, el extracto se reconstituyó en una mezcla

de MeOH-H₂O (1:1) y se sometió a un proceso de reparto utilizando inicialmente hexano, posteriormente CH₂Cl₂ y finalmente AcOEt. Este proceso condujo a la obtención de cuatro fracciones primarias F₁-F₄.

4.5.2. Aislamiento de los compuestos *Z*-3-butilidenftálida (**3**), *Z*-ligustílida (**1**) y diligustílida (**6**) a partir de la fracción de hexano primaria de *L. porteri*

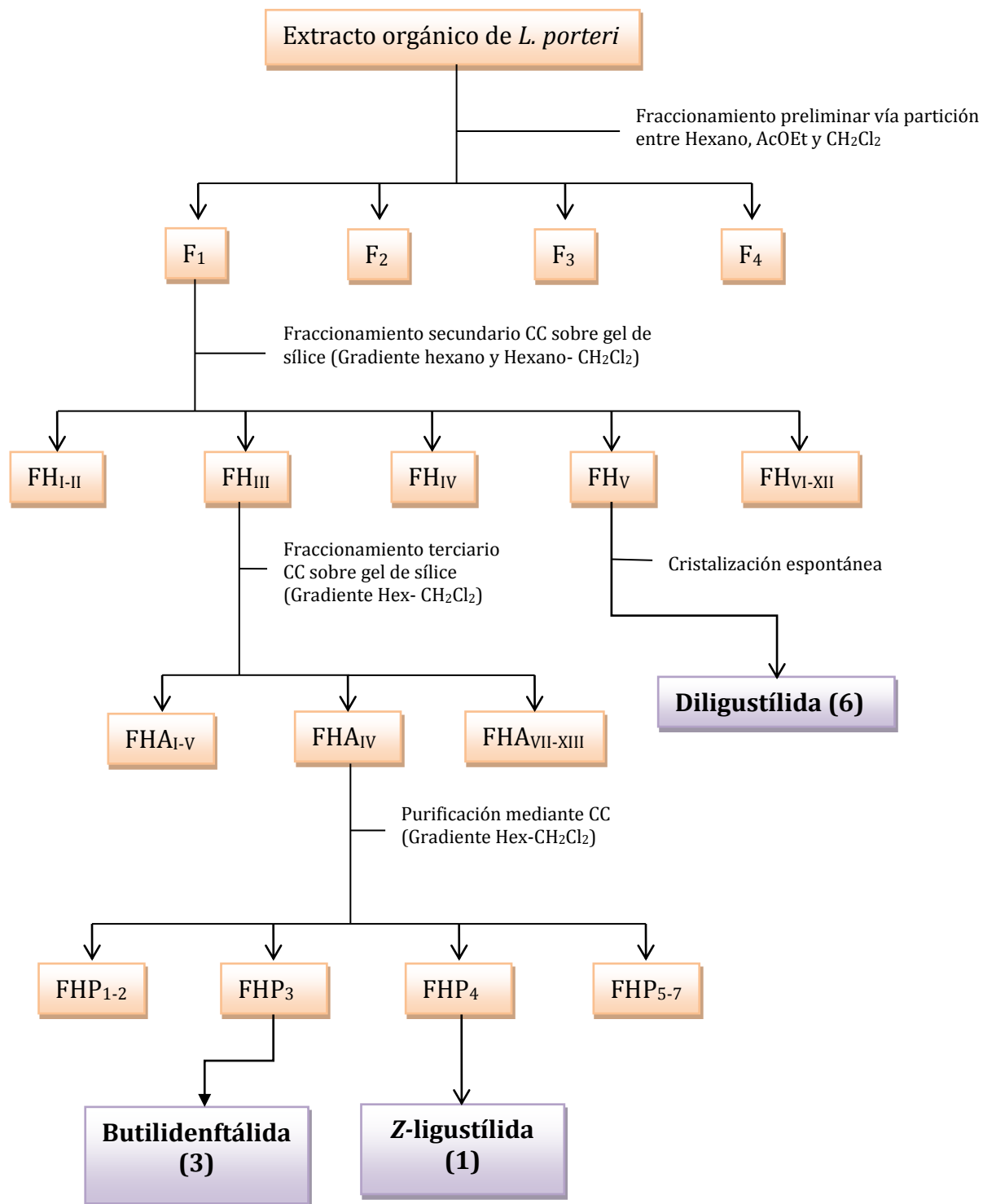
El aislamiento de la *Z*-3-butilidenftálida (**3**) y *Z*-ligustílida (**1**) se realizó mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (300 g) a partir de 6 gramos de la fracción de hexano F₁ (**Esquema 1**) utilizando como fase móvil hexano y mezclas de hexano-CH₂Cl₂ incrementando gradualmente la polaridad. Este procedimiento generó un conjunto de trece fracciones secundarias, FH_I-FH_{XIII}.

4.5.3. Purificación de los compuestos **1**, **3** y **6**

La purificación de los compuestos **1** y **3** se realizó a partir de la fracción secundaria FH_{III} mediante CC sobre gel de sílice (50 g), utilizando como sistema de elución un gradiente de hexano y mezclas de hexano-CH₂Cl₂. En este procedimiento se obtuvieron trece fracciones denominadas FHA_{I-XIII}. A partir de la fracción FHA_{IV} se realizó una cromatografía en la que se obtuvieron puros el compuesto *Z*-3-butilidenftálida (**3**) en la fracción FHP₃ y el compuesto *Z*-ligustílida (**1**) en la fracción FHP₄. (**Esquema 1**).

De la fracción secundaria FH_V (**Esquema 1**) precipitó de manera espontánea 443 mg de un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 127-129 °C, idéntico en todos sus aspectos a la diligustílida (**6**).

Esquema 1. Aislamiento de la *Z*-ligustílida (1), *Z*-3-butilidenftálida (3) y diligustílida (6) a partir del extracto orgánico de la raíz de *L. porteri*.



4.6. Estudios de seguridad preclínica

4.6.1. Estudios de toxicidad aguda de la infusión y el aceite esencial

Para llevar a cabo la evaluación de la toxicidad aguda de la infusión y el aceite esencial de la especie *Ligusticum porteri*, se utilizó la metodología experimental descrita por Lorke (1983). Para esto se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, con un peso promedio de 25 gramos, adquiridos en Harlan de México S.A. de C.V.

Este experimento constó de dos etapas. En la primera se ensayaron tres dosis de cada uno de los extractos (10, 100 y 1000 mg/Kg) las cuales fueron administradas vía oral (*p.o.*) a ratones con 12 horas de ayuno y libre acceso al agua. Las muestras fueron preparadas utilizando solución salina y 0.1% de Tween 80. Los animales fueron observados durante las dos primeras horas posteriores a la administración de los extractos y se monitorearon durante los siguientes 15 días, registrando su peso corporal. Una vez transcurrido este tiempo se les realizó una necropsia, con la intención de observar la existencia de daño macroscópico en órganos.

En la segunda etapa los ratones recibieron las dosis de 1600, 1900 y 5000 mg/Kg, las muestras fueron preparadas y administradas en las mismas condiciones que para la primera fase. Los animales fueron observados durante las dos primeras horas posteriores a la administración de los extractos y se monitorearon durante los siguientes 15 días, registrando su peso corporal. Una vez transcurrido este tiempo se les realizó una necropsia, con la intención de observar la existencia de daño macroscópico en órganos.

A partir de los resultados obtenidos de las dos fases del método de Lorke, se puede estimar el valor de la Dosis Letal 50 (DL₅₀). Este valor se calculó utilizando una media geométrica entre la dosis donde se presentó el deceso del primer animal y la última dosis en la que no hubo muertos.

4.7. Estudios de eficacia preclínica

4.7.1. Potencial antinociceptivo utilizando las pruebas de placa caliente, estiramiento abdominal y tránsito intestinal

Para realizar la evaluación del potencial antinociceptivo se utilizaron los protocolos para placa caliente y estiramiento abdominal descritos en la literatura (Williamson *et al.*, 1996). Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, con un peso promedio de 25 gramos, adquiridos de Harlan de México S.A. de C.V. Los animales se mantuvieron en el biotério con ciclos de 12 horas de luz y oscuridad. Para realizar el experimento se utilizaron animales en ayuno con libre acceso a agua durante las 12 horas previas al experimento.

4.7.1.1. Potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos *Z*-3-butilidenftálida (3), *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (6) obtenidos de la especie *Ligusticum porteri* en la prueba de placa caliente

Para este experimento los animales se sometieron a un proceso de adaptación. Para ello los animales se colocaron dentro de un cilindro acrílico transparente y sobre la placa de calentamiento (Modelo Le 7406, Panlab Technology Bioresearch), apagada, durante 15 minutos. Este procedimiento se realizó un día antes y momentos antes de iniciar el experimento. Durante el experimento, los ratones se introdujeron en el cilindro acrílico que se encontraba sobre una placa caliente a una temperatura constante de 55.5 ± 0.2 °C. En caso de no presentar respuesta, los animales se retiraron de la placa a los 30 segundos con la finalidad de evitar la aparición de lesiones.

Los periodos de latencia se determinaron a los 30, 60, 90, 120 y 150 min a partir de la administración de los tratamientos. Los extractos y compuestos se suministraron por vía oral suspendidos en solución salina con 2% de Tween 80. En los casos de la infusión y el aceite esencial se utilizaron dosis de 31.6, 100 y 316 mg/Kg, el extracto íntegro se evaluó a las dosis de 75, 150 y 300 mg/Kg; para los compuestos *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (6) se utilizaron las dosis de 10, 31.6 y 56.2 mg/Kg mientras que la *Z*-3-butilidenftálida (3) se ensayó a las dosis de 10, 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg *p.o.* El vehículo administrado fue solución salina isotónica (Cegiela-Carlio *et al.*) y como fármaco de referencia se empleó morfina a una dosis de 5 mg/Kg administrada por vía intraperitoneal (*i.p.*).

4.7.1.2. Potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos *Z*-3-butilidenftálida (3), *Z*-ligustílida (1) y diligustílida (6) obtenidos de la especie *Ligusticum porteri* en la prueba de estiramiento abdominal

La infusión, el aceite esencial (31.6, 100 y 316 mg/Kg), el extracto íntegro 75, 150, 250 y 300 mg/Kg, los metabolitos *Z*-ligustílida (1), *Z*-3-butilidenftálida (3) (10, 31.6 y 56.2 mg/Kg) y diligustílida (6) (10, 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg) se administraron por vía oral 30 minutos previos al experimento; una vez transcurrido el periodo de absorción, se inyectó por vía intraperitoneal una solución de ácido acético al 0.6%. Los animales se colocaron en una caja de plástico transparente y se observaron durante un tiempo de 30 minutos. La nocicepción se manifiesta como estiramientos abdominales, contracciones y flexiones del cuerpo del animal. El efecto se determinó con base en la disminución del número de estiramientos de los animales tratados con respecto al grupo control (Tween 80 al 2% en SSI). Como control positivo se utiliza el fármaco Dipirona a la dosis de 100 mg/Kg *p.o.*

4.7.1.3. Potencial espasmolítico de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y el compuesto diligustílida (6) obtenidos de la especie *Ligusticum porteri* en la prueba de tránsito intestinal

La infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro (31.6, 100 y 316 mg/Kg) y la diligustílida (6) (10, 31.6 y 100 mg/Kg) se administraron por vía oral. Después de 15 minutos de la administración de los preparados de la planta o controles (positivo y blanco), se les 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 el intestino delgado y medir el porcentaje de avance del carbón (Williamson *et al.*, 1996; Astudillo *et al.*, 2004). Como control positivo se empleó el fármaco Loperamida; el blanco consistió de una suspensión de Tween 80 (2%) en solución salina isotónica.

Para establecer los resultados del ensayo se determinó la longitud total del intestino y la distancia recorrida por el carbón activado (Tan-No *et al.*, 2003; Yancey-Wrona *et al.*, 2009). Con estos valores fue posible calcular el porcentaje de avance del carbón utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de avance} = DC / LI * 100$$

Donde.

DC: Distancia recorrida por el carbón

LI: Longitud total del intestino delgado

4.7.2. Evaluación del potencial antidiabético del aceite esencial y la infusión de *L. porteri*

La actividad antidiabética de estos extractos fue evaluada mediante la aplicación de experimentos de tipo agudo y sub-agudo *in vivo* con base en los protocolos descritos en la literatura (Cristians *et al.*, 2009; Brindis *et al.*, 2011).

Se utilizaron ratones macho de la cepa ICR, de 25 gramos de peso, con ayuno de 12 horas.

4.7.2.1. Selección del modelo de inducción de la condición diabética en los animales de experimentación

Los ratones macho de la cepa ICR de 30 gramos de peso promedio, se diabetizaron con una dosis única intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 100 mg/Kg) disuelta en una solución amortiguadora de citratos con un pH de 4.5, que se administró después de un tratamiento con una solución de dinucleótido de nicotinamida (NAD, 30 mg/Kg) con la finalidad de proteger a las células β pancreáticas del daño oxidativo excesivo producido por la estreptozotocina (Masiello *et al.*, 1998).

4.7.2.2. Determinación de los niveles de glucosa sanguínea

Las muestras de sangre fueron colectadas de la vena caudal de los animales a través de una incisión en el final de la cola. Los niveles de glucosa en sangre fueron determinados utilizando el método enzimático de la glucosa oxidasa, mediante un glucómetro comercial (One Touch Ultra, Jonhson & Jonhson, Milpitas, CA, EE.UU.).

4.7.2.3. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo

Para la evaluación de la actividad hipoglucemiante se realizó un experimento de tipo agudo, utilizando ratones normoglucémicos y diabéticos.

Los tratamientos administrados en este experimento fueron: Tween 80 al 2% en SSI como blanco, glibenclamida (10 mg/Kg) como control positivo, el aceite esencial a las dosis de 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg. La administración de todos los tratamientos fue por vía oral y cada uno se preparó suspendiendo la muestra en SSI con 2% de Tween 80. En todos los casos se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas después de la administración de los tratamientos. Una vez obtenidos los valores de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia, de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

Donde:

G_i Valor de glucemia inicial

G_f Valor de glucemia a los diferentes tiempos.

4.7.2.4. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral

Para determinar la actividad antihiper glucémica se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), utilizando ratones con niveles normales de glucosa y ratones diabéticos.

Los tratamientos administrados en este experimento fueron: Tween 80 al 2% en SSI como blanco, glibenclamida (10 mg/Kg) como control positivo, la infusión (31.6, 100 y 316 mg/Kg), y el aceite esencial (31.6, 56.2 y 100 mg/Kg). La administración de todos los tratamientos fue por vía oral y cada uno se preparó suspendiendo la muestra en SSI

con 2% de Tween 80. A los 30 minutos de la administración de los tratamientos los ratones recibieron una carga de glucosa (1g/Kg). En todos los casos se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración de la carga de glucosa. Una vez obtenidos los valores de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia utilizando el mismo procedimiento que se describe en el apartado 4.7.2.3.

Se verificó si los animales presentaron una disminución del pico posprandial.

4.7.2.5. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral

Para determinar la actividad antihiper glucémica se realizó una prueba de tolerancia a la sacarosa oral (OGTT), utilizando ratones con niveles normales de glucosa y ratones diabéticos.

Los tratamientos administrados en este experimento fueron: Tween 80 al 2% en SSI como blanco, acarbosa (3 mg/Kg) como control positivo, la infusión (31.6, 100 y 316 mg/Kg) y el aceite esencial (31.6, 56.2 y 100 mg/Kg). De nueva cuenta, la administración de todos los tratamientos fue por vía oral y cada uno se preparó suspendiendo la muestra en SSI con 2% de Tween 80. Treinta minutos después de la administración de los tratamientos los ratones recibieron la carga de sacarosa (3 g/Kg). En todos los experimentos se tomaron muestras sanguíneas a los tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 3 horas después de la administración de la carga de sacarosa. Una vez obtenidos los valores de glucosa sanguínea (mg/dL), se calcularon los porcentajes de variación de glucemia, de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Se verificó si los animales presentaron una disminución del pico posprandial.



4.8. Análisis estadístico

Los resultados experimentales de los ensayos de la evaluación antidiabética están expresados como el promedio \pm el error estándar (EEM) para un valor de $n=6$. En todos los casos se realizó un análisis de varianza (ANADEVA) seguido de la prueba estadística t -Dunnett para encontrar diferencias significativas entre los grupos de prueba y los grupos control. Un valor de significancia de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente diferente, para el análisis estadístico fue utilizado el programa estadístico Prisma Graph-Pad versión 4.0.

5. Resultados y discusión

Con la finalidad de contribuir al aseguramiento de la calidad de la especie medicinal *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae), ampliamente comercializada en el norte y centro del país sola o en combinación con otras plantas medicinales, en el presente trabajo se determinaron algunos parámetros de identidad química. Así mismo, se realizaron algunas pruebas de eficacia e inocuidad preclínicas para completar la información existente y comprobar así algunos de los usos medicinales de la planta.

5.1. Pruebas de identidad

Entre las pruebas de identidad que permiten el control de calidad de las drogas crudas, se encuentran las químicas, las cuales contribuyen a la identificación de materias primas y sus preparados mediante perfiles cromatográficos específicos para cada especie. Cabe mencionar que estos métodos son los más utilizados por las Farmacopeas a nivel mundial para el control de calidad de las plantas medicinales de mayor uso (Sudberg *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008)

En este estudio en primer lugar se realizó el análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación para determinar sus componentes mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). De manera adicional, se realizó la identificación de los componentes volátiles de la especie utilizando la técnica de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (HS-MEFS-CG-EM-TOF) con dos fibras de diferentes polaridades: PDMS y DVB-PDMS-CAR; de nueva cuenta los componentes se caracterizaron utilizando la técnica de CG-EM.

5.1.1. Análisis del aceite esencial de *L. porteri* por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

La cromatografía de gases es uno de los métodos analíticos más utilizados para el control de calidad de aceites esenciales debido a la volatilidad de sus constituyentes (Guenther *et al.*, 1971; Marriott *et al.*, 2001). Esta técnica permite obtener perfiles cromatográficos representativos y característicos de una esencia. Por otra parte, la técnica tiene la ventaja de que puede ser acoplada a la espectrometría de masas permitiendo así la identificación de los componentes de los aceites por comparación de los espectros obtenidos para cada uno con los de bibliotecas especializadas como la del NIST (National Institute of Standard and Technology) y la información que se describe en la literatura científica especializada, así como por el uso de los índices de retención de los mismos. Con base en estas consideraciones, se utilizó esta técnica para determinar los metabolitos secundarios presentes en la esencia.

El aceite esencial de *L. porteri* se obtuvo como un líquido volátil de color amarillo y el análisis por CG-EM permitió la identificación de 31 metabolitos secundarios, que representan aproximadamente el 99% del total de la esencia, los resultados se resumen en la **Tabla 1**, de estos metabolitos 21 son reportados por primera vez para la especie, mientras los otros 10 habían sido obtenidos en estudios previos. Este análisis demuestra que la característica más importante del aceite es la presencia de un alto porcentaje de ftálicas (44.61%), principalmente *Z*-ligustílida y *Z*-3-butilidenftálica, sesquiterpenoides (10.69%) como el α -acoradieno (3.47%) y el eudesman-2,4(15)-11-trieno (3.22%), y los monoterpenoides β -felandreno (3.64%), timol (2.36%) y acetato de sabinilo (3.31%), (**Tabla 1, Figuras 10 y 11**). Entre los componentes minoritarios se encuentran: terpinen-4-ol (0.33%), *E*-piperitol (0.97%), isotimol metil éter (0.24%), piperitona (0.75%), α -*epi*-cedreno (0.29%), *E*- β -farneseno (0.45%), nerolidol (0.56%) y germacreno B (0.78%).

