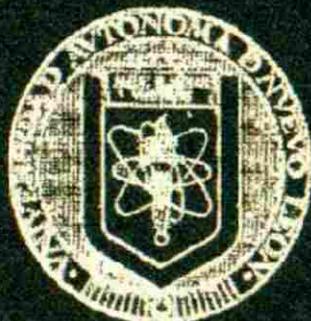


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ACTIVIDAD ANTIESPASMODICA DE EXTRACTOS
DE PLANTAS MEDICINALES EN PREPARACIONES
DE ILEON DE COBAYO

Por
M.C. LUIS BENJAMIN SERRANO GALLARDO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Biomédica

Febrero, 2005



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.C. LUIS BENJAMIN SERRANO GALLARDO

TD
QK99
.M4
S4
2005
c.1



1080126698



UANL

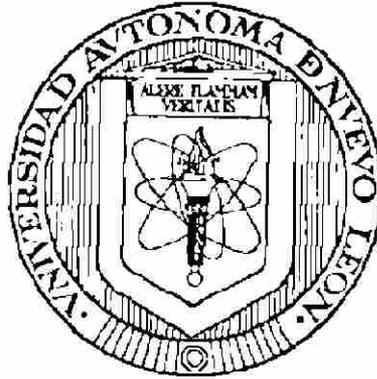
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES EN PREPARACIONES DE ÍLEON DE COBAYO**

Por

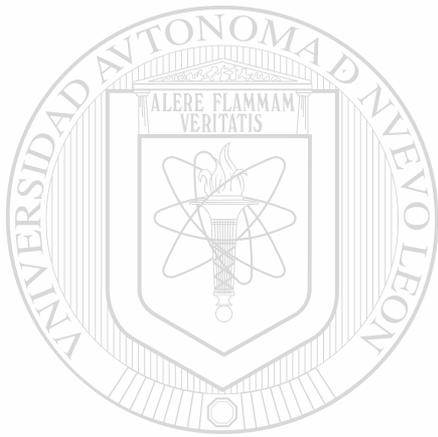
M.C. LUIS BENJAMÍN SERRANO GALLARDO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Química Biomédica

Febrero, 2005

T
Q 99
- 14
4
20



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

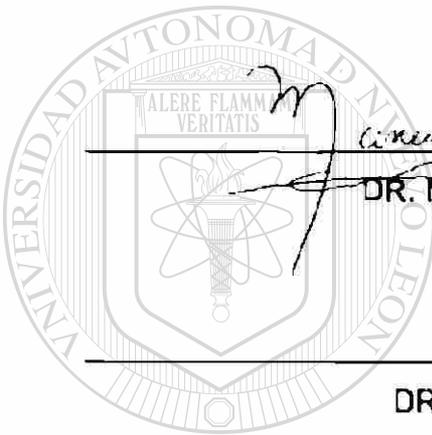


**ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES EN PREPARACIONES DE ÌLEON DE COBAYO**

Aprobación de la Tesis:



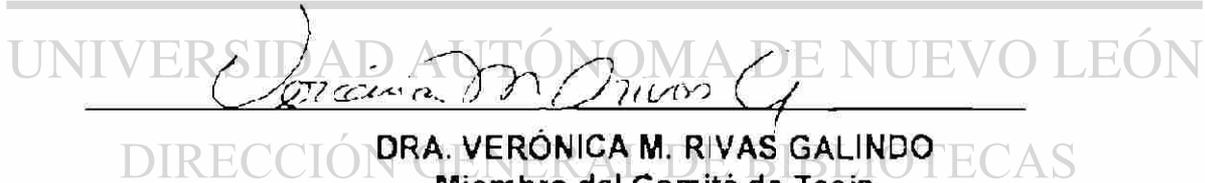
DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Director de Tesis



DR. MANUEL G. ROSALES GONZÁLEZ
Co-Director Externo de Tesis



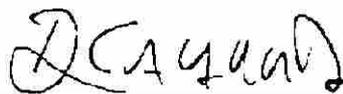
DRA. NANCY FERNÁNDEZ GARZA
Co-Director de Tesis