Estos resultados se obtuvieron por comparación de los espectros obtenidos para cada uno con los de bibliotecas especializadas como la del NIST (National Institute of Standard and Technology) y la información que se describe en la literatura científica especializada, así como por el uso de los índices de retención de Kovats de los mismos.

Los resultados de este estudio contrastan con los reportados por Cegiela-Carlio *et al.* (2005) quienes describieron que el acetato de sabinilo (56.%) era el constituyente mayoritario junto con la *Z*-ligustílida (12.9%) y el sabinol (12.9%). Posiblemente estas diferencias se deban al lugar y/o fecha de recolección de la muestra, datos que no se describen en el trabajo debido a que la misma fue adquirida comercialmente de la compañía Proline Botanicals Ltd. Sin embargo, los resultados muestran similitudes con los publicados para *L. chuanxiong* ya que las ftálicas se encuentran como los componentes mayoritarios de su esencia (Wang *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010). Así mismo, los resultados del presente estudio complementan a los reportados por Ríos y colaboradores (1992) quienes analizaron el extracto hexánico de una muestra de *L. porteri* procedente del estado de Chihuahua y encontraron que componentes mayoritarios eran la *Z*-3-butilidenoftálica (**3**) (26.4%) y los isómeros estructurales *Z* y *E* de la ligustílida (**1**) (28.0 y 28.3%, respectivamente).

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *L. porteri* obtenido por hidrodestilación

#	Compuesto	IR	FM; IM (m/z)	Área (%)
1	56 Tujan-2,4(10)-dieno	946	C ₁₀ H ₁₆ ; 91	4.25
2	16 <i>p</i> -Cimeno	1015	C ₁₀ H ₁₄ ; 119	1.45
3	14 β-Felandreno	1023	C ₁₀ H ₁₆ ; 93	3.64
4	47 <i>n</i> -Pentenilbenzeno	1150	C ₁₁ H ₁₄ ; 117	1.59
5	28 Terpinen-4-ol	1164	C ₁₀ H ₁₈ O; 71	0.33
6	57 <i>E</i> -Piperitol	1193	C ₁₀ H ₁₈ O; 84	0.97

#: Corresponde al número con el que es representado cada compuesto en las figuras. IR: Índice de retención, en una columna DB-5.

FM: Fórmula Molecular. IM: ion molecular

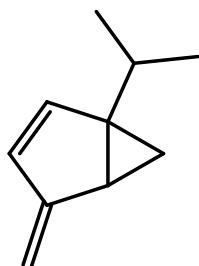
Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *L. porteri* obtenido por hidrodestilación (continuación).

#	Compuesto	IR	FM; IM (m/z)	Área (%)
7	25 Isotimol metil éter	1240	C ₁₁ H ₁₆ O; 149	0.24
8	58 Propanal-2-metil-3-fenil	1244	C ₁₀ H ₁₂ O; 105	0.77
9	59 Piperitona	1245	C ₁₀ H ₁₈ O; 93	0.75
10	60 Timol	1267	C ₁₀ H ₁₄ O; 135	2.36
11	24 Acetato de isobornilo	1276	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ ; 95	1.80
12	31 Acetato de <i>Z</i> -sabinilo	1278	C ₁₂ H ₁₈ O ₂ ; 92	3.31
13	61 Vinilguaiacol	1311	C ₉ H ₁₀ O ₂ ; 91	2.36
14	23 Acetato de α -terpinilo	1335	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ ; 93	0.93
15	62 α - <i>epi</i> -Cedreno	1418	C ₁₅ H ₂₄ ; 119	0.29
16	63 γ -Gurjuneno	1409	C ₁₅ H ₂₄ ; 93	4.48
17	64 β -Cedreno	1427	C ₁₅ H ₂₄ ; 69	1.02
18	65 Drim-8-eno	1442	C ₁₅ H ₂₆ ; 121	1.70
19	66 <i>E</i> - β -Farnesano	1446	C ₁₅ H ₂₄ ; 69	0.45
20	67 α -Acoradieno	1464	C ₁₅ H ₂₄ ; 119	3.47
21	68 7- <i>epi</i> -Bourban-3-en-5,11-oxido	1473	C ₁₅ H ₂₂ O; 119	1.02
22	69 Acetato de chavibetilo	1488	C ₁₄ H ₂₂ O; 121	1.70
23	70 α -Amorfeno	1490	C ₁₅ H ₂₄ ; 69	0.23
24	71 4- <i>epi</i> -Cubebol	1490	C ₁₅ H ₂₆ O; 126	1.30
25	72 Eudesman-2,4(15)-11-trieno	1495	C ₁₅ H ₂₂ ; 132	3.22
26	73 <i>E-p</i> -Etoxicinamil alcohol	1523	C ₁₆ H ₂₀ O; 149	0.72
27	74 Nerolidol	1534	C ₁₅ H ₂₆ O; 69	0.56
28	75 Metil-2-metildodecanoato	1550	C ₁₆ H ₂₀ O; 121	0.72
29	3 <i>Z</i> -3-Butilidenftálida	1550	C ₁₂ H ₁₂ O ₂ ; 159	24.41
30	1 <i>Z</i> -Ligustílida	1550	C ₁₂ H ₁₄ O ₂ ; 159	20.20
31	76 Germacreno B	1552	C ₁₅ H ₂₄ ; 189	0.78
Total identificado %				99.73

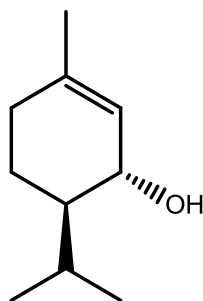
#: Corresponde al número con el que es representado cada compuesto en las figuras. IR: Índice de retención, en una columna DB-5.

FM: Fórmula Molecular. IM: ion molecular

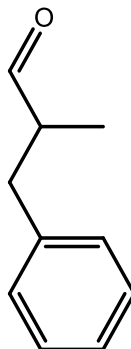
Figura 10. Compuestos presentes en el aceite esencial de *L. porteri* obtenido por hidrodestilación



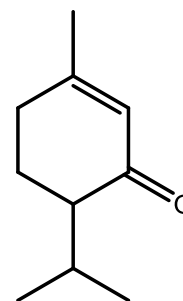
Tujan-2,4(10)-diene (56)



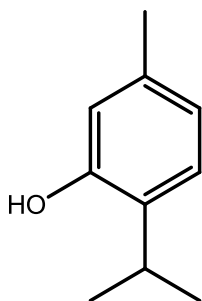
E-Piperitol (57)



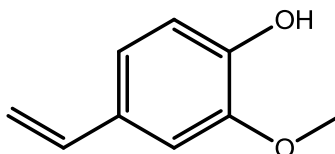
Propanal-2-metil-3-fenil (58)



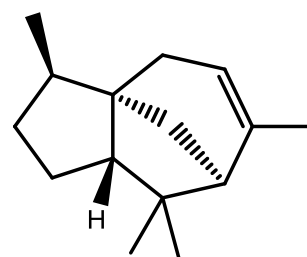
Piperitona (59)



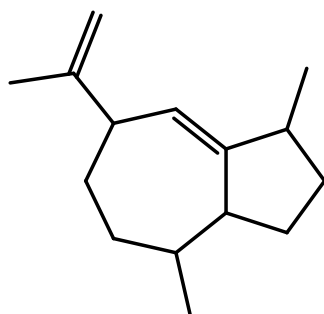
Timol (60)



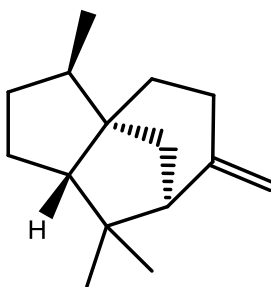
Vinilguaiacol (61)



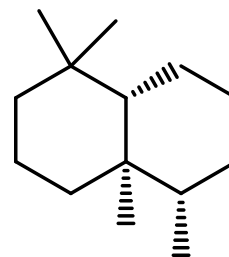
α -*epi*-Cedreno (62)



γ -Gurjuneno (63)

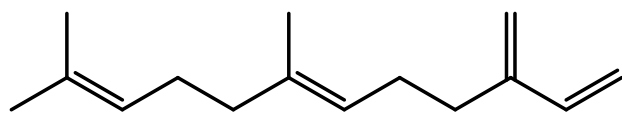


β -Cedreno (64)

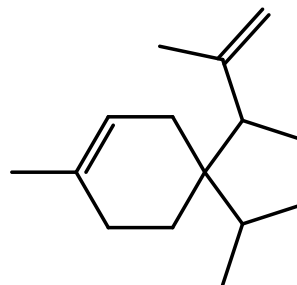


Drim-8-eno (65)

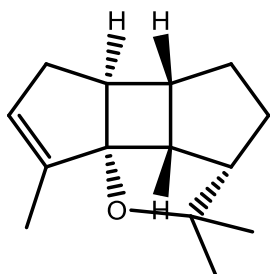
Figura 10. Compuestos presentes en el aceite esencial de *L. porteri* obtenido por hidrodestilación (continuación)



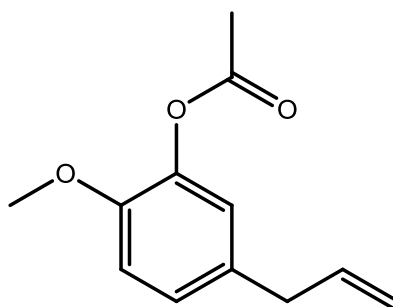
E- β -Farnesano (66)



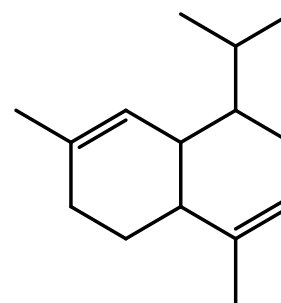
α -Acoradieno (67)



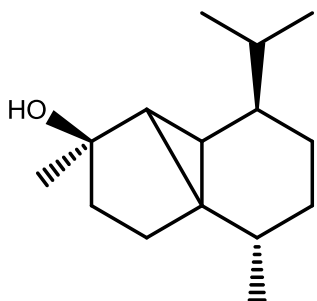
7-*epi*-Bourban-3-en-5,11-óxido (68)



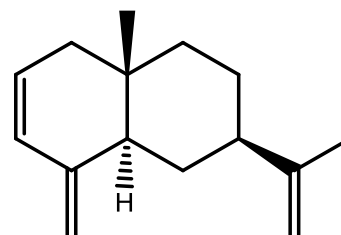
Acetato de chavibetilo (69)



α -Amorfeno (70)

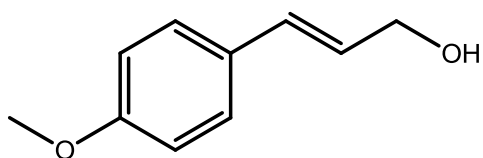


4-*epi*-Cubebol (71)

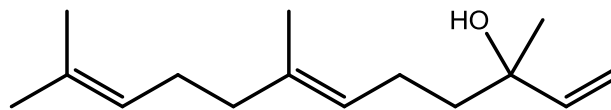


Eudesman-2,4(15)-11-trieno (72)

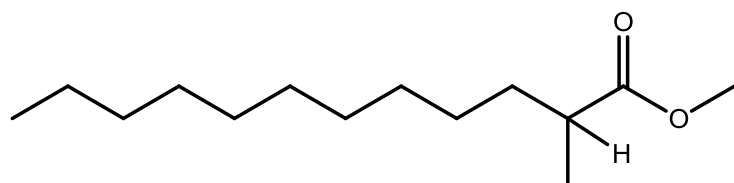
Figura 10. Compuestos presentes en el aceite esencial de *L. porteri* obtenido por hidrodestilación (continuación)



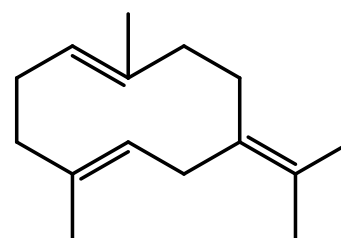
E-p-Metoxi cinamil alcohol (73)



Nerolidol (74)



Metil-2-metildodecanoato (75)



Germacreno B (76)

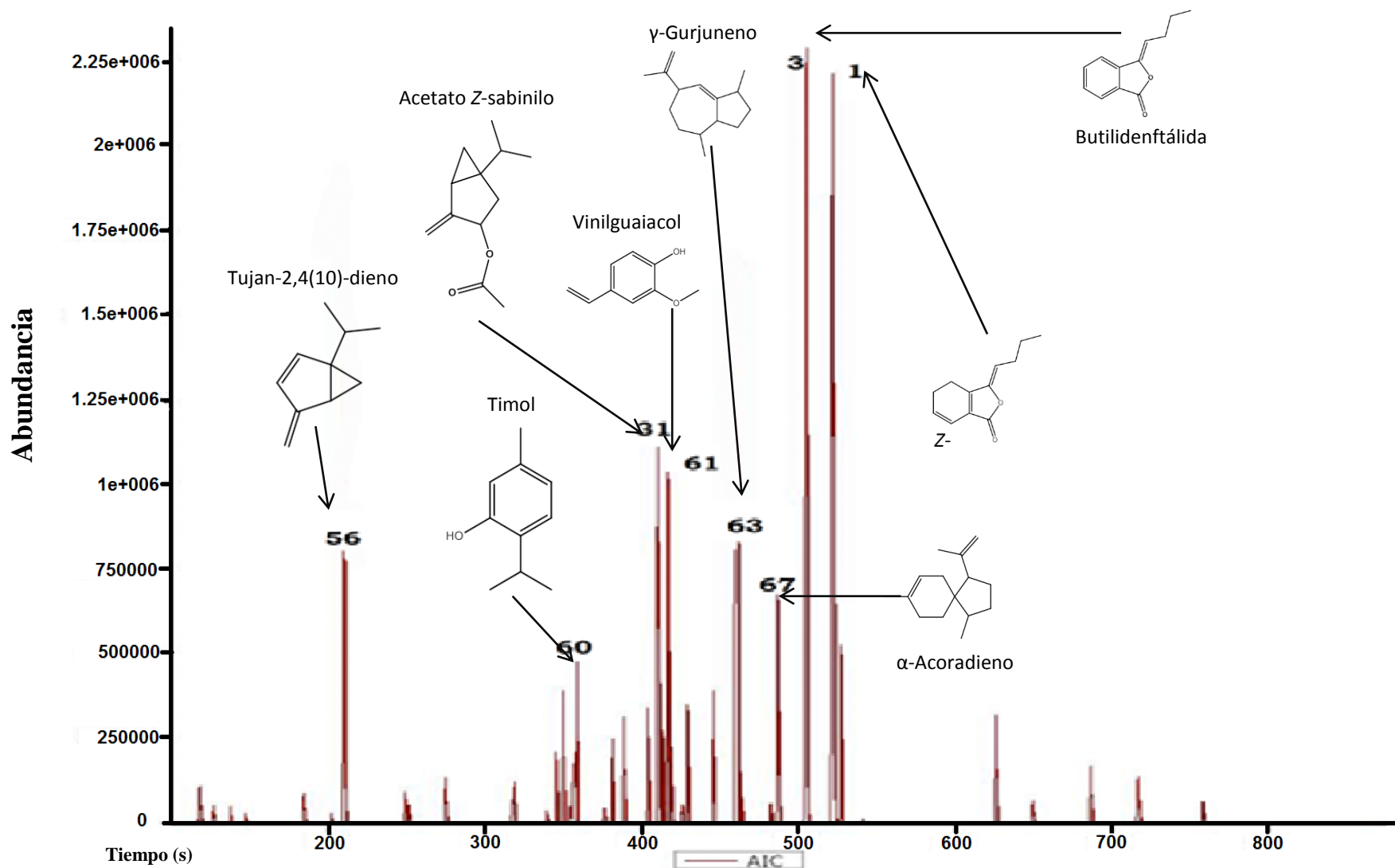


Figura 11. Cromatograma del aceite esencial de *L. porteri*.

5.1.2. Análisis de los compuestos volátiles por la técnica de headspace microextracción en fase sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF)

La microextracción en fase sólida (MEFS) ha sido ampliamente utilizada en diferentes campos de la química analítica, y es particularmente valorada para el análisis ambiental y de alimentos.

El proceso de preparación de la muestra en los más diversos métodos analíticos requiere atención, en especial es importante cuidar la concentración de los analitos; este aspecto cobra mayor importancia cuando éstos son volátiles y se pierden con relativa facilidad. Todo ello introduce errores importantes, no deseados, en el método analítico (Pawliszyn, 2003; Smith *et al.*, 2005; Vas y Vekey, 2004). En este sentido un reciente y exitoso enfoque para la preparación de muestras es la microextracción en fase sólida (MEFS), que fue desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1989 para tratar de corregir las limitaciones de la extracción en fase sólida o líquida (Arthur y Pawliszyn, 1990 ; Belardi y Pawliszyn, 1989). Esta técnica integra el muestreo, extracción y concentración de la muestra en un solo paso además de que evita el uso de disolventes. Los analitos en la muestra son extraídos directamente y concentrados en la fibra de extracción. Este método ahorra tiempo y costos además de permitir mejorar los límites de detección (Kataoka *et al.*, 2000).

El dispositivo utilizado en MEFS es parecido a una jeringa que consiste en un soporte y una fibra ensamblada, que contiene de 1 a 2 cm de la fibra MEFS que puede ser desplazada afuera del soporte. La fibra es de sílice fundida y está recubierta con una película de polímero, el cual puede ser de diferentes tipos. El recubrimiento de polímero actúa concentrando los analitos por absorción/adsorción (Ulrich, 2000).

El proceso de extracción es dependiente de diferentes parámetros entre los que se encuentran el espesor de la película y la agitación de la muestra, el pH, la temperatura de extracción y los tiempos de muestreo. La desorción de los compuestos se lleva a cabo

en el inyector del cromatógrafo de gases en caso de estar usando CG o bien cuando se utiliza CLAE los compuestos son retirados de la fibra mediante elución, con la fase móvil adecuada. Esta técnica es ideal para el acoplamiento con cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Hajhashemi *et al.*, 2003; Vas y Vekey, 2004). En este sentido el muestreo por Headspace (HS) en sus diferentes enfoques desempeña un papel fundamental en el estudio de la composición de la fracción volátil de las plantas, tanto en el campo de la investigación como en el del control de calidad (Bicchi *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior y con la finalidad de completar la determinación de componentes volátiles se aplicó la técnica de headspace microextracción en fase sólida (HS-MEFS-CG-EM-TOF).

Para ello se utilizaron fibras de distintas polaridades, dos temperaturas y dos diferentes tiempos de extracción. Los perfiles presentados fueron obtenidos con las fibras de PDMS y PDMS/DVB/CAR utilizando las siguientes condiciones: 500 mg de droga cruda, 75 mg de NaCl, 5 mL de agua destilada, temperatura ambiente y un tiempo de extracción de 60 segundos.

Los resultados obtenidos indican que la fibra no polar (PDMS) permitió la extracción de un mayor número de compuestos, debido a que al ser un polímero líquido permite extraer los analitos mediante absorción, debido a que estos se disuelven y difunden en el material de revestimiento (Vas y Vekey, 2004). De este análisis se concluyó que los componentes volátiles más relevantes son *p*-cimeno, α -terpineno, ectocarpeno, y *trans*-verbenol. (Tabla 2, Figura 12, 13 y 14).

Con estos perfiles se complementan las pruebas de identidad química de la droga cruda, las cuales entonces consistirán en los perfiles cromatográficos por CLAR, CCD y CG (Ver apartado 4.2 y 4.4 de la sección experimental). La ventaja de este tipo de pruebas es que permiten detectar y cuantificar los compuestos marcadores presentes en las drogas crudas, solas o en combinación.

Tabla 2. Compuestos volátiles identificados en las raíces de *L. porteri* por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS.

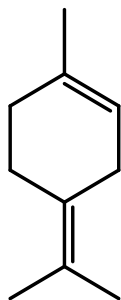
Compuesto	IR	Área %	
		PDMS/DVB/CAR	PDMS
11 α -Pinoeno	936	4.33	2.53
32 β -Pinoeno	978	23.96	---
12 α -Felandreno	1002	1.12	6.42
15 α -Terpinoeno	1013	18.00	7.56
16 <i>p</i> -Cimeno	1015	---	22.92
14 β -Felandreno	1023	16.63	2.34
13 Limoneno	1024	---	4.64
19 γ -Terpinoeno	1051	3.37	10.72
77 Terpinoleno	1082	12.01	2.02
78 α -Fenchol	1099	---	0.03
79 Ectocarpeno	1136	17.16	15.02
80 <i>trans</i> -Verbenol	1136	---	14.18
47 <i>n</i> -Pentenilbenceno	1150	2.73	6.55
81 Mirtenol	1178	---	0.25
82 Formiato de bornilo	1228	0.06	---
25 Isotimol metil éter	1240	---	0.20
24 Acetato de isobornilo	1276	---	1.22

IR: Índice de retención, en una columna DB-5

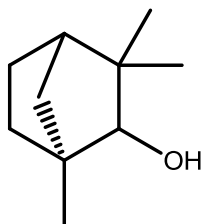
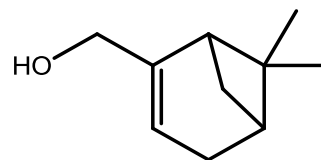
Tabla 2. Compuestos volátiles identificados en las raíces de *L. porteri* por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS (Continuación).

Compuesto	IR	Área %	
		PDMS/DVB/CAR	PDMS
36 Acetato de (-)- <i>trans</i> -pinocarvilo	1287	0.20	---
83 Acetato de mirtenilo	1313	---	0.56
23 Acetato de terpinilo	1341	---	0.15
84 Cedreno	1418	0.11	0.41
85 α -Santaleno	1422	0.15	1.43
86 γ -Elemeno	1429	---	0.39
70 α -Amorfeno	1477	0.11	0.34

IR: Índice de retención, en una columna DB-5

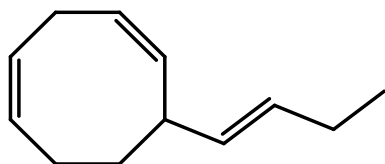
Figura 12. Compuestos volátiles identificados en las raíces de *L. porteri* por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS

Terpinoleno (77)

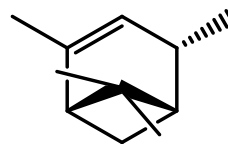
 α -Fenchol (78)

Mirtenol (87)

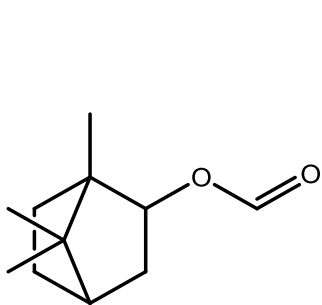
Figura 12. Compuestos volátiles identificados en las raíces de *L. porteri* por HS-MEFS-CG-EM-TOF utilizando las fibras PDMS/DVB/CAR y PDMS (Continuación)



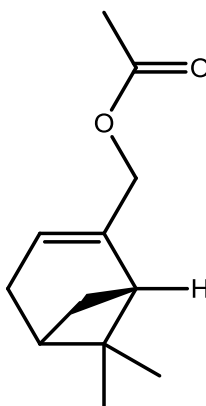
Ectocarpeno (79)



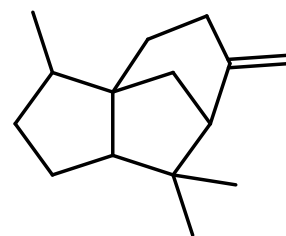
trans-Verbenol (81)



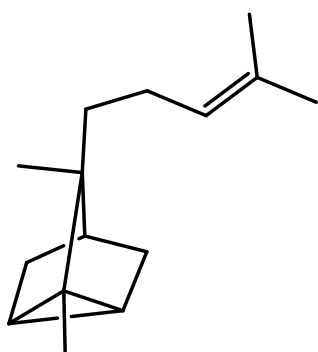
Formiato de bornilo (80)



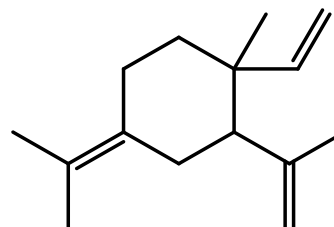
Acetato de mirtenilo (82)



Cedreno (83)



α -Santaleno (84)



γ -Elemeno (85)

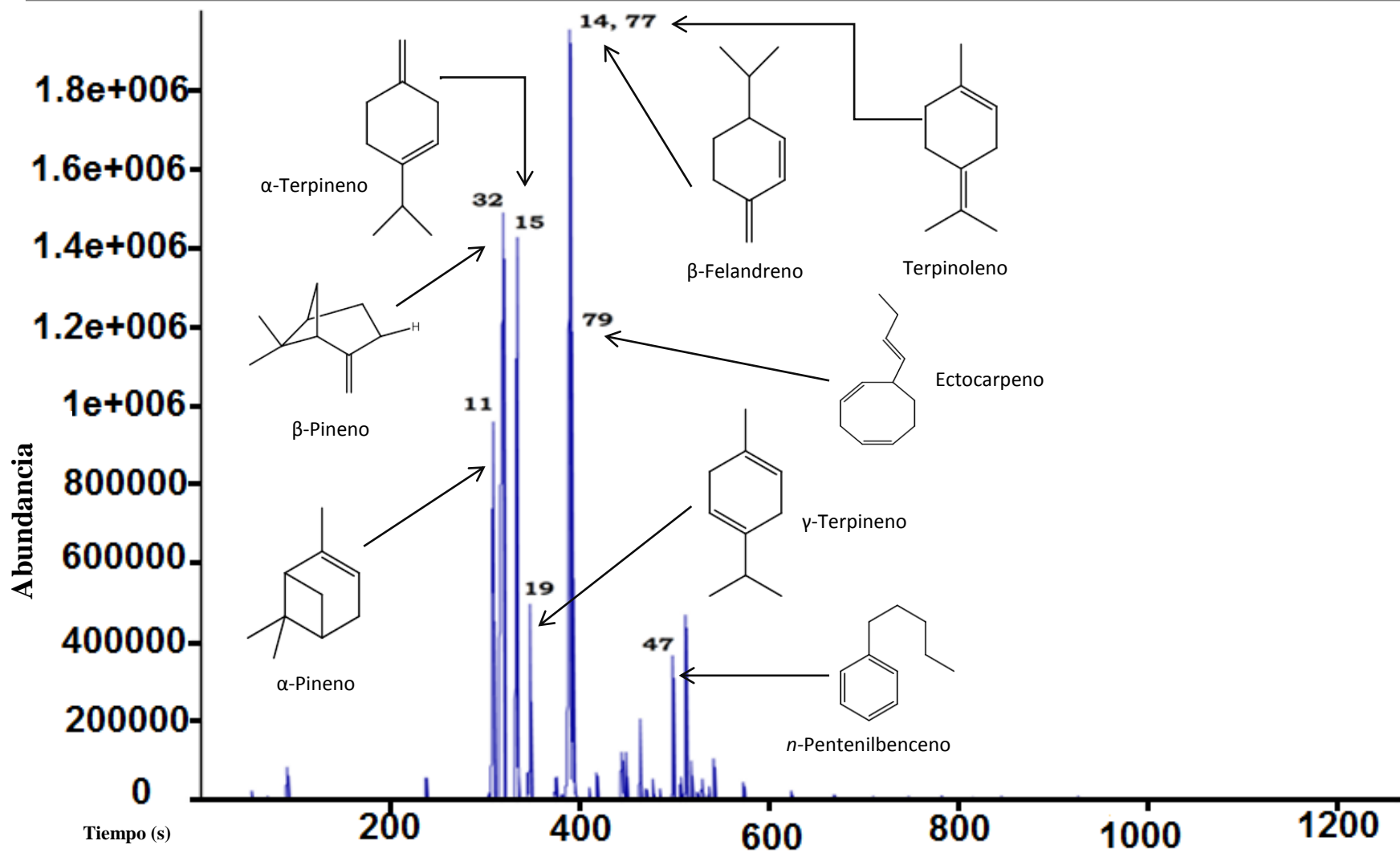


Figura 13. Cromatograma de los componentes volátiles de *Ligusticum porteri* obtenido por HS-MEFS utilizando la fibra PDMS/DVB/CAR.

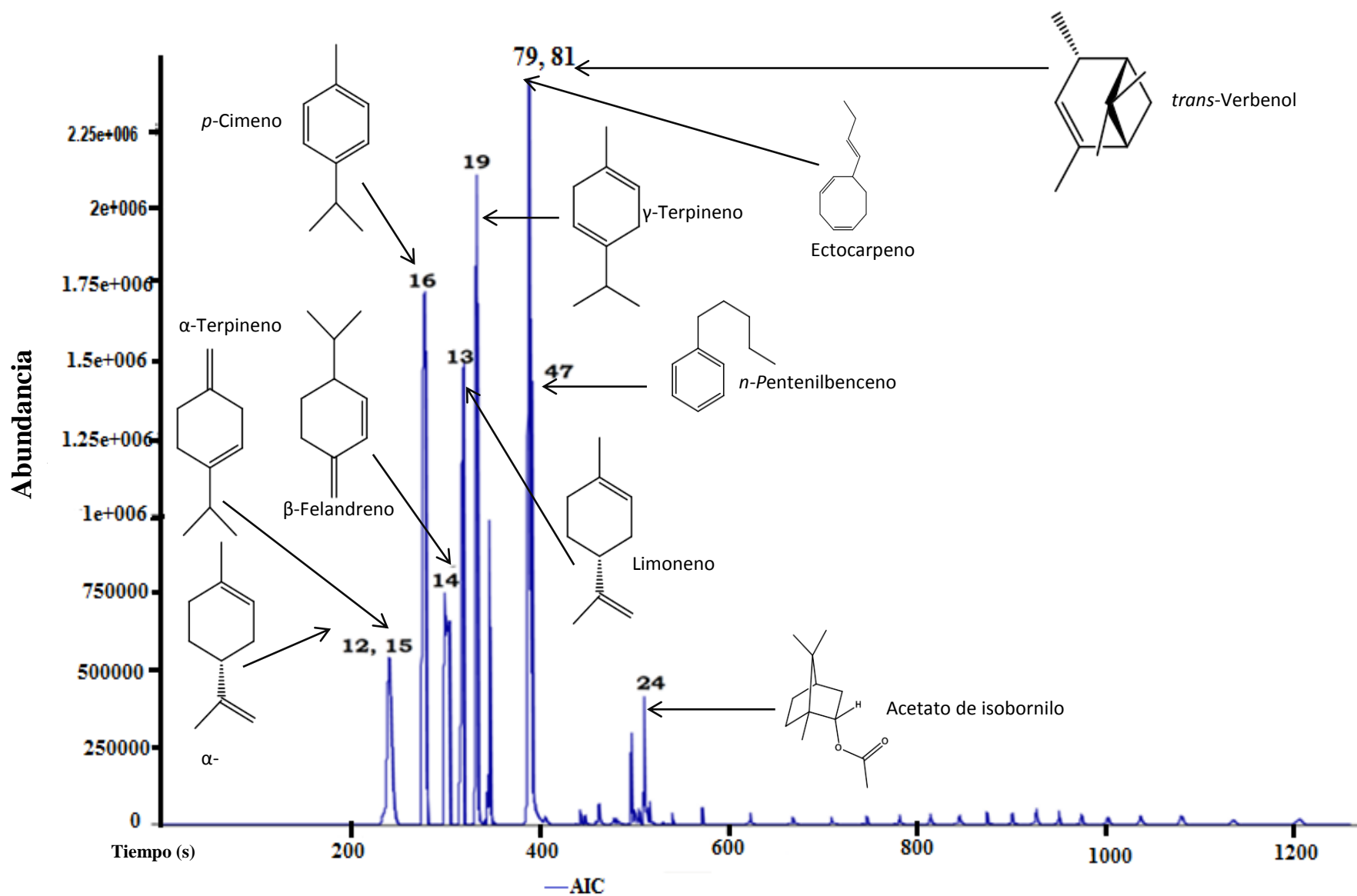


Figura 14. Cromatograma de los componentes volátiles de *Ligusticum porteri* obtenido por HS-MEFS utilizando la fibra PDMS.

5.2. Ensayos de seguridad preclínica

5.2.1. Estudios de toxicidad aguda de la infusión y el aceite esencial

Una de las características que se toman en cuenta al evaluar la inocuidad de una especie medicinal es la documentación de su uso durante un largo periodo; sin embargo, esto no garantiza la falta de efectos adversos a largo plazo. Por lo tanto la OMS recomienda evaluar la toxicidad de las plantas medicinales de amplio uso y para ello ha establecido algunos protocolos (IUPAC, 2008; WHO, 2002a).

La toxicidad aguda del extracto acuoso y aceite esencial preparados a partir de las raíces de *L. porteri* se evaluó mediante la metodología establecida por Lorke (1983). En este ensayo se utilizan pocos ratones y se realiza en un periodo de tiempo corto. Previamente en nuestro grupo de trabajo se determinó que la Dosis Letal media (DL₅₀) del extracto íntegro de las raíces preparado con una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH 1:1 es de 1085 mg/Kg (Déciga Campos *et al.*, 2007).

La prueba de Lorke se realizó en dos fases. La primera fase consistió en determinar el efecto de los diferentes extractos a las dosis de 10, 100, y 1000 mg/Kg, administrados por vía oral; los animales se observaron durante las dos primeras horas posteriores a la administración de los tratamientos y durante los siguientes 14 días con la finalidad de detectar cambios de su comportamiento o de peso. En esta primera fase no se registró efecto ni fallecimiento alguno, por lo que se prosiguió con la segunda fase; en ésta los ratones fueron tratados con dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/Kg de cada extracto sin que se observaran cambios de comportamiento ni de peso.

Cabe destacar que al cabo de cada fase experimental se realizó la necropsia de los animales para determinar la presencia de daños macroscópicos debidos a la

administración de los diversos tratamientos; estas inspecciones no revelaron ninguna anomalía en lo referente a tamaño, color o aspecto de los órganos.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba se puede establecer que el extracto acuoso (**Tabla 3**) y el aceite esencial (**Tabla 4**) presentan una DL₅₀ mayor a 5000 mg/Kg y que de acuerdo con los criterios establecidos por Lorke (1989) son inocuos para roedores. Además resulta obvio que los componentes responsables de la moderada toxicidad evidenciada por Déciga y colaboradores (2007) no se encuentran en el aceite esencial ni en la infusión. En consecuencia estos preparados son potencialmente más seguros para consumo humano que el extracto íntegro.

Tabla 3. Toxicidad aguda del extracto acuoso de *Ligusticum porteri*

Primera fase		Segunda fase	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3
DL ₅₀ mayor a 5000 mg/Kg			

Tabla 4. Toxicidad aguda del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación.

Primera fase		Segunda fase	
Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
10	0/3	1600	0/3
100	0/3	2900	0/3
1000	0/3	5000	0/3
DL ₅₀ mayor a 5000 mg/Kg			

5.3. Estudios de eficacia preclínica

Con la finalidad de completar los parámetros de eficacia preclínica de la especie *Ligusticum porteri* se realizaron determinaciones conducentes a determinar el potencial antinociceptivo y espasmolítico *in vivo* de algunos de sus extractos y compuestos puros, así como la posible acción antidiabética del aceite esencial y la infusión de la planta. Las dos primeras pruebas se seleccionaron con base en el uso de la planta para el tratamiento de cólicos y dolores gastrointestinales; en tanto que el potencial antidiabético de la infusión y de la esencia se realizó para completar los estudios de Brindis y colaboradores (2011) quienes demostraron los efectos del extracto íntegro de la raíz y de algunos componentes del mismo. Además, de acuerdo a los reportes etnobotánicos el preparado fitoterapéutico más utilizado es la infusión.

5.3.1. Pruebas para determinar el potencial antinociceptivo

5.3.1.1. Evaluación del potencial antinociceptivo de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y los compuestos Z-3-butilidenoftálica (3), Z-ligustílica (1) y diligustílica (6) obtenidos de la especie *Ligusticum porteri*

Para establecer el potencial antinociceptivo de los extractos y compuestos puros de la especie, se utilizaron las pruebas de estiramiento abdominal y placa caliente (Figuras 16-21). Ambas pruebas permiten detectar dolor agudo y son de fácil implementación para determinar la actividad analgésica potencial de productos naturales (Mogil *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2002). Además, estos modelos permiten obtener información útil para comprender la red de eventos involucrados en el proceso y reproducen situaciones

fisiopatológicas que permiten el estudio de alternativas terapéuticas. En el modelo de placa caliente el animal, generalmente roedores (rata o ratón), se coloca dentro de un cilindro de plástico que está sobre una placa caliente a temperatura constante, (55 ± 5 °C) (**Figura 15 b**). Este estímulo produce dos conductas (saltar o lamer sus patas traseras) que pueden medirse en términos de tiempo de reacción. Este modelo es comúnmente usado para identificar analgésicos que actúan a nivel del SNC (Eddy y Leimbach, 1953).

En el segundo modelo, los roedores responden al dolor que se genera en respuesta a un estímulo químico (**Figura 15 a**). El método consiste en inyectar intraperitonealmente a los roedores una solución alagénica (i.e. sol. diluida de ácido acético) y medir, en un periodo de tiempo, el número de estiramientos-contracciones provocados por el estímulo químico. El modelo permite detectar compuestos con actividad analgésica periférica; cabe señalar que este modelo ha sido objeto de críticas debido a que el estímulo químico no se considera natural (Koster *et al.*, 1959).

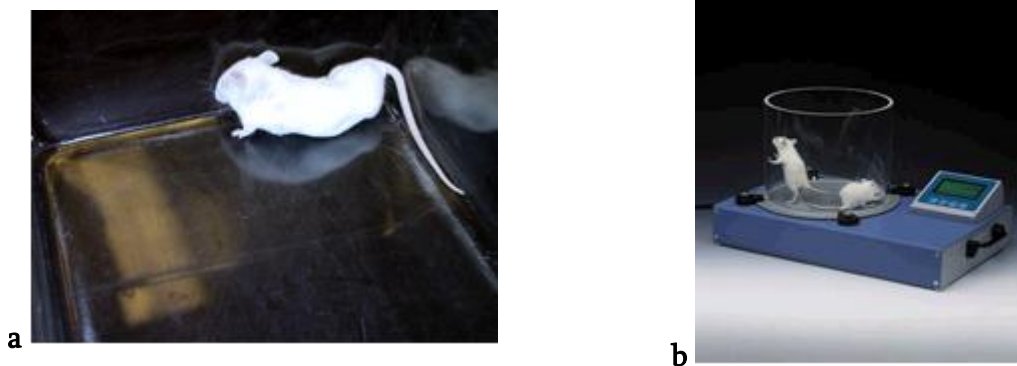


Figura15. Modelos a) del estiramiento abdominal y b) la placa caliente.

La infusión se evaluó a las dosis 31.6, 100 y 316 mg/Kg (*p.o.*) en ambos modelos. Como se desprende de los datos de la **Figura 16** se puede observar que únicamente la dosis de 316 mg/Kg provocó un efecto antinociceptivo significativo ($p < 0.05$) en la prueba de placa caliente, esta dosis aumentó en un 46.15% el tiempo de latencia con respecto al control. En el ensayo de estiramiento abdominal el tratamiento de 31.6

mg/Kg fue el único que indujo una disminución del número de estiramientos en un 32.72% con respecto a la SSI.