DRA. VERÓNICA M. RIVAS GALINDO
Miembro del Comité de Tesis



DRA. ROSALBA RAMÍREZ DURÓN
Miembro del Comité de Tesis

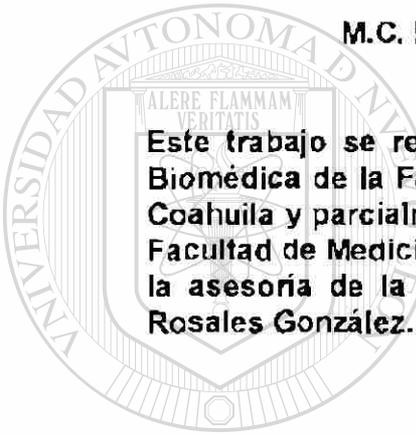


DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA EN EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES EN PREPARACIONES DE ÍLEON DE COBAYO**

Presentado por:

M.C. LUIS BENJAMÍN SERRANO GALLARDO



Este trabajo se realizó principalmente en el Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila y parcialmente en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí Waksman de Torres y del Dr. Manuel Rosales González.

FIRMAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Director de Tesis

DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

Co-Director Externo de Tesis

DR. MANUEL ROSALES GONZÁLEZ

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, porque cada vez que descubro o aprendo algo nuevo, me siento más pequeño por lo poco que he aprendido.

A mi **ESPOSA e HIJO**, por el tiempo robado y la angustia que les provocaron mis frecuentes viajes, los quiero.

A mi **MADRE**, porque estoy cumpliendo la promesa de ir y ver más allá a donde ella no ha podido ir y ver.

A mis **HERMANOS**: Fernando, Clara Elia, Ricardo, Germán, Alma Rosa, José de Jesús, Carlos y Miguel por el gran apoyo que me han otorgado.

A mi hermana "**CHELITO**", que Dios la tenga en el CIELO, porque me inculcó valores morales, me apoyó en mis estudios y me dio su amor.

A mi **Tío Luis**, quien espera de mi algo importante.

A todos los integrantes del **Departamento de Química Analítica** por hacerme sentir parte del mismo, en verdad los quiero.

A mis compañeros del **Centro de Investigación Biomédica** por estar al pendiente de mis avances.

A la Maestra **Ma. de Jesús Cedillo**, cuerpo Directivo de la Facultad de Ciencias Químicas y autoridades de la Universidad Juárez del Estado de Durango por su gran apoyo.

A las autoridades de la **Escuela de Ciencias Biológicas** de la Universidad Autónoma de Coahuila y especialmente al **Ing. Salvador Luévanos** por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación y darme su apoyo.

Agradezco a la **Universidad Autónoma de Coahuila** y al **PROMEP** por la beca económica otorgada para mis estudios.

Agradezco profundamente al **Dr. José Pisanty** y a la **Q.F.B. Alejandra Tula** por su valiosa ayuda en el montaje y desarrollo del trabajo experimental.

Agradezco a la **Dra. Noemí Waksman de Torres** por su paciencia y comprensión. Le agradezco y la admiro porque además de enseñarme un poco de los mucho que sabe, me enseñó que es más valiosa la calidad humana que mil libros de ciencia.

Agradezco al **cuerpo de asesores** de la tesis por enderezar mi pésima redacción.

Agradezco a mi amigo **Dr. Ricardo Salazar**, por darme la mano y brindarme con sencillez su noble corazón.

Gracias a las **Doctoras Verónica Rivas, Ma de la Luz Salazar y Rosalba Ramírez** por su amistad y apoyo permanente.

En especial, agradezco al **Dr. José Javier García Salcedo** por cuidar la salud de “mis viejos”, pero sobre todo, por ser mi guía en esta empresa de principio a fin.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Luis Benjamín Serrano Gallardo

Fecha de Graduación: Febrero, 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: **ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES EN PREPARACIONES DE ÍLEON DE COBAYO**

Número de páginas: 84

Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con especialidad en
Química Biomédica