Para el ensayo con el aceite esencial se utilizaron dosis de 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg (*p.o.*). En la **Figura 17** se presentan los resultados de la prueba de placa caliente; en todos los casos el período de latencia al estímulo térmico con respecto al control incrementó entre 55.37 y 86.79%. Sin embargo, este efecto no fue estadísticamente diferente entre las tres dosis ensayadas. Por lo tanto es necesario evaluar este preparado a dosis más bajas a fin de determinar si el efecto es dependiente de la dosis.

En la prueba de estiramiento abdominal, el aceite esencial, a la dosis de 100 mg/Kg, ocasionó una disminución de la cantidad de estiramientos en un 45.43% con respecto al grupo de SSI. El efecto fue claramente no dependiente de la dosis posiblemente debido a un fenómeno de hormesis, entre otras causas (Calabrese, 2008b; a).

Con fines comparativos, el extracto íntegro (**Figura 18**) fue evaluado a las dosis de 75, 150 y 300 mg/Kg (*p.o.*). Se puede observar (**Figura 18**) que las tres dosis aumentan significativamente ($p < 0.05$) el período de latencia al estímulo térmico con respecto al control.

En la prueba de estiramiento abdominal se evaluaron las dosis de 75, 150, 250 y 300 mg/Kg. El efecto provocado por el tratamiento con la dosis de 300 mg/Kg fue similar al de la dipirona, y disminuyó la cantidad de estiramientos en un 94.55% con respecto al grupo de SSI; el efecto en este caso fue dependiente de la dosis.

Posteriormente se ensayaron los compuestos mayoritarios de la planta (Rivero *et al.*, 2011) y para ello fue necesario obtenerlos en forma pura como se describe en la sección experimental. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

En el caso del compuesto *Z*-ligustílida (1) (10, 31.6 y 56.2 mg/Kg), en la prueba de estiramiento abdominal ninguna de las dosis provocó efecto alguno. Estos resultados

contrastan con los obtenidos por (Du *et al.*, 2007) quienes reportan un efecto significativo de la ftálica en esta prueba. Sin embargo, en el modelo de la placa caliente, el compuesto (31.6 mg/Kg) incrementó el periodo de latencia al estímulo hasta un 50.57%, respecto al grupo control (**Figura 19**)

El compuesto *Z*-3-butilidenftálica (**3**) se administró a los roedores a las dosis de 10, 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg, *p.o.* en el ensayo de placa caliente; y a las dosis de 10, 31.6 y 56.2 mg/Kg, *p.o.* en el de estiramiento abdominal. En el primer ensayo el efecto del producto fue dependiente de la dosis obteniéndose un aumento en los periodos de latencia de 26.88, 27.90, 38.37 y 42.20%, respectivamente en relación al control (**Figura 20**). Por otra parte en la prueba de estiramiento abdominal el producto **3** a las dosis de 10 y 31.6 mg/Kg, provocó una reducción en el número de estiramientos de 24.79 y 27.38% respectivamente en relación al blanco.

La diligustílida (**6**) se ensayó a las dosis de 10, 31.6 y 56.2 mg/Kg, *p.o.* en la prueba de placa caliente y de 10, 31.6, 56.2 y 100 mg/Kg, *p.o.* en la de estiramiento abdominal. El compuesto no presentó actividad en el primero; mientras que en el ensayo de estiramiento abdominal los cuatro tratamientos indujeron un efecto antinociceptivo significativo ($p < 0.05$) no dependiente de la dosis. Los porcentajes de disminución del número de estiramientos con respecto al control fueron de 47.36, 28.80, 62.57 y 37.28% (**Figura 21**).

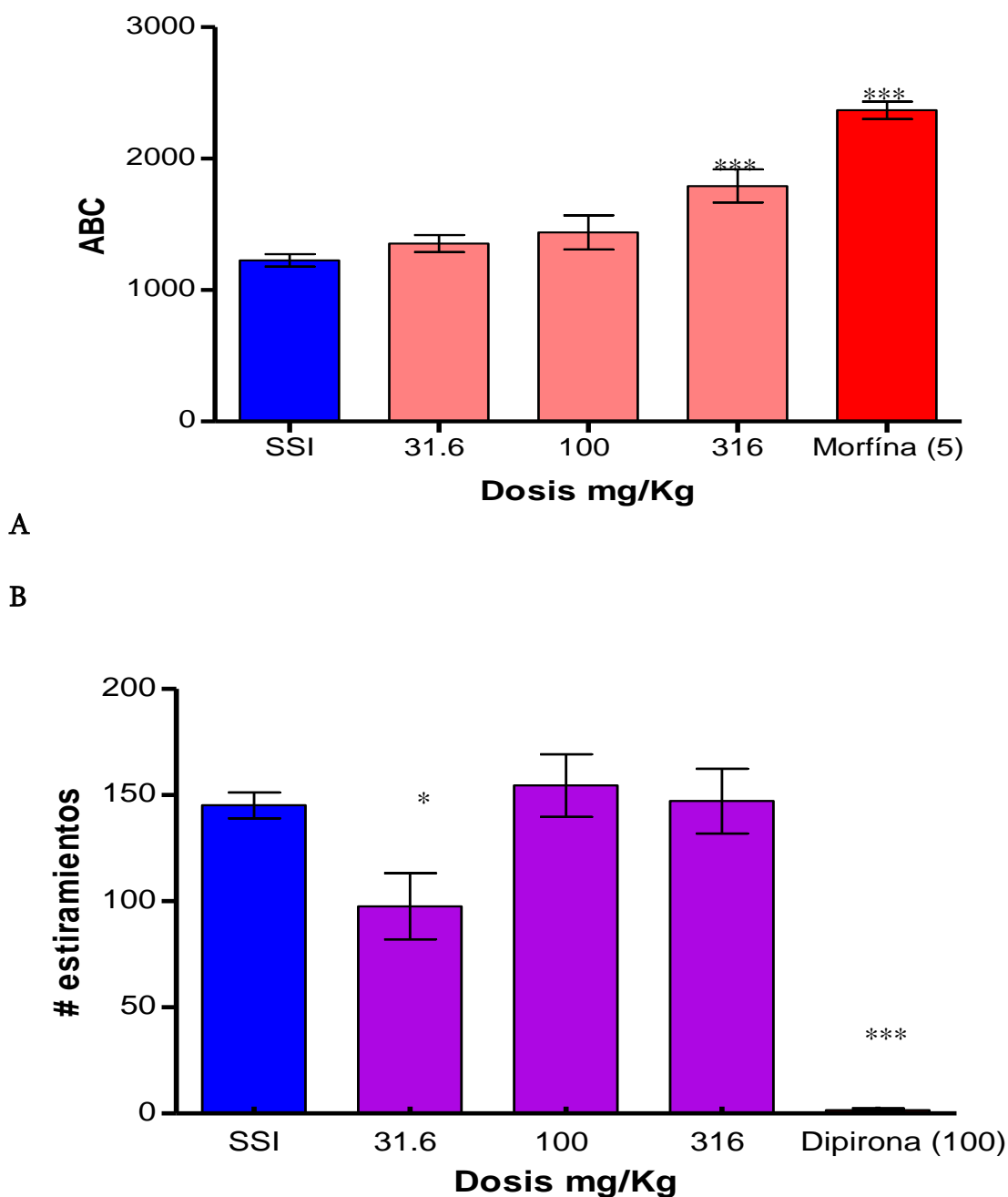
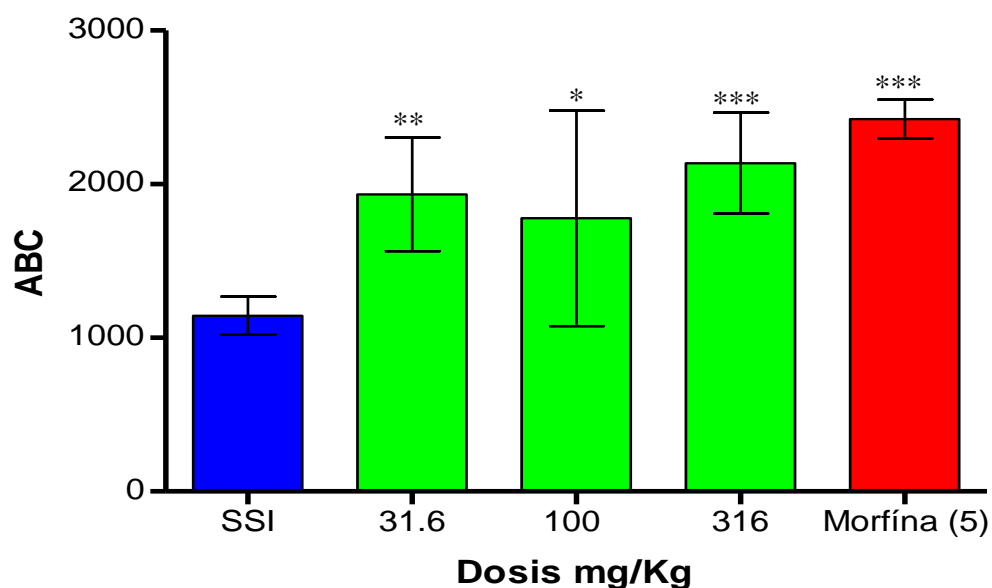
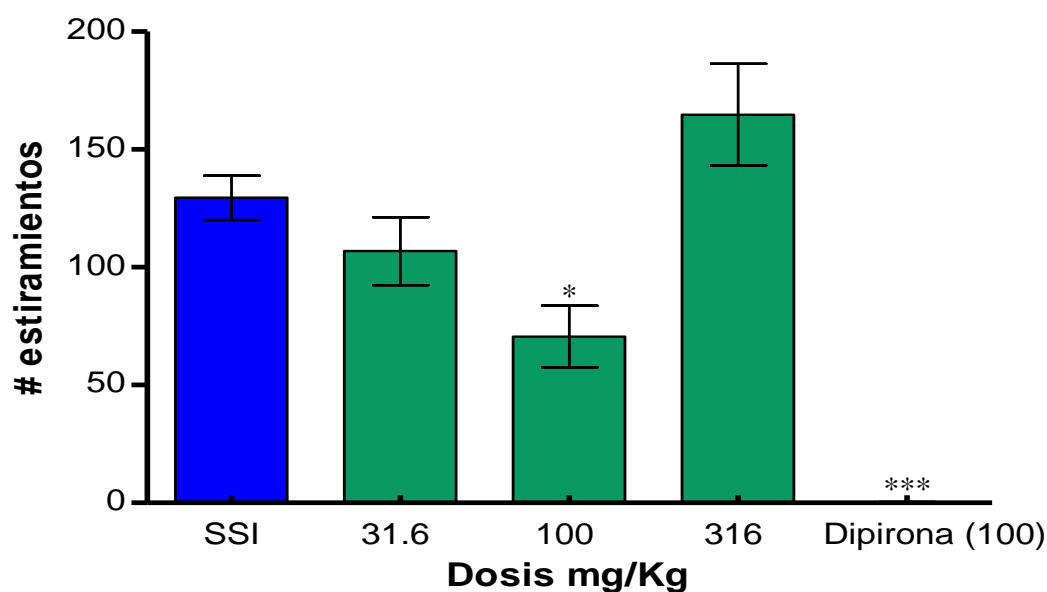


Figura 16. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *Ligusticum porteri* en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos presentados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.



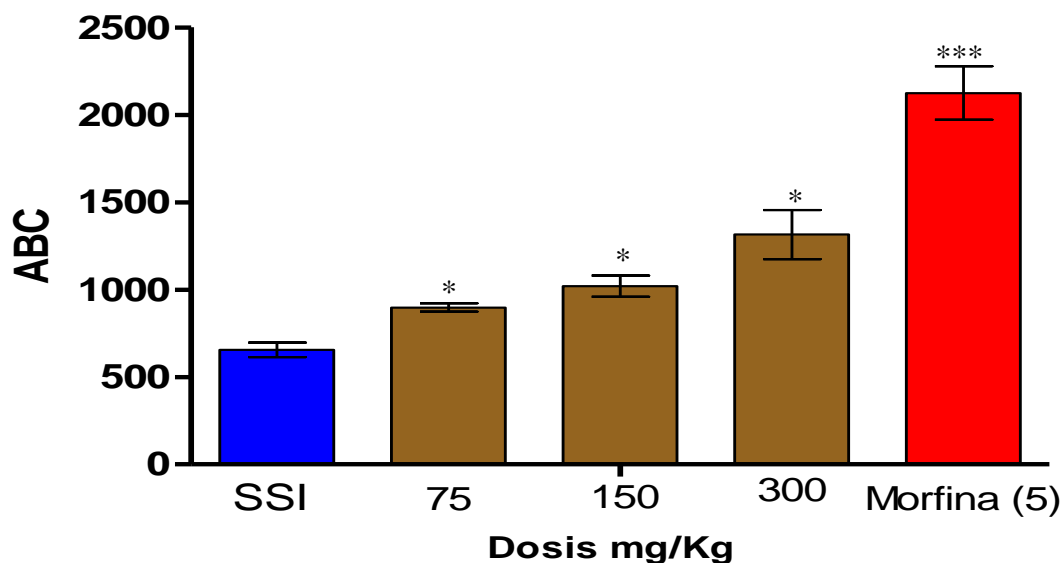
A



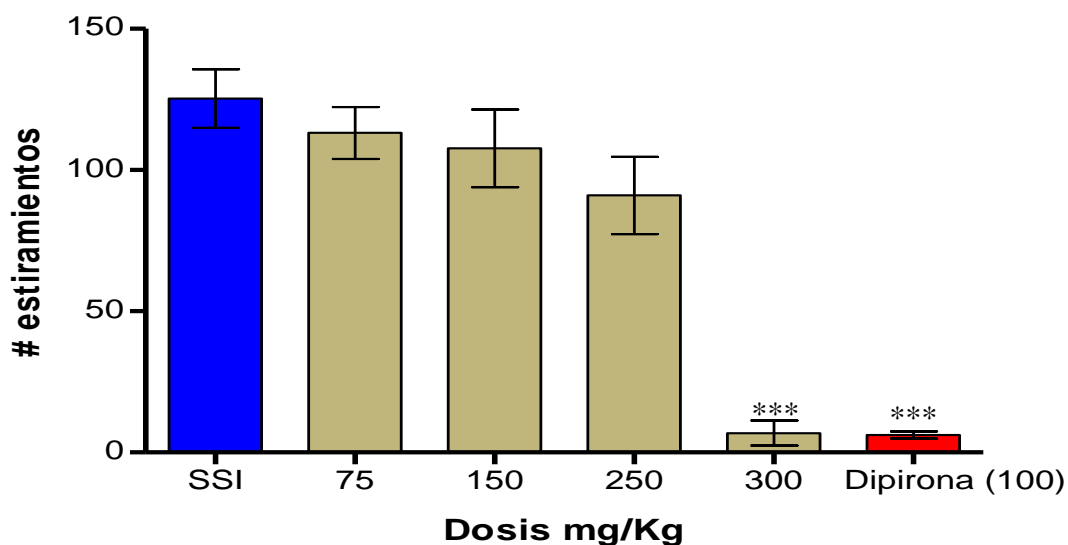
B

Figura 17. Efecto antinociceptivo del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos observados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.



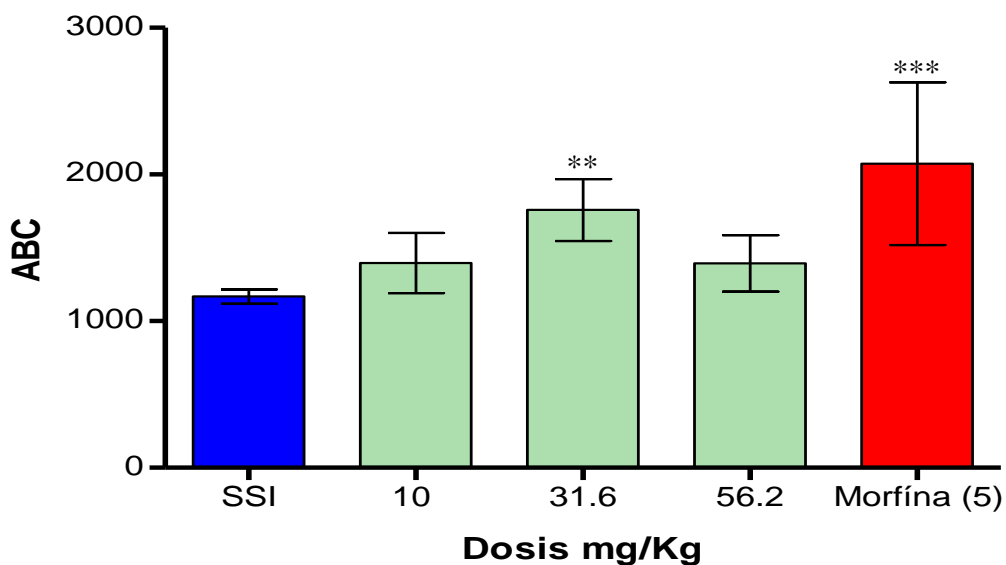
A



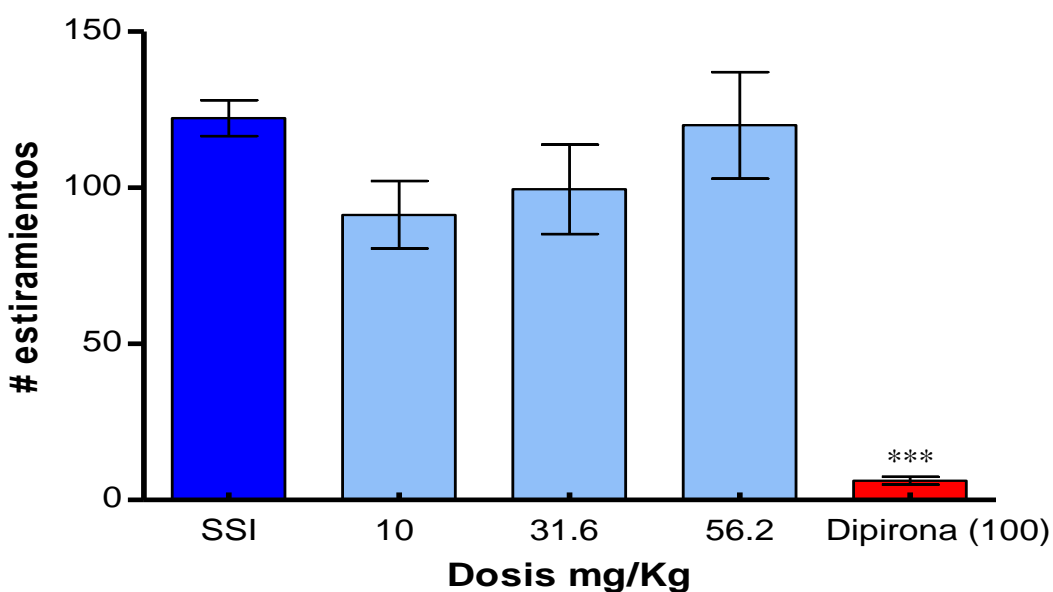
B

Figura 18. Efecto antinociceptivo del extracto íntegro de *Ligusticum porteri* obtenido por maceración CH₂Cl₂:MeOH (1:1) en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos observados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de n=6 ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de *t*-Dunnett. * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.