Área de Estudio: Química Biomédica

Propósito y Método del Estudio: Se evaluó *in vitro* la actividad antiespasmódica (relajación) y tóxica de los extractos metanólicos y acuosos de las partes aéreas de seis plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales tipo cólico. Las plantas se recolectaron en la Comarca Lagunera al Norte de México y se incluyeron especies silvestres *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens* y *Marrubium vulgare*; especies cultivadas *Matricaria recutita*, *Ruta graveolens* y *Thymus vulgaris*. Para evaluar la actividad antiespasmódica de los extractos (0.1 – 10 µg/mL) se utilizaron segmentos de ileon aislados de cobayo sumergidos en un baño de órganos en condiciones fisiológicas. Se midió la amplitud de la contracción inducida con acetilcolina con y sin extracto con un transductor de tensión acoplado a un polígrafo Grass. Se obtuvieron las fracciones hexánicas, de acetato de etilo y butanólicas de los extractos más activos para valorar su actividad antiespasmódica. La toxicidad de los extractos y fracciones (10 - 1000 µg/ml.) se valoró con el ensayo de larvas del crustáceo *Artemia salina*.

Contribuciones y Conclusiones: Los extractos metanólicos de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* resultaron con la mejor respuesta antiespasmódica con 82.3 y 70.4 % de relajación. El extracto acuoso con la mejor respuesta fue el de *Ruta graveolens* con 61.8 % de relajación. Las fracciones hexánicas, de acetato de etilo y butanólicas de *Ruta graveolens* fueron las de mejor respuesta con 79.8, 81.5 y 74.9 % de relajación. Los ensayos de toxicidad mostraron que los extractos metanólicos y acuosos además de las fracciones de *Ruta graveolens* fueron los de mayor toxicidad en el rango de 10 – 38.2 µg/ml. La actividad antiespasmódica de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* son parcialmente consistentes con su uso en medicina popular para los desórdenes gastrointestinales. *Ruta graveolens* mostró actividad antiespasmódica y tóxica por lo que se recomienda limitar su uso en medicina popular hasta tener más datos de efectividad y toxicidad de sus fracciones y constituyentes.

FIRMA DEL ASESOR: _____

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 Importancia de las plantas medicinales	1
1.2 Uso de las plantas para aliviar enfermedades del tracto gastrointestinal	3
1.3 Actividad antiespasmódica	6
1.4 Evaluación de la actividad antiespasmódica con preparaciones de íleon de cobayo	8
1.5 Actividad tóxica de los extractos vegetales con larvas de <i>Artemia salina</i>	9
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
2. MATERIALES Y METODOS	14
2.1 Material, equipo y reactivos	14
2.1.1 Material Biológico	14
2.1.2 Material de laboratorio.	15
2.1.3 Programas computacionales	15
2.1.4 Equipo	15
2.1.5 Reactivos	15
2.2 Metodos	18
2.2.1 Selección y recolección del material vegetal	18
2.2.2 Extracción del material vegetal	19
2.2.2.1 Extracción metanólica a temperatura ambiente	19
2.2.2.2 Extracción acuosa caliente	19
2.2.3 Prueba biológica para la actividad antiespasmódica	20
2.2.3.1 Preparación de los segmentos de íleon de cobayo	20
2.2.3.2 Preparación de los extractos y soluciones de prueba	21
2.2.3.3 Concentración-respuesta	21
2.2.3.4 Análisis estadístico de los resultados	22
2.2.4 Fraccionamiento de los extractos con solventes de distinta polaridad	22
2.2.5 Actividad antiespasmódica de las fracciones	24
2.2.6 Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	24
2.2.6.1 Obtención de las larvas de <i>Artemia salina</i>	24
2.2.6.2 Preparación de los extractos y adición de las larvas	24
2.2.6.3 Análisis estadístico.	25