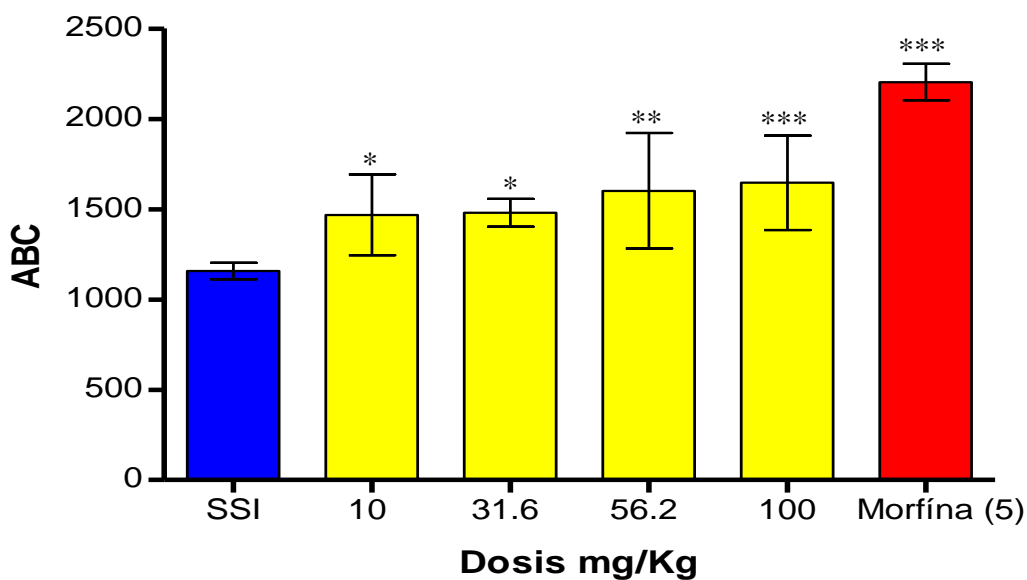
A



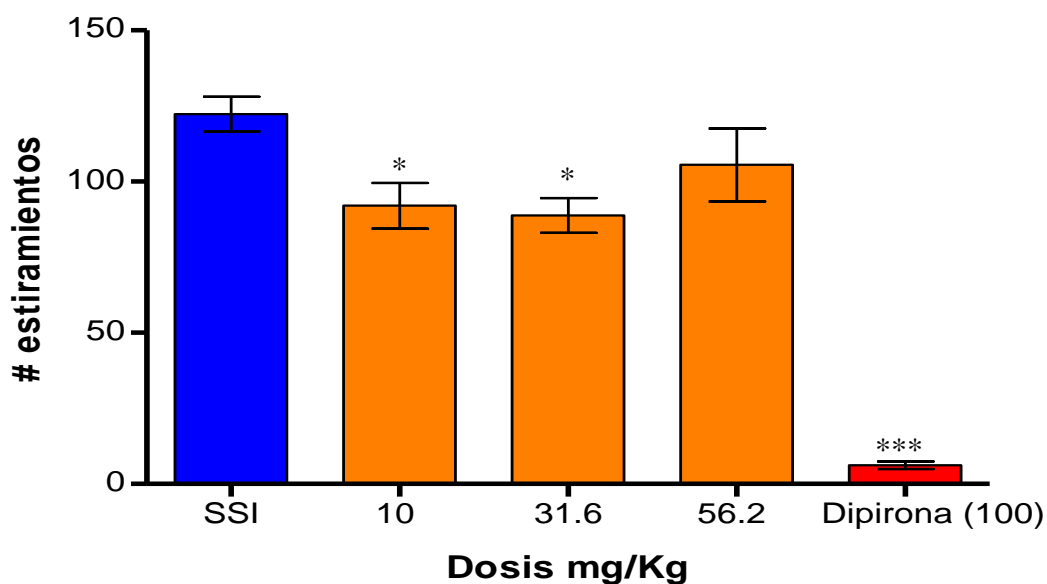
B

Figura 19. Efecto antinociceptivo del compuesto *Z*-ligustilida (**1**) en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos presentados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de *t*-Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.



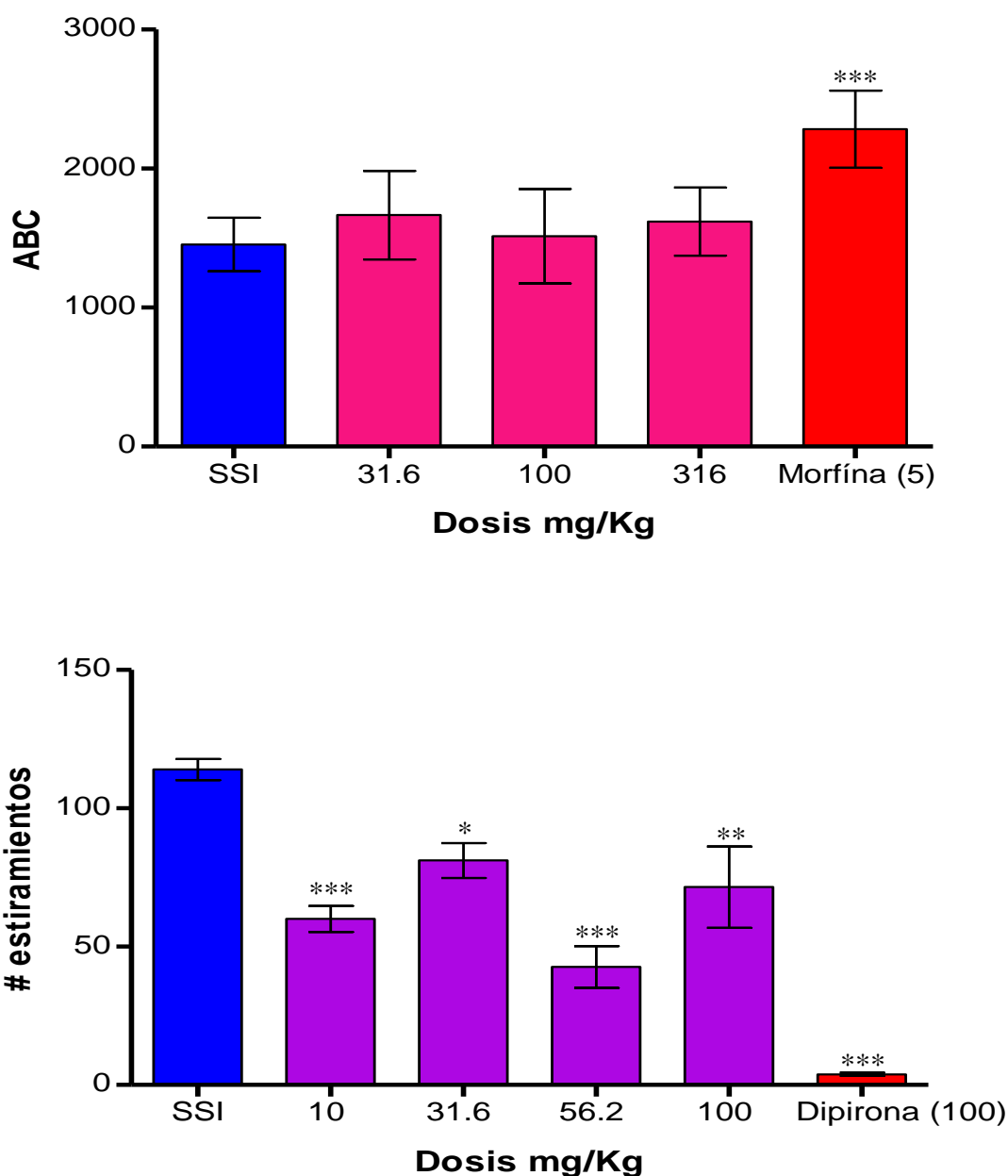
A



B

Figura 20. Efecto antinociceptivo del compuesto *Z*-3-butilidenftálida (**3**) en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos presentados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de *t*-Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.



B

Figura 21. Efecto antinociceptivo del compuesto diligustílida (**6**) en ratones. La gráfica A representa la latencia al estímulo térmico en el modelo de la placa caliente y la B el número de estiramientos presentados.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de *t*-Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Del conjunto de resultados presentados, es evidente que la planta tiene un efecto analgésico potencial de utilidad para controlar tanto el dolor visceral inflamatorio periférico como el de origen central. Las diferencias en la actividad de los distintos preparados en los dos modelos de dolor puede ser atribuido a la diferencia en la composición química de los mismos. En el caso del aceite esencial, que presenta un alto contenido de *Z*-ligustílida (**1**) y de *Z*-3-butilidenftálida (**3**), se puede concluir que estos compuestos son los principios activos responsables del efecto antinociceptivo a nivel central. Por otro lado, en la infusión las ftálicas **1** y **3** se encuentran en baja proporción. Aunque los productos presentes en la infusión no están caracterizados se anexa el perfil cromatográfico para evidenciar que sus productos mayoritarios no son las ftálicas (**Figura 22**). Por lo tanto será necesario determinar la composición química de la infusión.

Este estudio constituye el primer reporte de los efectos antinociceptivos de la *Z*-3-butilidenftálida (**3**) y de la diligustílida (**6**). Este hallazgo en conjunto con el descrito previamente por Du (2007) indican el potencial de estos productos como agentes analgésicos mismo que puede ser de utilidad para el desarrollo de nuevos fármacos.

5.3.1.2. Potencial espasmolítico de la infusión, el aceite esencial, el extracto íntegro y el compuesto diligustílida (6) obtenidos de la especie *Ligusticum porteri* en la prueba de tránsito intestinal

En el ensayo con la infusión y el aceite esencial las dosis utilizadas fueron de 31.6, 100 y 360 mg/Kg; para el extracto íntegro se utilizaron las dosis de 75, 150 y 300 mg/Kg; en el ensayo con la diligustílida (**6**) las dosis administradas fueron de 10, 31.6 y 100 mg/Kg, *p.o.*; como control positivo se utilizó el fármaco Loperamida (8mg/Kg). En las **Figuras 23-26** se presentan los resultados obtenidos.

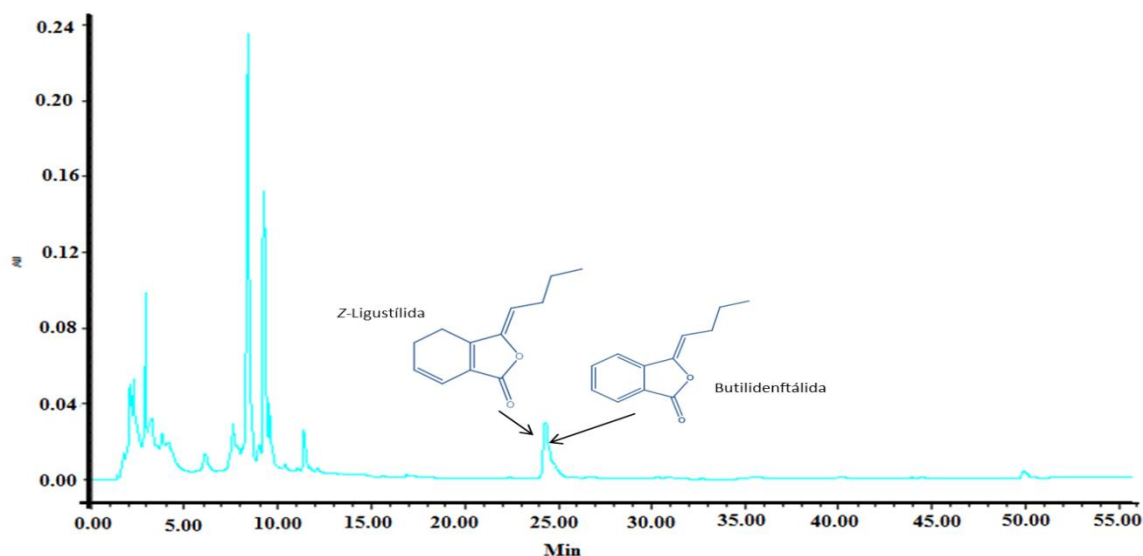


Figura 22. Cromatograma de la infusión de *L. porteri* por CLAE. Fase móvil: gradiente ACN-H₂O (0.5% AcOH) (2:8-1:0), velocidad de flujo: 1.0 mL/min. Fase estacionaria: columna Hibar® LiChrospher® 100 RP-18. λ 280 nm

La infusión no presentó efecto alguno a las dosis evaluadas; el aceite esencial redujo el avance del carbón activado en un 24.5% a la dosis de 316 mg/Kg; el extracto íntegro produjo un efecto de inhibición del avance del carbón activado con las tres dosis evaluadas en un 17.84, 13.59 y 23.62%, respetivamente, por último, el compuesto **6** ocasionó una disminución en el avance del carbón activado de un 21.30 y 20.79% con respecto al vehículo a las dosis de 10 y 31.6 mg/Kg. Estos resultados indican que la especie posee efecto espasmolítico moderado y que aunado al efecto antinociceptivo demostrado en este estudio, sustentan a nivel preclínico el uso de la planta en las prácticas médicas populares para el tratamiento de cólicos estomacales.

Cabe señalar que (Du *et al.*, 2006) reportaron que el compuesto *Z*-ligustilida disminuye las contracciones uterinas espontáneas e inducidas por la prostaglandina PGF-2 α , acetilcolina, KCl y oxcitocina *in vitro* y concluyen que este efecto podría estar relacionado con la eficacia de la especie relacionada *Angelica sinensis* (Apiaceae) para el tratamiento de los cólicos menstruales. Ese resultado aunado a los del presente estudio evidencia el potencial espasmolítico de las ftálidas. Cabe mencionar que en el presente

estudio se ensayó únicamente la diligustílida (6) porque fue el único constituyente disponible en cantidad suficiente para el estudio.

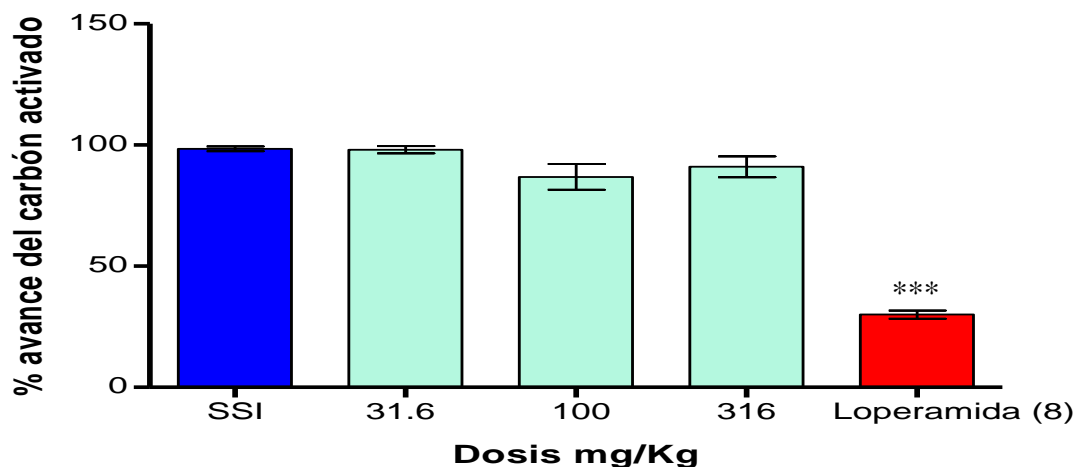


Figura 23. Efecto espasmolítico del extracto acuoso de *Ligusticum porteri* en ratones.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

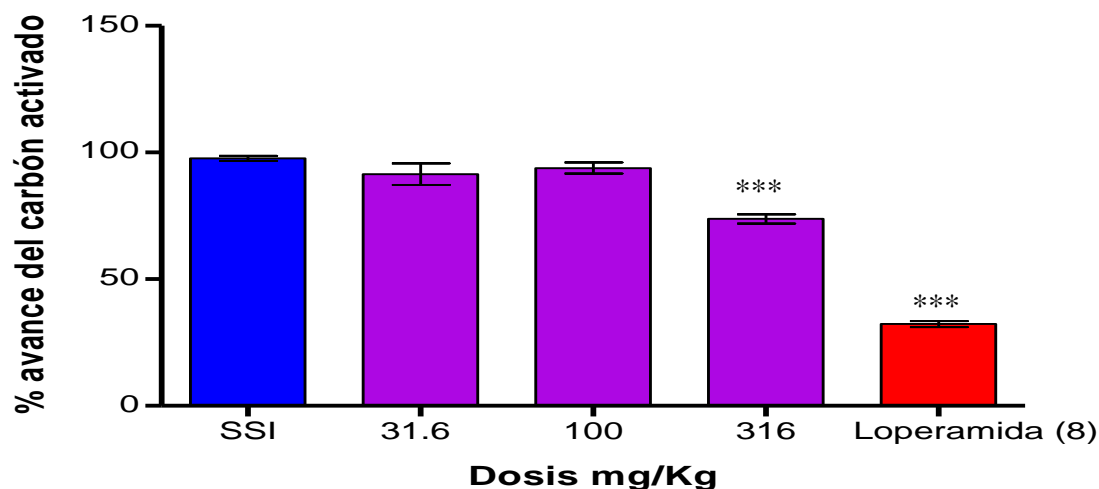


Figura 24. Efecto espasmolítico del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de

una prueba de *t*-Dunnett * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

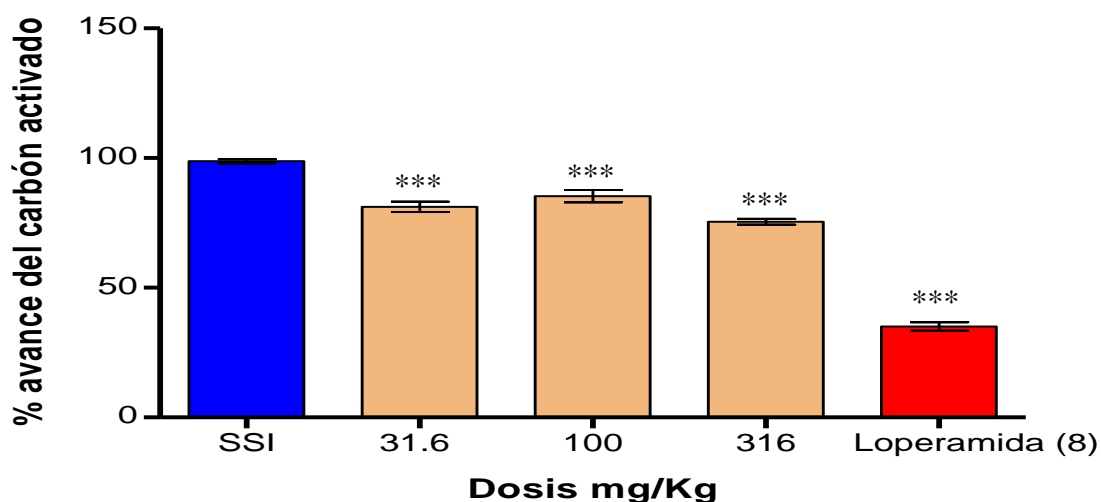


Figura 25. Efecto espasmolítico del extracto íntegro de *Ligusticum porteri* obtenido por maceración $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) en ratones.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVVA seguida de una prueba de *t*-Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

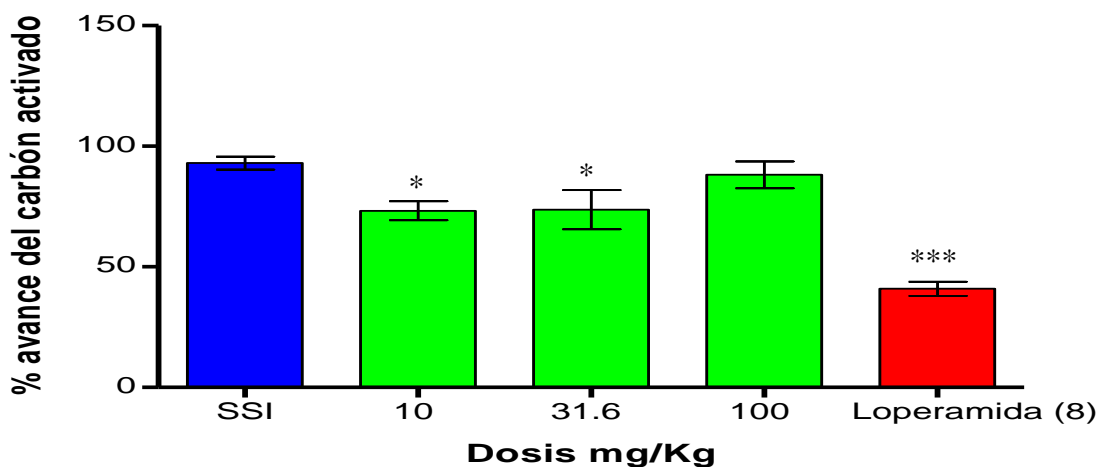


Figura 26. Efecto espasmolítico del compuesto diligustílida (6) en ratones.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVVA seguida de

una prueba de *t*-Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

5.3.2. Evaluación del potencial antidiabético del aceite esencial y la infusión de *L. porteri*

En la investigación bibliográfica de la especie se encontró que (Olivas, 1999) reporta el uso de *L. porteri* para el tratamiento de diabetes; posteriormente, en el artículo “Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes” (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005) reportan de nueva cuenta, el uso de la planta para el tratamiento de la diabetes. Con base en estos dos reportes se inició la investigación del potencial antidiabético de la planta. Los resultados iniciales permitieron comprobar que un extracto íntegro (CH₂-Cl₂-MeOH 1:1) de la especie posee propiedades antihiperoglucémicas. El estudio fitoquímico de la planta permitió aislar y purificar cinco compuestos: miristicina, diligustílida (6), *Z*-ligustílida (1), *Z*-3-butilideneftálida (3) y el ácido ferúlico. Los productos mayoritarios diligustílida (6), *Z*-ligustílida (1) y *Z*-3-butilideneftálida (3) fueron evaluados en ensayos de tipo agudo y de tolerancia a la glucosa y sacarosa en ratones. Los resultados de estos experimentos permitieron descubrir los efectos antihiperoglucémicos e hipoglucemiantes de la *Z*-3-butilideneftálida (3), así como los hipoglucemiantes de los dos primeros. Por otra parte, los cinco productos fueron evaluados en un experimento enzimático *in vitro* contra la enzima alfa glucosidasa resultando inactivos la miristicina, y el ácido ferúlico. La *Z*-ligustílida (1) fue inactiva, en tanto que la *Z*-3-butilideneftálida fue activa (CI₅₀= 0.4 mg/ml); de acuerdo con experimentos de cinética este último compuesto se comporta como un inhibidor no competitivo de la enzima. Además, el análisis de acoplamiento molecular permite predecir que el sitio de unión de la *Z*-3-butilideneftálida (3) es en un lugar diferente al de la acarbosa, resultado que es congruente con la inhibición de tipo no competitivo (Brindis *et al.*, 2011).