2.2.7	Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos	25
3.	RESULTADOS	29
3.1	Selección y recolección del material vegetal	29
3.1.1	Preparación del material vegetal	31
3.2	Extracción del material vegetal	32
3.3	Actividad antiespasmódica	32
3.3.1	Preparación del ensayo de la actividad antiespasmódica <i>in vitro</i>	32
3.3.2	Actividad antiespasmódica de los extractos	34
3.4	Fraccionamiento de extractos con solventes de distinta polaridad	36
3.5	Actividad antiespasmódica de las fracciones	37
3.6	Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de <i>Artemia salina</i>	39
3.7	Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos	40
4.	DISCUSION	42
4.1	Selección y recolección del material vegetal	42
4.2	Extracción del material vegetal	44
4.3	Actividad antiespasmódica	45
4.3.1	Preparación del ensayo de la actividad antiespasmódica <i>in vitro</i>	46
4.4	Actividad antiespasmódica de los extractos metanólicos	48
4.5	Actividad antiespasmódica de los extractos acuosos	51
4.6	Actividad antiespasmódica de las fracciones con solventes de distinta polaridad	53
4.7	Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de <i>Artemia salina</i>	56
4.8	Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos	59
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	62
5.1	Conclusiones	62
5.2	Recomendaciones	64
	REFERENCIAS	65

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Plantas de uso común en medicina tradicional para el tratamiento de algunos síntomas gastrointestinales	6
2.1	Pruebas fitoquímicas cualitativas para determinar los principales grupos de metabolitos secundarios	28
3.2	Localidades de recolección y número de registro del material vegetal	31
3.3	Rendimiento del material vegetal recolectado	32
3.4	Rendimiento de la extracción metanólica y acuosa del material vegetal	33
3.5	Concentración-respuesta de la atropina para producir relajación de la contracción inducida con acetilcolina 4×10^{-4} M (n = 3)	33
3.6	Porcentaje de inhibición de la contracción de los extractos metanólicos sobre el íleon aislado de cobayo	34
3.7	Porcentaje de inhibición de la contracción de los extractos acuosos sobre el íleon aislado de cobayo	35
3.8	Rendimientos del fraccionamiento de los extractos metanólicos con mayor actividad antiespasmódica con solventes de distinta polaridad.	37
3.9	Porcentaje de inhibición de la contracción de las fracciones sobre el íleon aislado de cobayo	37
3.10	Concentración letal media (CL ₅₀) de los extractos metanólicos y acuosos en larvas de <i>Artemia salina</i>	39
3.11	Concentración letal media (CL ₅₀) de las fracciones de los extractos en larvas de <i>Artemia salina</i>	40
3.12	Principales grupos fitoquímicos presentes en los extractos de las plantas en estudio	41

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Curvas de concentración-respuesta de relajación de los extractos metanólicos en ileon aislado de cobayo	35
2. Curvas de concentración-respuesta de relajación de los extractos metanólicos en ileon aislado de cobayo	36
3. Curvas de concentración-respuesta de relajación de las fracciones de <i>Matricaria recutita</i> en ileon aislado de cobayo.	38
4. Curvas de concentración-respuesta de relajación de las fracciones de <i>Ruta graveolens</i> en ileon aislado de cobayo	38

Diagrama

Página

1. Procedimiento del fraccionamiento de los extractos más activos con actividad antiespasmódica	23
---	----

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de las plantas medicinales

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado las plantas para protegerse, alimentarse y para el tratamiento de sus enfermedades (Rates, 2001; Elvin-Lewis, 2001).

Las plantas medicinales en la actualidad forman parte del cuidado de la salud de millones de personas en todo el mundo, tanto en las comunidades indígenas y rurales de los países no desarrollados, como en los países desarrollados (Phillipson, 2001).

Las plantas son capaces de producir cientos de compuestos de amplia diversidad y distinta funcionalidad. Las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, corteza, raíces, flores o semillas) que producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos; éstos tienen

la capacidad de producir efectos fisiológicos, que pueden ser benéficos o tóxicos según el principio activo de que se trate (Balandrin y cols., 1993).

En las últimas dos décadas ha resurgido la búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal, quizá porque la medicina occidental todavía no ha encontrado los fármacos adecuados para el tratamiento de algunas enfermedades como la artritis, la esquizofrenia, la depresión, diversos tipos de cánceres y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, entre otras (Kumar, y Shukla, 2003; Plotkin, 2001; Olliaro y cols, 2001), esto a pesar de que los grandes corporativos de la industria farmacéutica gastan millones de dólares en la búsqueda de nuevos medicamentos sintéticos (Drews, 2000).

La desaparición de la selva tropical, que lleva a la rápida extinción de muchas especies vegetales, es motivo para promover y apresurar los estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies utilizadas en la medicina popular (Elvin-Lewis, 2001; Htkin, 1998).