Sin embargo, en el estudio de Brindis *et al.*, 2011 no se estableció el efecto del aceite ni de la infusión, que son los preparados de la planta que se consumen

popularmente. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la evaluación del aceite esencial utilizando los modelos de tipo agudo, así como de tolerancia a la glucosa (OGTT) y sacarosa (OSTT) (Cristians *et al.*, 2009; Brindis *et al.*, 2011).

5.3.2.1. Evaluación del efecto hipoglucemiante agudo del aceite esencial

En esta prueba los ratones se diabetizaron administrando estreptozotocina (STZ, 100 mg/Kg) previo tratamiento con NAD (30 mg/Kg) con el objetivo de obtener un modelo de diabetes no insulino dependiente (Brindis *et al.*, 2010); como control positivo se utilizó el fármaco glibenclamida. Los valores de glucemia en sangre con respecto al tiempo se expresan como porcentaje de variación de glucemia.

En ningún caso (**Figura 27**) el aceite esencial presentó efecto hipoglucemiante en ratones sanos. En el ensayo con ratones diabéticos, a la dosis de 56.2 mg/Kg el aceite produjo una importante acción hipoglucemiante, que alcanzó el máximo efecto a la hora 5, en este tiempo la reducción del porcentaje de glucosa en sangre fue de -40.77%, este comportamiento se conservó a lo largo del experimento observándose los porcentajes de disminución de glucosa en sangre de -39.11 y -33.79% a las siete y nueve horas, respectivamente. En la **Figura 28** se presentan los resultados obtenidos. El control positivo, que en este caso fue la glibenclamida provocó su máximo efecto a las cinco horas bajando los porcentajes de glucosa en un -38.96%, este efecto se conservó hasta el final del experimento.

En los resultados obtenidos con la dosis de 56.2 mg/Kg a diferencia de los obtenidos por Brindis y colaboradores (2010) la actividad solo se observó con los ratones diabéticos y no con los sanos.

Debido a que se observó actividad hipoglucemiante en el experimento agudo se procedió a realizar pruebas de tolerancia a la glucosa y sacarosa con la finalidad de evaluar el efecto antihiper glucémico del aceite esencial.

5.3.2.2. Pruebas de tolerancia a la glucosa oral del aceite esencial

Los resultados de esta prueba indican que en ratones normoglucémicos el aceite esencial de la especie presenta un buen efecto antihiper glucémico, pues se observa una disminución significativa ($p < 0.05$) del pico posprandial con las dosis 56.2 y 100 mg/Kg, *p.o.*; los niveles de glucosa en sangre se redujeron a 14.87 y 10.48% respecto al control cuyo porcentaje de glucosa en sangre fue de 34.94, lo anterior indica que el efecto es dosis dependiente (**Figura 29**).

La **Figura 30** muestra los resultados obtenidos en ratones diabéticos tratados con el aceite esencial y se puede observar que también existe un efecto significativo ($p < 0.05$) en el abatimiento del pico posprandial con las dosis de 56.2 y 100 mg/Kg; estos tratamientos bajaron los niveles de glucosa a 45.56 y 50.1% respectivamente, el valor obtenido para el control fue de 124.38%. Sin embargo en este caso el efecto ya no fue dependiente de la dosis. El efecto obtenido en este ensayo podría ser debido a la inhibición de los mecanismos de absorción de glucosa en el intestino por el aceite esencial.

5.3.2.3. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral del aceite esencial

Los resultados de las pruebas de tolerancia a la sacarosa indican que en ratones normoglucémicos el aceite esencial de *L. porteri* presenta un buen efecto antihiper glucémico, con las dos dosis más altas. En la **Figura 31** se puede observar que la dosis de 56.2 mg/Kg disminuyó el pico posprandial de 24.71 en el control a 13.17%

mientras que la dosis de 100 mg/Kg lo redujo a 13.09% el efecto observado fue dependiente de la dosis.

En ratones diabéticos, el aceite esencial presentó un efecto antihiper glucémico a las tres dosis evaluadas (**Figura 32**); la concentración de glucosa en sangre disminuyó en un 45.21, 51.81 y 50.99%, respectivamente; mientras que el valor para el control fue de 87.58%, lo que indica que hay diferencia significativa ($p < 0.05$). En este caso el efecto puede ser debido a la inhibición de las enzimas α -glucosidasas por el compuesto *Z*-3-butilidenoftálica (3), el cual fue reportado como inhibidor de estas enzimas por (Brindis *et al.*, 2011).

5.3.2.4. Pruebas de tolerancia a la sacarosa oral de la infusión

En los ensayos para determinar el potencial antihiper glucémico de la infusión se puede observar que en ratones normoglu cémicos la dosis de 31.6 mg/Kg presenta un buen efecto antihiper glucémico, al disminuir el pico posprandial a un valor de 0.84% de glucosa en sangre este valor indica que el efecto de la infusión es mucho mejor que el presentado por la acarbosa de 8.3% **Figura 33**.

En ratones diabéticos **Figura 34**, la infusión mostró un muy buen efecto antihiper glucémico con la dosis de 31.6 mg/Kg, al disminuir la concentración de glucosa en sangre a 22.99%, este efecto fue levemente mejor que el presentado por el control positivo que redujo los porcentajes de glucosa en sangre a un valor de 23.3%, se puede observar también que el efecto es mejor a menor dosis, lo que indica un fenómeno de hormesis. En este caso el efecto puede ser debido a la la inhibición de las enzimas α -glucosidasas, mismas que se encargan de la degradación de los polisacáridos a monosacáridos para favorecer la absorción de la glucosa en el intestino. (Krasikov *et al.*, 2001)

Los resultados del potencial hipoglucemiante y antihiperglucémico son congruentes con los resultados presentados por Brindis *et al.* (2011).

En conjunto los resultados obtenidos en las pruebas de eficacia desarrolladas en este trabajo para los diferentes extractos y compuestos puros de *Ligusticum porteri* evaluados indican que en efecto, posee propiedades antinociceptivas, espasmolíticas y antidiabéticas, lo que sustenta el uso tradicional de la especie para diversas afecciones como dolores musculares, estomacales y para el tratamiento de diabetes.

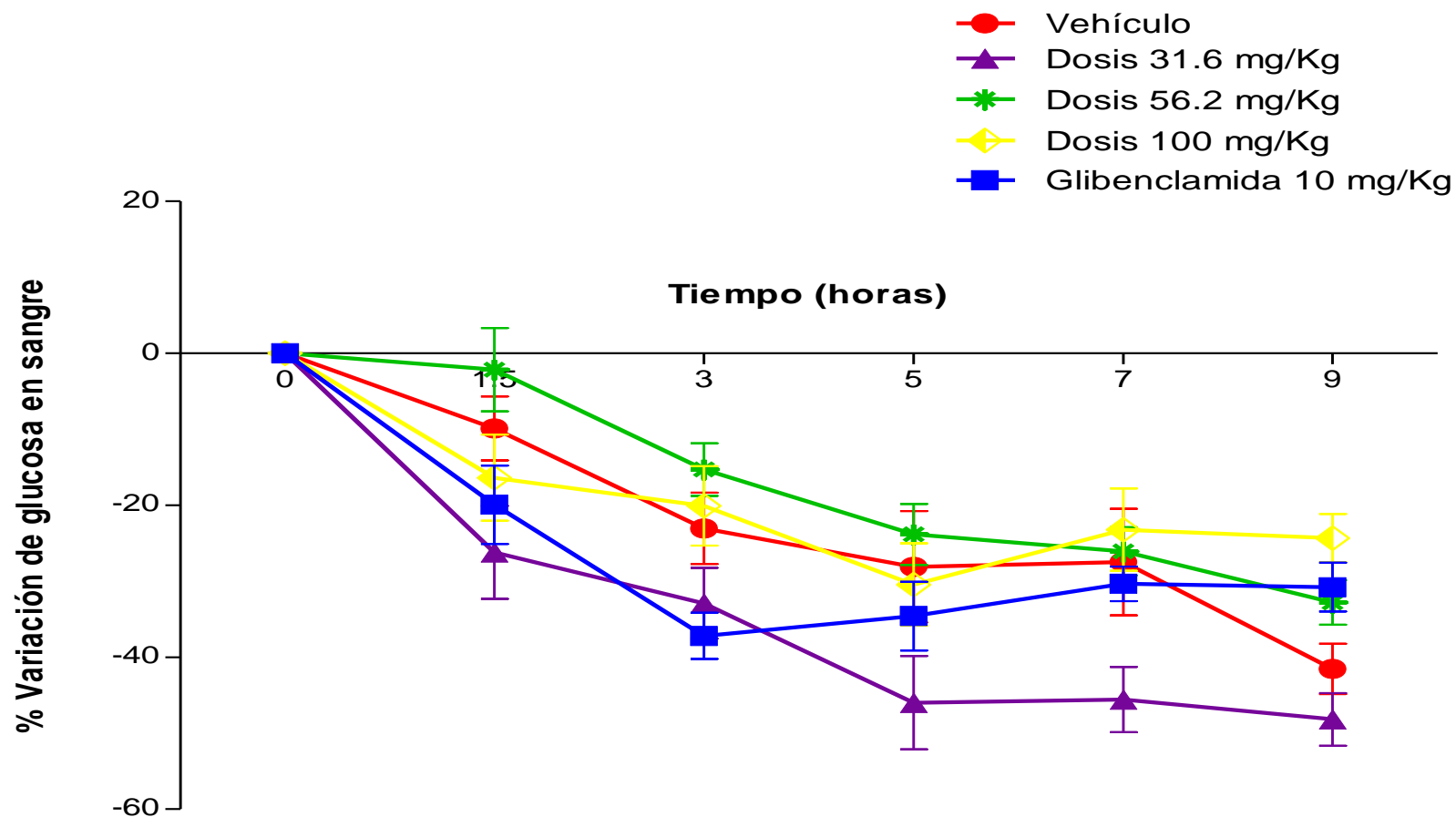


Figura 27. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

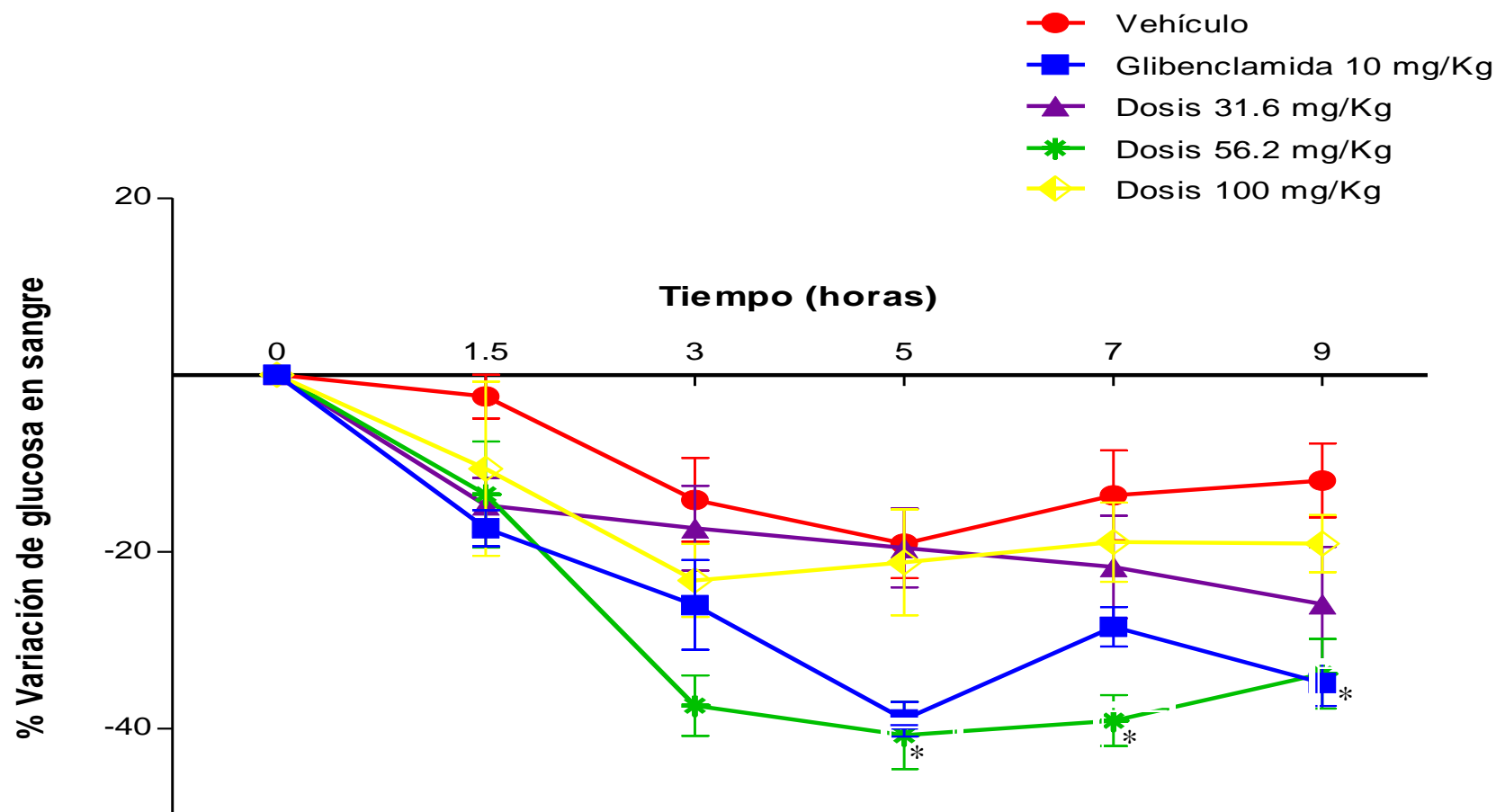


Figura 28. Efecto hipoglucemiante del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones diabéticos. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

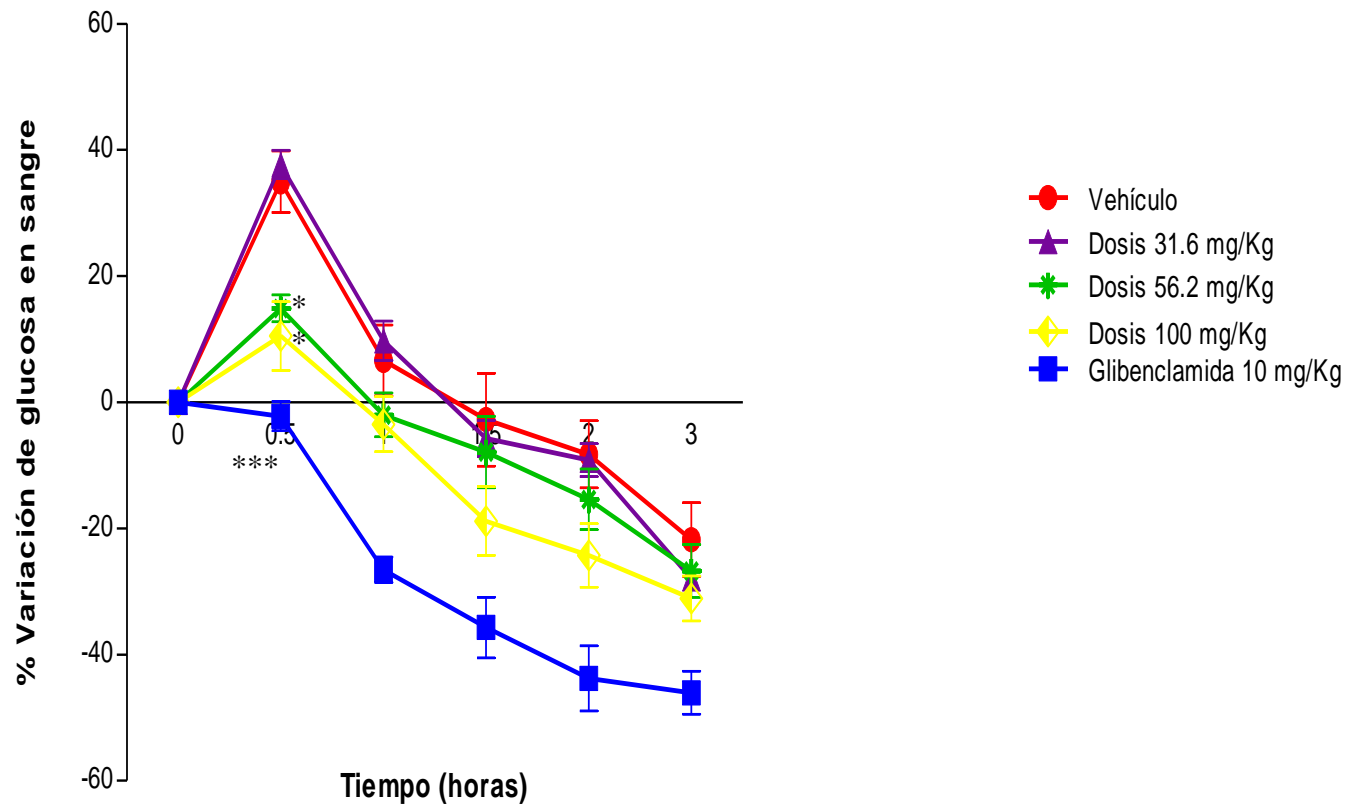


Figura 29. Curva de tolerancia a la glucosa (OGTT) luego de la administración del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