La biodiversidad del reino vegetal en el mundo se estima entre 400,000 a 500,000 especies de plantas superiores, de las cuales aproximadamente al 10 % se les han realizado estudios fitoquímicos y menor es el porcentaje de plantas que se han sometido a pruebas farmacológicas (Hostettmann y cols., 1997; Hosler y cols., 1987).

La investigación de los metabolitos secundarios ayuda a comprender la bioquímica y fisiología de los organismos que los producen y su mejor aprovechamiento con fines farmacológicos (Willimason y cols., 1996; Domínguez, 1988). Algunos de estos compuestos han sido de gran beneficio para el desarrollo de medicamentos y son una rica fuente de precursores de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica (Nisbet y Moore, 1997; Balandrin y cols., 1993).

En la actualidad, el estudio de los constituyentes fitoquímicos se realiza con mayor exactitud y rapidez, debido al desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica, que hacen posible el aislamiento e identificación de compuestos biológicamente activos, como son la cromatografía, los análisis espectrales de resonancia magnética nuclear (RMN), el análisis infrarrojo (IR) y la espectrometría de masas. El estudio de las plantas medicinales requiere de un trabajo interdisciplinario

entre expertos en botánica, química, farmacognosia, farmacología y sobre todo en toxicología (Harvey, 1999, Hostettmann y cols. 1997).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.2 Uso de las plantas para aliviar enfermedades del tracto gastrointestinal

Los desórdenes gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud en el mundo (Heinrich y cols, 2002), incluyendo nuestro país, sobre todo en la población

infantil que tiene un alto riesgo de morir por complicaciones con diarrea (Corral-Terrazas y cols., 2002).

México tiene una larga historia en el uso de las plantas medicinales, es un país muy rico en biodiversidad y geográficamente privilegiado por la variedad de climas y diversidad de composición de los suelos. La flora es de las más ricas del planeta, a tal grado que podría ser una fuente de riqueza de nuevas sustancias bioactivas (Mata y cols., 1999). Se tienen catalogadas aproximadamente 1,000 especies medicinales, pero en uso común solamente hay 300 (García-Alvarado y cols., 2001)

A pesar de la riqueza en su flora, México presenta un atraso en cuanto a la investigación en productos naturales, las publicaciones sobre plantas medicinales mexicanas cubren aspectos principalmente botánicos, etnográficos y químicos (Heinrich y cols., 1998) y muy pocos centran el interés en aspectos farmacológicos (Mata y cols., 1999). Heinrich y colaboradores (1998), estiman en miles los compuestos con actividad biológica en espera de ser investigados.

El catálogo de plantas medicinales en México, según la información bibliográfica y etnofarmacológica captada por el Instituto Nacional Indigenista (INI), contiene 2,049 referencias: 394 especies con estudios químicos, 280 especies con investigaciones químicas y farmacológicas de los extractos y solamente 88 especies con estudios químicos y farmacológicos de los principales principios activos. Estos datos son escasos

y representan solo un pequeño porcentaje de la flora medicinal mexicana, lo que claramente indica que hay escasez de investigación de los compuestos biológicamente activos (Mata y cols., 1999).

Las entrevistas con curanderas que utilizan plantas medicinales, destacan que casi una tercera parte de los remedios herbolarios está destinada a enfermedades del aparato digestivo (Campos-Navarro, 1997), lo que coincide con los reportes epidemiológicos de salud y otras encuestas etnofarmacológicas (Heinrich, 1998; Weimann y Heinrich, 1998; Zolla, 1980)

Aguilar y colaboradores (1994) recopilaron información etnofarmacológica que cubrió todo el país. Detectaron 473 plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional principalmente para tratar padecimientos gastrointestinales (diarrea, cólico intestinal y vómito). El reporte concluye que no hay datos farmacológicos suficientes sobre estas plantas que validen su uso, lo que refleja la realidad epidemiológica de los problemas de salud de la población mexicana y el estado de la investigación en plantas medicinales.

En la Tabla 1.1 se enumeran los nombres científicos y comunes de las plantas de uso común en medicina tradicional para algunos síntomas gastrointestinales

Tabla 1.1

Plantas de uso común en medicina tradicional para el tratamiento de algunos síntomas gastrointestinales

Nombre científico	Nombre común	Uso popular
<i>Argemone mexicana</i>	chicalote	dolor, diarrea, cólico intestinal (1), (2)
<i>Artemisia absinthium</i>	estafiate	diarrea, disentería, cólico (2), (3)
<i>Chenopodium graveolens</i>	epazote de zorrillo	diarrea, dolor estomacal (2), (3)
<i>Dichondra argentea</i>	oreja de ratón	acidez estomacal (1)
<i>Lippia graveolens</i>	orégano del cerro	diarrea y dolor estomacal (2)
<i>Marrubium vulgare</i>	marrubio	estomacal (1), empacho, cólico, diarrea (2)
<i>Matricaria recutita</i>	manzanilla	dispepsia, colitis, indigestión (5)
<i>Mentha spicata</i>	hierbabuena	estomáquico, antiespasmódico digestivo (5)
<i>Origanum mejorana</i>	mejorana	infecciones intestinales (1), dolor estomacal (2)
<i>Origanum vulgare</i>	orégano	Cólico estomacal (2)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	romero	digestivo, colitis (1), dolor estomacal (2)
<i>Ruta graveolens</i>	ruda	dolor estomacal, cólico (2)
<i>Salvia officinalis</i>	salvia	indigestión (1)
<i>Taraxacum officinale</i>	diente de león	colitis (1)
<i>Thymus vulgaris</i>	tomillo	dolor estomacal (2), digestivo, carminativo (1)(4)

Referencias: (1) Adame, 2000, (2) Aguilar, 1994, (3) Wren, 1994; (4) Kuklinski, 2003; (5) Bruneton, 1991

1.3 Actividad antiespasmódica

Los antiespasmódicos son un grupo de agentes, que incluyen algunos compuestos de origen natural como los alcaloides de la especie vegetal *Atropa belladonna* (atropina,

belladona, hiosciamina, y escopolamina) o sus derivados sintéticos (Bowman y Rand, 1984). Disminuyen el tono y la motilidad intestinal, debido a lo cual se utilizan para aliviar el dolor tipo cólico del tracto gastrointestinal y otras vísceras con músculo liso (Hardman y cols., 2003).

Aunque se conocen diversos mecanismos farmacológicos que explican el mecanismo de acción de los compuestos antiespasmódicos, el más común es la actividad como antagonista competitivo de la acetilcolina, y con ello impiden la despolarización de la célula muscular y su consiguiente contracción (Sama, 1998).

Se han estudiado diversas sustancias de muy variada estructura química con capacidad de inhibir las contracciones del músculo liso intestinal, y se ha demostrado que algunos compuestos aislados de plantas inhiben *in vitro* la contracción del músculo

liso aislado a concentración dependiente, entre ellos flavonoides: quercetina, apigenina, kaempferol y rutina (Mata y cols., 1997; Capasso, 1991); aceites esenciales: mircenol[®], pineno y metileugenol (Lima y cols, 2000; Bolton, 1979).

Los derivados de las plantas son una parte muy importante del tratamiento de los síntomas gastrointestinales entre los que se incluyen la dispepsia, cólico intestinal, úlcera péptica, náusea, vómito, constipación y diarrea (Hardman y cols., 2003). Las sustancias que actúan en el control de motilidad intestinal, relajando el músculo liso, son útiles para el tratamiento de muchos de estos síntomas gastrointestinales.

1.4 Evaluación de la actividad antiespasmódica con preparaciones de íleon de cobayo

Se dispone de diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad biológica de extractos vegetales (Rahman y cols., 2001; Williamson y cols., 1996). El modelo de íleon aislado de cobayo, es una prueba farmacológica *in vitro* que fue descrita inicialmente en 1904 por Magnus (Edinburgh University Staff, 1970), es utilizada para evaluar la actividad antiespasmódica de los extractos de plantas y fármacos (Weimann, 2002; Williamson, 1996; Samuelsson, 1991).