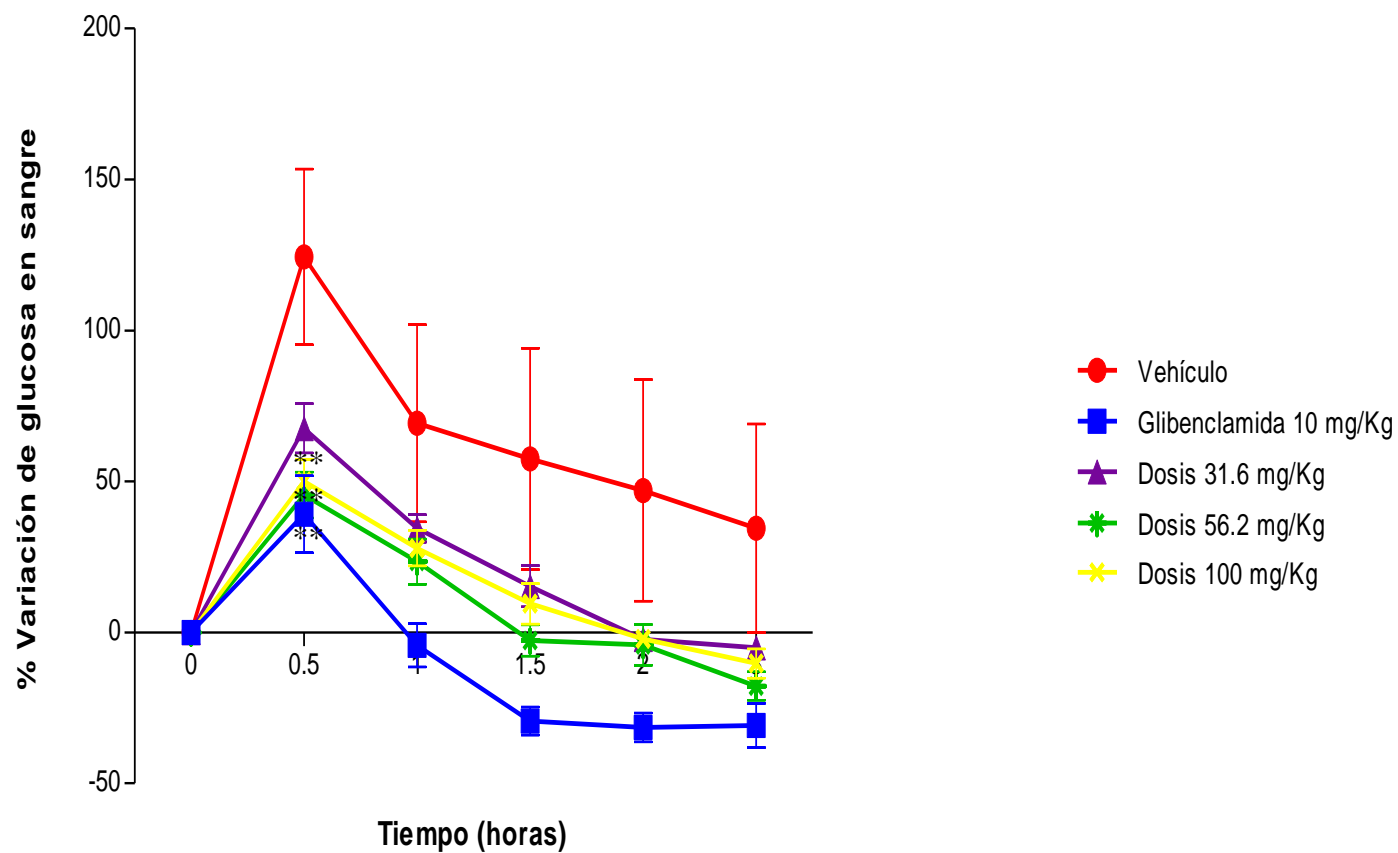


Figura 30. Curva de tolerancia a la glucosa (OGTT) luego de la administración del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones diabéticos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

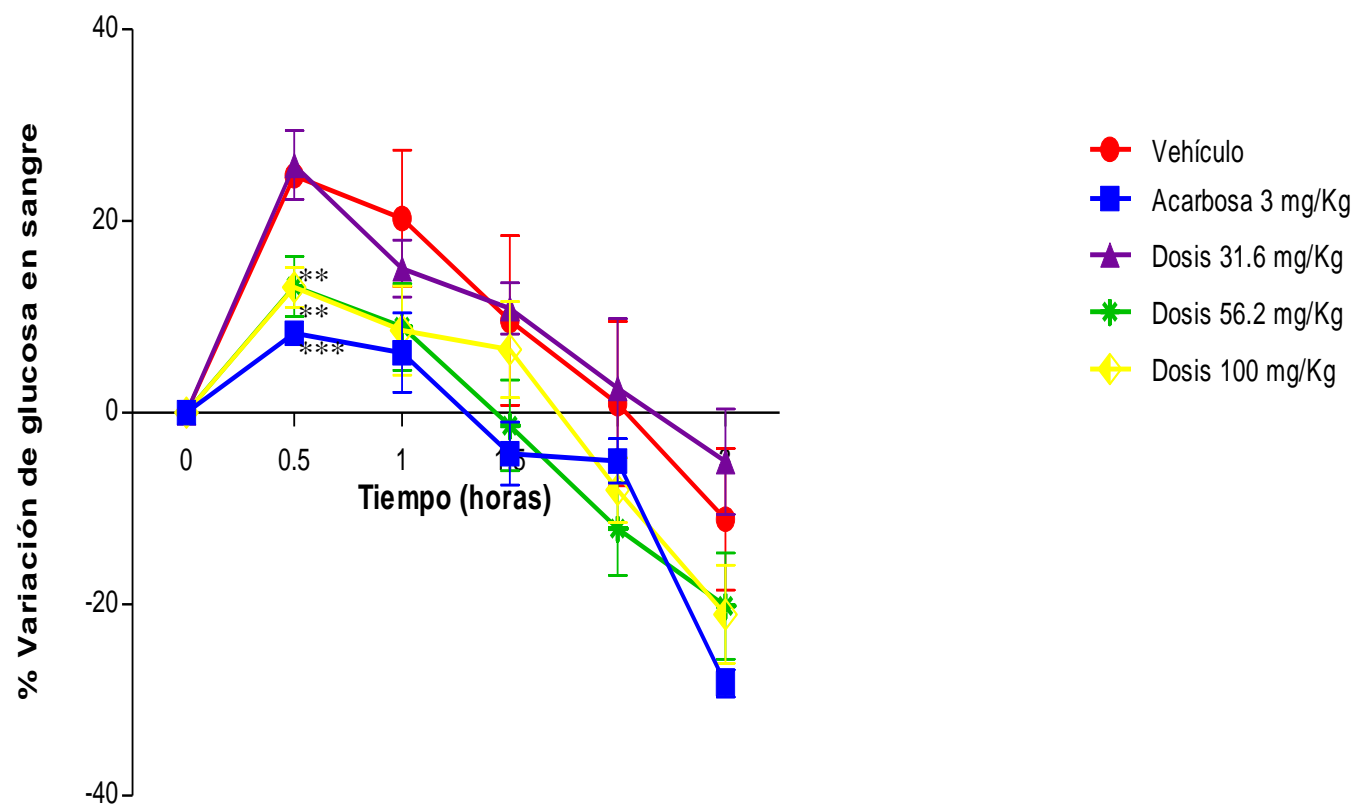


Figura 31. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones normoglucémicos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVIA seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

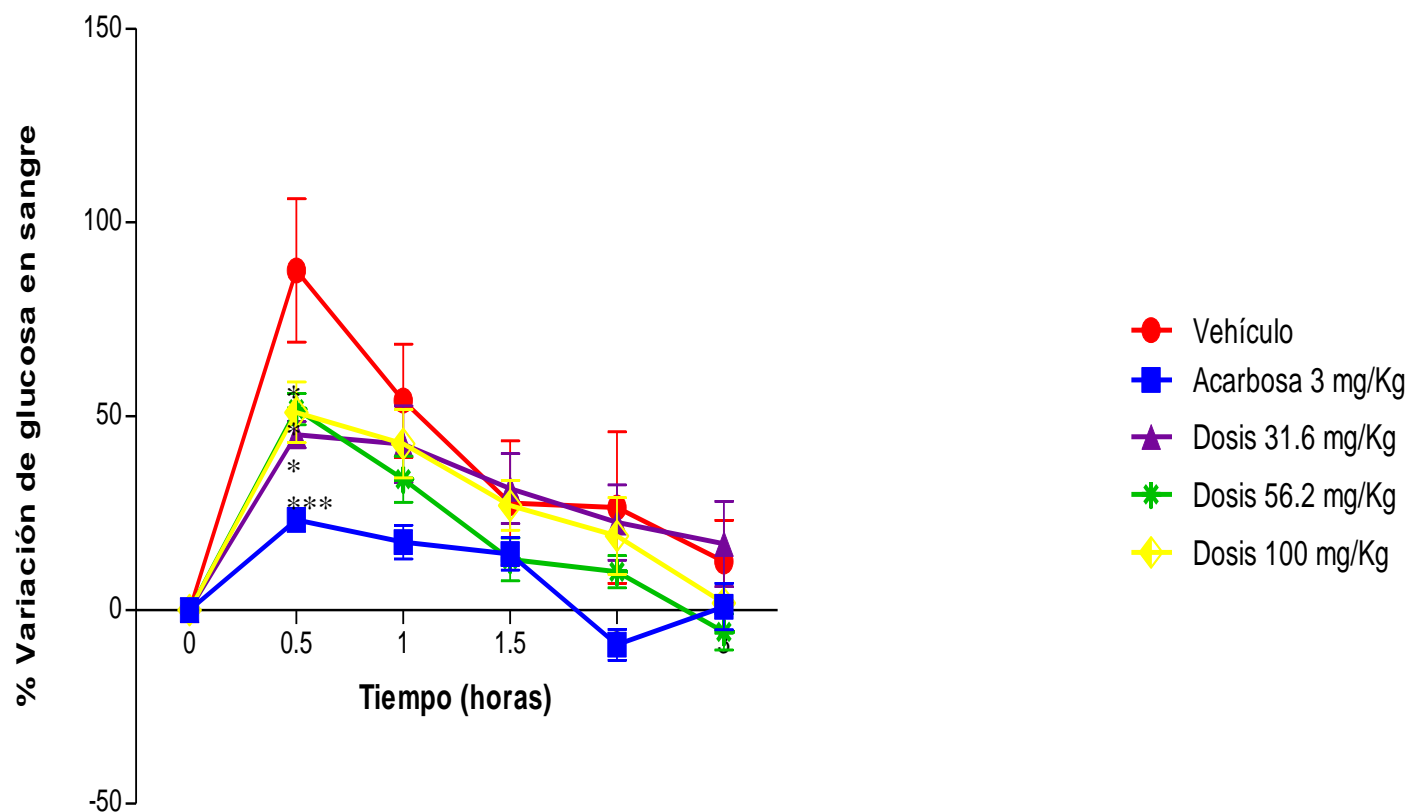


Figura 32. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración del aceite esencial de *Ligusticum porteri* obtenido por hidrodestilación en ratones diabéticos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

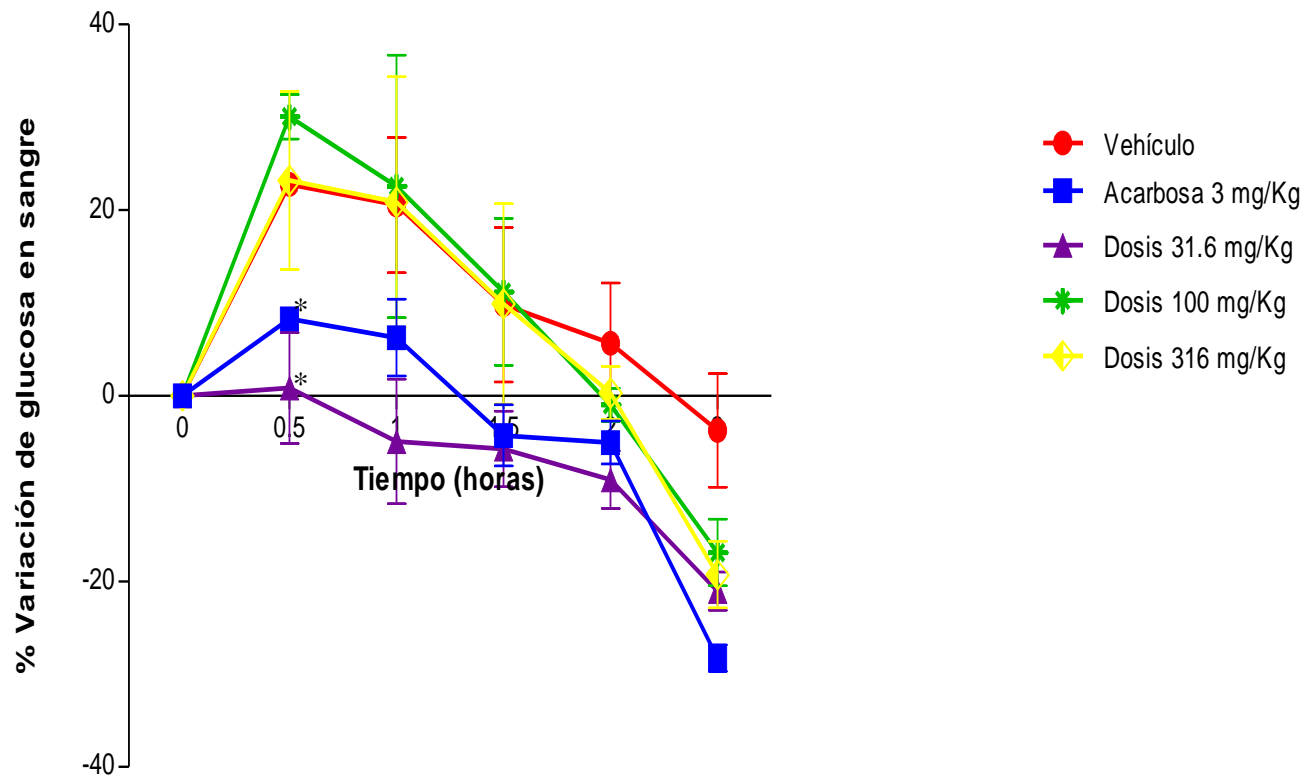


Figura 33. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración de la infusión de *Ligusticum porteri* en ratones normoglucémicos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

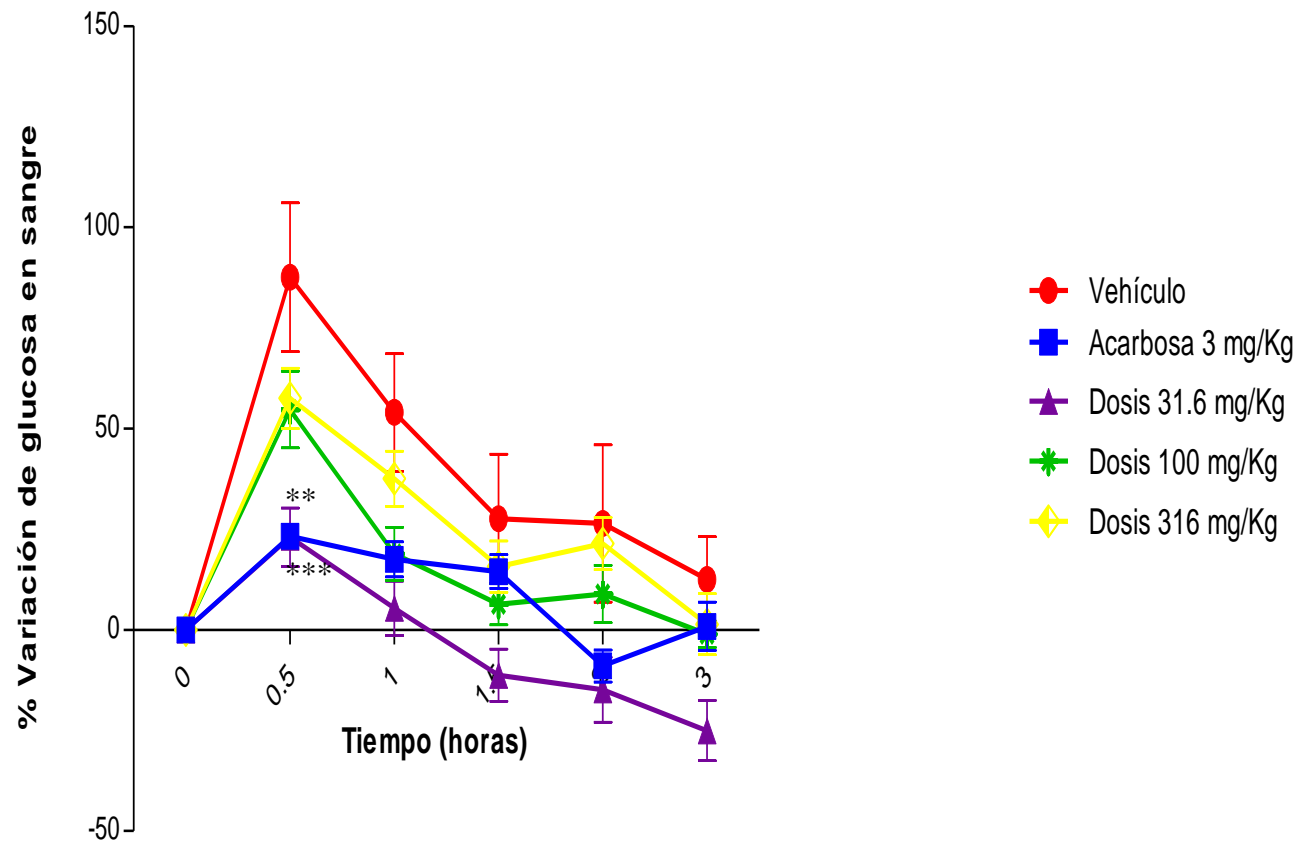


Figura 34. Curva de tolerancia a la sacarosa (OSTT) luego de la administración de la infusión de *Ligusticum porteri* en ratones diabéticos.

Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de $n=6$ ratones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al vehículo se determinaron mediante un análisis de tipo ANADEVa seguida de una prueba de t -Dunnnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

6. Conclusiones

1.-El presente trabajo de investigación constituye una aportación a la generación de los criterios de calidad de la droga cruda de la especie *Ligusticum porteri* ya que se obtuvo el perfil cromatográfico de la esencia obtenida por hidrodestilación, así como de los componentes volátiles separados por la técnica de headspace microextracción en fase sólida. Estos perfiles, en conjunto con las pruebas de composición generadas anteriormente en nuestro grupo de trabajo por Rivero-Cruz *et al.*, (2011), sentarán las bases para garantizar la buena calidad de la planta, característica que es fundamental para garantizar su eficacia y seguridad.

2.-Se encontró que el aceite esencial y la infusión de *L. porteri* presentan una DL₅₀ mayor a 5000 mg/Kg, por lo tanto de acuerdo a los criterios de Lorke (1989), ambos preparados son inocuos para roedores. En consecuencia, éstos son potencialmente más seguros para consumo humano que el extracto íntegro, el cual presenta una toxicidad moderada de acuerdo con los resultados reportados por Déciga y colaboradores (2007). Estos hallazgos, aunados al uso por más de un siglo de esta planta, permiten proponer a priori que el uso de esta especie no constituye riesgo alguno para sus consumidores.