Este ensayo se fundamenta en que las porciones superior e inferior del intestino delgado son susceptibles a las acciones de las terminales nerviosas por diversas sustancias y en consecuencia, es posible valorar la actividad biológica de compuestos naturales o sintéticos (Edinburgh University Staff, 1970).

Los segmentos aislados de intestino de cualquier especie animal menor, mantienen la función de contracción y relajación durante horas incluso a temperatura ambiente, a condición de mantenerlos inmersos en solución adecuada (Edinburgh University Staff, 1970).

Para evaluar la actividad antiespasmódica, el íleon aislado de cobayo es adecuado, debido a que la actividad espontánea de contracción y relajación es relativamente lenta si se compara con el íleon de conejo, y sus movimientos pendulares

son regulares. En un baño de órganos en solución fisiológica y condiciones adecuadas de pH, temperatura y oxigenación, al poner en contacto el tejido suspendido con los compuestos activos, se produce contracción o relajación, dependiendo de su naturaleza química. El segmento de intestino al contraerse o relajarse modifica la tensión mecánica que ejerce, la que es convertida en señal eléctrica mediante un transductor de tensión (Thomas y cols., 1999). La señal eléctrica puede ser amplificada y registrada para cuantificar los cambios en la tensión (Fernández, 1999).

Para el Dr. Xavier Lozoya, el ensayo en ileon aislado de cobayo es un modelo útil para reproducir algunas de las características de la vía de administración oral de los extractos de plantas, con el fin de estudiar sus propiedades antidiarreicas (Lozoya y cols., 1990). En ese mismo sentido, diversos estudios han demostrado que la actividad antiespasmódica o espasmoilítica mostrada por los principios activos de las plantas

aportan una base farmacológica para validar su uso en la medicina tradicional (Rojas y cols., 2000; Mata y cols., 1997).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5 Actividad tóxica de los extractos vegetales con larvas de *Artemia salina*

Los compuestos bioactivos son siempre tóxicos a altas dosis (McLaughlin y cols., 1993). Se ha reportado que los productos herbolarios con alguna acción terapéutica, pueden contener sustancias potencialmente tóxicas, mutagénicas o interferir con los fármacos (Heck y cols., 2000; Montoya Cabrera y cols., 1999; Vizoso y cols., 1999; Waizel, 1999). Para la apropiada seguridad y eficacia de las fitomedicinas, además

de las pruebas fitoquímicas y farmacológicas deberían documentarse estudios de su toxicidad (Bilia y Riva, 2000).

La biología y la fisiología de las larvas de *Artemia salina* se han estudiado extensamente, debido a que éstas son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas (McLaughlin y cols., 1993).

Además de las pruebas de toxicidad con líneas celulares, la prueba *in vitro* de toxicidad con larvas de *Artemia salina*, es un ensayo de mucha utilidad en la búsqueda de nuevas drogas antitumorales. Se considera como una prueba general de toxicidad de extractos de plantas (Meyer y cols., 1982). Tiene la ventaja de ser un bioensayo sencillo, rápido y altamente sensible, utilizando larvas cosechadas a partir de sus respectivos huevecillos. Con éste bioensayo, es posible determinar la concentración letal media (CL_{50}) de los componentes activos a partir de pequeñas cantidades de muestra en términos de concentración ($\mu\text{g/mL}$), con un intervalo de confianza del 95% (Kinghorn y Balandrin, 1993).

Justificación

Diversas razones justifican el estudio farmacológico, toxicológico y fitoquímico de las plantas medicinales. La flora de México es abundante y diversa pero poco estudiada; el riesgo de perder valiosa información de la flora en peligro de extinción; datos farmacológicos insuficientes que validen su uso en la medicina tradicional; hay desconocimiento de los efectos adversos de algunas plantas de uso común como remedio casero durante el embarazo, la lactancia y la infancia.

La automedicación de los productos herbolarios y su uso generalizado, justifica que la comunidad científica aporte información de calidad, seguridad y eficacia en beneficio de los consumidores.

En el estudio de la actividad biológica, es importante como primera etapa la caracterización farmacológica de los extractos y de sus fracciones, la segunda etapa deberá consistir en dos estudios: farmacodinamia y farmacocinética de las sustancias activas, lo que podría derivar en fitomedicinas, que si son medicamentos quedaría pendiente el conocimiento de su potencial benéfico y tóxico para valorar su adecuada administración en el ser humano.