3.-De los resultados obtenidos en la pruebas para determinar el efecto antinociceptivo de la especie, se puede establecer que la planta presenta un efecto analgésico potencial de utilidad para controlar el dolor visceral inflamatorio periférico y a nivel central. De los tres preparados, el mejor fue el extracto íntegro; sin embargo, este preparado es el más tóxico. Por otro lado, los niveles de acción del aceite y la infusión fueron aceptables y permiten corroborar a nivel preclínico el uso popular de la planta como analgésico. Los compuestos *Z*-ligustilida (1) y *Z*-3-butilidenftálida (3) son algunos de los principios

activos responsables del efecto antinociceptivo a nivel central, mientras que el compuesto diligustílida (6) es uno de los causantes de la actividad antinociceptiva a nivel periférico. El mejor efecto del extracto íntegro en las dos pruebas de nocicepción indica que la planta contiene otros principios activos.

4.- *Ligusticum porteri* posee efecto espasmolítico moderado de acuerdo a los resultados obtenidos para el aceite esencial, el extracto íntegro y la diligustílida (6), metabolito que se encuentra en buena proporción en este último preparado. Estos hallazgos, en conjunto con los descritos en el inciso anterior, sustentan a nivel preclínico el uso de la planta en las prácticas médicas populares para el tratamiento de cólicos estomacales.

5.-El aceite esencial y la infusión presentan actividad antihiperoglucémica en ratones. En el primer caso el efecto puede implicar no sólo la inhibición de las enzimas α -glucosidasas que degradan oligo y polisacáridos a monosacáridos para favorecer su absorción, sino también de los mecanismos de absorción de glucosa en el intestino. Cabe recordar que Brindis y colaboradores establecieron que la *Z*-3-butilidenftálida (3), componente importante del aceite esencial, es un inhibidor de las α -glucosidasas. Sin embargo, la *Z*-ligustílida (1), que es otro constituyente importante de la esencia, no fue activa en esta prueba pero sí demostró un efecto antihiperoglucémico importante en la prueba de tolerancia a la glucosa. La infusión que contiene ambas ftálicas demostró a la menor dosis utilizada un importante efecto antihiperoglucémico comparable al de la acarbosa en la prueba de tolerancia a la sacarosa. Por lo tanto el uso tradicional de la especie para tratar la diabetes también se ve sustentada con este hallazgo y los de Brindis *et al.* (2011).



7. Perspectivas

- ✓ Evaluar el aceite esencial en la prueba de placa caliente con dosis menores a 31.6 mg/Kg (*p.o*) para determinar si este preparado presenta un efecto dependiente de la dosis.
- ✓ Realizar el estudio agudo para determinar la actividad hipoglucemiante de la infusión de la especie.
- ✓ Caracterizar y aislar los compuestos presentes en la infusión, con la finalidad de realizar estudios de eficacia ya que se demostró que el extracto acuoso contiene otros principios activos con efecto antinociceptivo.
- ✓ Realizar estudios adicionales con la finalidad de establecer mecanismos de acción de los compuestos evaluados.

8. Bibliografía

- ✓ Andrade-Getto, A. & Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**, (3), 325-348.
- ✓ Appelt, G. D. (1985). Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum porteri* (osha) and *Matricaria chamomilla* (manzanilla). *Journal of Ethnopharmacology*, **13**, (1), 51-55.
- ✓ Arab, L. (2000). Epidemiologic challenges in the study of the efficacy and safety of medicinal herbs. *Public health nutrition*, **3**, (4A), 453-457.
- ✓ Argueta, V. A., Cano, A. L. & Rodarte, M. E. (1994). *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*. México, Instituto Nacional Indigenista.
- ✓ Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, **62**, 2145-2148.
- ✓ Belardi, R. G. & Pawliszyn, J. (1989). The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibers in the Extraction of Organics from Water Matrix Samples and their Rapid Transfer to Capillary Columns. *Water Pollution Research Journal of Canada*, **24**, 179.
- ✓ Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B. & Rubiolo, P. (2008). Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography. A*, **1184**, (1-2), 220-233.

-
- ✓ Brindis, F., Rodriguez, R., Bye, R., Gonzalez-Andrade, M. & Mata, R. (2011). (Z)-3-butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an alpha-glucosidase inhibitor. *Journal of Natural Products*, **74**, (3), 314-320.
 - ✓ Bye, R. A. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*, **40**, 103-124.
 - ✓ Calabrese, E. J. (2008a). Pain and u-shaped dose responses: occurrence, mechanisms, and clinical implications. *Critical Reviews in Toxicology*, **38**, (7), 579-590.
 - ✓ Calabrese, E. J. (2008b). U-shaped dose response in behavioral pharmacology: historical foundations. *Critical Reviews in Toxicology*, **38**, (7), 591-598.
 - ✓ Cegiela-Carlio, P., Bessiere, J. M., David, B., Mariotte, A. M., Gibbons, S. & Dijoux-Franca, M. G. (2005). Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L., Apiaceae) essential oil compounds. *Journal of Flavour and Fragrance*, **20**, 671-675.
 - ✓ Constance, L., Chiang, T. I. & Bye, R. A. (1976). *Chromosome numbers in Chihuahuan Umbelliferae*, USA, Harvard University.
 - ✓ Crawford, J. L., McNulty, S. P., Sowell, J. B. & Morgan, M. D. (1998). Changes in Aspen communities over 30 years in Gunnison County, CO. *American Midland Naturalist*, **140**, 197-205.
 - ✓ Cristians, S., Guerrero-Analco, J. A., Perez-Vasquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R. & Mata, R. (2009). Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: potential alternatives to the use of the stem bark of these species. *Journal of Natural Products*, **72**, (3), 408-413.
-

-
- ✓ Cronquist, A., Holmgren, N. H. & Holmgren, P. K. (1997). *Intermountain flora. Vascular plants of the intermountain west, USA*, New York. USA, The New York Botanical Garden Bronx.340-341, 365-367.
 - ✓ Cseke, L. J., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J. & Brielmann, H. (2006). *Natural Products from Plants*, New York, USA, Taylor & Francis.
 - ✓ Chan, S. S., Cheng, T. Y. & Lin, G. (2007). Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, **111**, (3), 677-680.
 - ✓ Daniels, A. L., Van Slambrouck, S., Lee, R. K., Arguello, T. S., Browning, J., Pullin, M. J., Kornienko, A. & Steelant, W. F. (2006). Effects of extracts from two Native American plants on proliferation of human breast and colon cancer cell lines in vitro. *Oncology Reports*, **15**, (5), 1327-1331.
 - ✓ Deciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castaneda-Corral, G., Angeles-Lopez, G. E., Navarrete, A. & Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **110**, (2), 334-342.
 - ✓ Delgado, G., Reza-Garduno, R. G., Rios, M. Y. & Del Rio, F. (1992). Phthalides and Monoterpenes of the Hexane Extract of the Roots of *Ligusticum porteri*. *Planta medica*, **58**, (6), 570-571.
 - ✓ Delgado, G., Reza-Garduño, R. G., Toscano, R. A., Bye, R. A. & Linares, E. (1988). Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray structure of Z-6,6',7,3a'-diligustilide. *Heterocycles*, **27**, 1305-1312.
-



-
- ✓ Du, J., Bai, B., Kuang, X., Yu, Y., Wang, C., Ke, Y., Xu, Y., Tzang, A. H. & Qian, Z. M. (2006). Ligustilide inhibits spontaneous and agonists- or K⁺ depolarization-induced contraction of rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**, (1), 54-58.
 - ✓ Du, J., Yu, Y., Ke, Y., Wang, C., Zhu, L. & Qian, Z. M. (2007). Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. *Journal of Ethnopharmacology*, **112**, (1), 211-214.
 - ✓ Eisenberg, D. M., Davis, R. B., Ettner, S. L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M. & Kessler, R. C. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *The Journal of the American Medical Association*, **280**, (18), 1569-1575.
 - ✓ FEUM (2001). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*.
 - ✓ Galaviz, A., Galaviz, C., Galaviz, L. & Duarte, C. (1994). *Flora medicinal Pima de Yecora, Sonora. Flora medicinal indígena de México: treinta y cinco monografías del atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, México, Instituto Nacional Indigenista, 90-105.
 - ✓ Goetz, P. (2005). Plantes médicinales d'Amérique du Nord: apport à la phytothérapie française du traitement des affections des voies respiratoires. *Phytothérapie*, **1**, 19-27.
 - ✓ Goldfrank, L. (1982). The Pernicious Panacea: Herbal Medicine. *Hospital Physician*, **10**, 64-86.
 - ✓ Guenther, E., Gilbertson, G. & Roman, T. (1971). Essential Oils and Related Products. *Analytical Chemistry*, **43**, (5), 20.

-
- ✓ Hajhashemi, V., Ghannadi, A. & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**, (1), 67-71.
 - ✓ Hernández-Vazquez, L. 1999. Reactividad química de toquinolida B, una ftálica dimérica aislada de *Ligusticum porteri*. Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ✓ Ho, C. C., Kumaran, A. & Hwang, L. S. (2009). Bio-assay guided isolation and identification of anti-Alzheimer active compounds from the root of *Angelica sinensis*. *Food Chemistry*, **114**, 246-252.
 - ✓ Hou, Y. Z., Zhao, G. R., Yang, J., Yuan, Y. J., Zhu, G. G. & Hiltunen, R. (2004). Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Life sciences*, **75**, (14), 1775-1786.
 - ✓ IUPAC (2008). Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of herbal medicine. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, **80**, (10), 2195-2230.
 - ✓ Jordan, S. A., Cunningham, D. G. & Marles, R. J. (2010). Assessment of herbal medicinal products: challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **243**, (2), 198-216.
 - ✓ Kataoka, H., Lord, H. L. & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography. A*, **880**, (1-2), 35-62.
 - ✓ Kuang, X., Du, J. R., Chen, Y. S., Wang, J. & Wang, Y. N. (2009). Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated
-

- with decreased pro-inflammatory markers in rat brains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **92**, (4), 635-641.
- ✓ Kuang, X., Yao, Y., Du, J. R., Liu, Y. X., Wang, C. Y. & Qian, Z. M. (2006). Neuroprotective role of *Z*-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Research*, **1102**, (1), 145-53.
 - ✓ Kwon, J. H. & Ahn, Y. J. (2002). Acaricidal activity of butylidenephthalide identified in *Cnidium officinale* rhizome against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, (16), 4479-4483.
 - ✓ León, M. A. 2011. *Reactividad química de los productos naturales bioactivos toquinólida B y diligustílica. Determinación de la configuración absoluta de algunos derivados*. Doctorado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ✓ Li, S., Han, Q., Qiao, C., Song, J., Cheng, C. L. & Xu, H. (2008). Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine*, **3**, 1-16.
 - ✓ Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J. Y. & Tan, R. X. (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, **98**, (3), 329-33.
 - ✓ Linares, E. & Bye, R. A., Jr. (1987). A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*, **19**, (2), 153-183.
 - ✓ MacLennan, A. H., Wilson, D. H. & Taylor, A. W. (1996). Prevalence and cost of alternative medicine in Australia. *Lancet*, **347**, (9001), 569-573.



-
- ✓ Marriott, P. J., Shellie, R. & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, **936**, (1-22).
 - ✓ Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M. & Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, **47**, (2), 224-229.
 - ✓ Mathias, M. E. & Constance, L. (1994). Umbelliferae. *North American Flora*, **28B**, (1), 143-148.
 - ✓ Mentz, L. A. & Schenkel, E. P. (1989). A coerencia e a confiabilidade das indicacoes terapeuticas. *Caderno de Farmacia*, **5**, 93-119.
 - ✓ Millar, W. J. (1997). Use of alternative health care practitioners by Canadians. *Canadian journal of public health. Revue Canadienne de Sante Publique*, **88**, (3), 154-158.
 - ✓ Mogil, J. S., Davis, K. D. & Derbyshire, S. W. (2010). The necessity of animal models in pain research. 151, 156.
 - ✓ Olivas, M. (1999). *Plantas Medicinales del Estado de Chihuahua*, México, CEB.60, 61, 114.
 - ✓ Or, T. C., Yang, C. L., Law, A. H., Li, J. C. & Lau, A. S. (2011). Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from *Ligusticum chuanxiong* and their underlying mechanisms of action on microglia. *Neuropharmacology*, **60**, (6), 823-831.



-
- ✓ Ortega, A., Roca, A. & Micó, J. A. (2002). Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, **9**, 7.
 - ✓ Panter, K. L., Ashley, R. E., Guernsey, K. M. & Johnson, C. M. (2004). Preliminary studies on propagation of osha. *Horttechnology*, **14**, 141-143.
 - ✓ Pawliszyn, J. (2003). Sample preparation: quo vadis? *Analytical chemistry*, **75**, (11), 2543-2558.
 - ✓ Rates, S. M. (2001). Plants as source of drugs. *Journal of the International Society on Toxinology*, **39**, (5), 603-613.
 - ✓ Reza-Garduño, R. G. 1987. *Aislamiento y caracterización de los ftálicos de Ligusticum porteri C & R (Umbelliferae)*. Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ✓ Rios, M. Y. & Delgado, G. (1999). Lewis acyd catalyzed transformations of Z-ligustilide. *Revista de la Sociedad Química de México*, **43**, (3, 4), 127-132.
 - ✓ Rivero, I., Juárez, K., Zuluaga, M., Bye, R. & Mata, R. (2011). Quantitative HPLC Analyses for Determining two of the Major Active Phthalides from *Ligusticum porteri* Roots *Journal of AOAC International*.
 - ✓ Shetti, S., Kumar, C. D., Sriwastava, N. K. & Sharma, I. P. (2011). Pharmacovigilance of herbal medicines: Current state and future directions. *Pharmacognosy agazine*, **7**, (25), 69-73.
 - ✓ Silver, S. (2007). Tonnage survey of selected North American wild-harvested plants, 2004-2005. *In: ASSOCIATION, T. A. H. P. (ed.) American Herbal Products Association*.

-
- ✓ Smith, R. L., Cohen, S. M., Doull, J., Feron, V. J., Goodman, J. I., Marnett, L. J., Portoghese, P. S., Waddell, W. J., Wagner, B. M., Hall, R. L., Higley, N. A., Lucas-Gavin, C. & Adams, T. B. (2005). A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food and chemical toxicology*, **43**, (3), 345-363.

 - ✓ Sudberg, S., Sudberg, E. M., Terrazas, J., Sudberg, S., Patel, K., Pineda, J. & Fine, B. (2010). Fingerprint Analysis and the Application of HPTLC to the Determination of Identity and Quality of Botanicals, from an Industry Perspective. *Journal of AOAC International*, **93**, (5), 10.

 - ✓ Tan-No, K., Niijima, F., Nakagawasai, O., Sato, T., Satoh, S. & Tadano, T. (2003). Development of tolerance to the inhibitory effect of loperamide on gastrointestinal transit in mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **20**, (3), 357-363.

 - ✓ Tang, Y., Zhu, M., Yu, S., Hua, Y., Duan, J. A., Su, S., Zhang, X., Lu, Y. & Ding, A. (2010). Identification and comparative quantification of bio-active phthalides in essential oils from si-wu-tang, fo-shou-san, radix angelica and rhizoma chuanxiong. *Molecules*, **15**, (1), 341-351.

 - ✓ Teng, C. M., Chen, W. Y., Ko, W. C. & Ouyang, C. H. (1987). Antiplatelet effect of butylidenephthalide. *Biochimica et Biophysica acta*, **924**, (3), 375-382.

 - ✓ Terrell, B. & Fennell, A. (2009). Osha (bear root): *Ligusticum porteri* J.M. coult. & rose var. porteri. *Native Plants Journal*, **10**, 111-118.

 - ✓ Tsukamoto, T., Ishikawa, Y. & Miyazawa, M. (2005). Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against
-

- Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, (14), 5549-5553.
- ✓ Turi, C. & Murch, S. J. (2010). The Genus *Ligusticum* in North America: An Ethnobotanical Review with Special Emphasis upon Species Commercially Known as 'Osha'. *HerbalGram*, (89), 40-51.
 - ✓ Ulrich, S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography. A*, **902**, (1), 167-194.
 - ✓ Vas, G. & Vekey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, (3), 233-254.
 - ✓ Vulto, A. G. & Smet, P. A. (eds.) 1988. *Meyler's Side Effects of Drugs*, Amsterdam: Elsevier.
 - ✓ Walter, K. S. & Gillet, H. J. (1998). Red List of Threatened Plants. *In: IUCN*, C. B. T. W. C. M. C. (ed.). Gland, Switzerland and Cambridge, UK: The World conservation Union.
 - ✓ Wang, N., Zhang, Y., Li, X., Tong, Y., Kong, H. & Xu, G. (2010). Analysis of volatile oils of *Ligusticum chuanxiong* Hort. from different geographical origins by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Chinese journal of Chromatography*, **28**, (4), 329-335.
 - ✓ West, K. & Jackson, S. (2004). Research to determin osha's economic potential as a sustainable agricultural crop. *HerbalGram*, **62**, 15.
 - ✓ WHO (1998). Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.



-
- ✓ WHO (1999). *WHO monographs on selected medicinal plants*, Geneva, Switzerland, World Health Organization.
 - ✓ WHO (2002a). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra: *World Health Organization*. 74.
 - ✓ WHO (2002b). *WHO monographs on selected medicinal plants*, Geneva, Switzerland, World Health Organization
 - ✓ WHO (2007). *WHO monographs on selected medicinal plants*, Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
 - ✓ WHO (2009). *WHO monographs on selected medicinal plants*, Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
 - ✓ WHO (2010). *WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)*, Geneva, Switzerland, *World Health Organization*.
 - ✓ WHO (2011). The World Medicines Situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva, *World Health Organization*.
 - ✓ Wichtl, M. 2006. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. *In: MEADPHARM, C. P. A. (ed.) A Handbook for practice on a scientific basis Norman Grainger Bisser*. German.
 - ✓ Yancey-Wrona, J. E., Raymond, T. J., Mercer, H. K., Sadee, W. & Bilsky, E. J. (2009). 6beta-naltrexol preferentially antagonizes opioid effects on gastrointestinal transit compared to antinociception in mice. *Life Sciences*, **85**, (11-12), 413-420.



-
- ✓ Zolla, C. (1994). *Flora Medicinal Indígena de México 35 Monografías del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*, México, Instituto Nacional Indigenista. 105, 473, 759.

 - ✓ Zschoke, S., Liu, J. H., Stuppner, H. & Bauer, R. (1998). Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related Umbelliferous drugs by Thin Layer Chromatography, High-Performance Liquid Chromatography, and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, **9**, 283-290.

 - ✓ Zuluaga, M. (2009). Pruebas de composición, identidad y eficacia selectas de utilidad para el aseguramiento de la droga cruda de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae). Maestría, *Facultad de Química*, Universidad Nacional Autónoma de México.

9. Anexos

Anexo I

Participación en congresos

Nombre de la reunión: 7ª Reunión internacional de Investigación en Productos Naturales “Dr. Pedro Joseph Nathan”

Nombre del trabajo: Determinación de los componentes volátiles mayoritarios en el aceite esencial y droga cruda de *Ligusticum porteri*

Fecha: 18 al 20 de Mayo de 2011

Lugar: Morelia, Michoacán

Nombre de la reunión: QuimiUNAM 2011

Nombre del trabajo: Pruebas de eficacia de extractos y compuestos puros de la especie medicinal *Ligusticum porteri*

Fecha: 16 al 18 de Noviembre de 2011

Lugar: Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.



Anexo II

Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLAE para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de *L. porteri*

Tiempo (min)	%ACN	%H ₂ O + 0.5%AcOH
0	20	80
5	53	47
15	53	47
30	70	30
40	100	0