A través de la valoración farmacológica del extracto herbal, podríamos determinar cuál es el principio activo que produce la acción, cuál es su margen de seguridad, así como el de las sustancias que lo acompañan.

El incremento de la población anciana y las enfermedades del tracto gastrointestinal asociadas, para las cuales no se han desarrollado fármacos adecuados, requiere del estudio profundo de las plantas con propiedades antiespasmódicas que puedan utilizarse para tratar enfermedades relacionadas con el vaciamiento intestinal y gástrico, la irritación y la motilidad intestinal, entre otras.

Al considerar que la actividad biológica de las plantas utilizadas en medicina tradicional para tratar síntomas gastrointestinales no es del todo clara, se propuso valorar la actividad antiespasmódica y tóxica de algunas plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de síntomas gastrointestinales. Los resultados obtenidos están dirigidos parcialmente a validar su uso en medicina tradicional.

Hipótesis

Los extractos de las especies en estudio presentan actividad antiespasmódica en la preparación de ileon aislado de cobayo y baja toxicidad en el ensayo de *Artemia salina*.

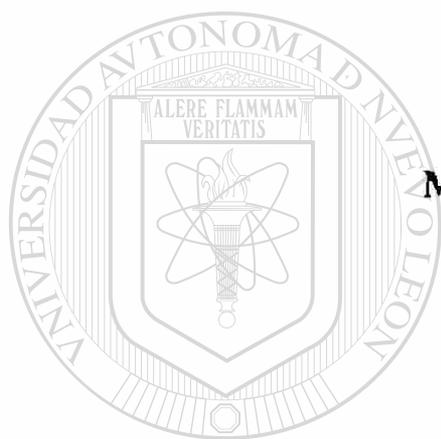
Objetivo general

Valorar la actividad antiespasmódica de los extractos de las plantas *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita*, *Ruta graveolens* y *Thymus vulgaris*.

Objetivos específicos

1. Seleccionar y recolectar el material vegetal.
2. Obtener los extractos metanólicos a temperatura ambiente y acuosos calientes.
3. Valorar la actividad antiespasmódica de los extractos en preparaciones de ileon de cobayo.
4. Fraccionar con solventes de distinta polaridad los extractos más activos para la actividad antiespasmódica.
5. Valorar la actividad antiespasmódica de las fracciones.
6. Valorar la actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de *Artemia salina*.
7. Establecer la naturaleza fitoquímica de los extractos.

CAPÍTULO 2



MATERIAL Y MÉTODOS

UANL

2.1 Material, equipo y reactivos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.1.1 Material biológico

- Cobayos albinos Dunkey hartley adquiridos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Huevos de *Artemia salina* (Brine shrimp eggs Nitro Pack®, Salt Creek, Inc, Salt Lake City, USA).
- Hojas de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens* y *Marrubium vulgare*.
- Inflorescencias de *Matricaria recutita*.

- Hojas y tallos de *Thymus vulgaris* y *Ruta graveolens*.

2.1.2 Material de laboratorio

- Tubos de ensayo Pyrex de 13 x 100 mm.
- Pipetas Pasteur.
- Frasco de vidrio para liofilizadora de 800 mL Labconco®.
- Embudo de filtración Pyrex®.
- Embudo de separación Kimax®.
- Papel filtro No. 40, Whatman International, I.TD®, Maidstone, England.
- Papel Parafilm®, Menasha, Wisc., USA.
- Caja de acrílico con dimensiones de 20 x 7 x 7 cm.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®

2.1.3 Programas computacionales

- Statgraphics Plus® versión 5.0.
- GraphadPad Prisma® San Diego, USA

2.1.4 Equipo

- Polígrafo Grass® Modelo 7D (Quincy, Mass., USA).
- Transductor de tensión FT03, Grass Instruments®, Quincy, Mass., USA.

- Baño de órganos de 50 mL de capacidad.
- Baño María con control de temperatura, Thermomix® B Braun, Germany.
- Balanza analítica Explorer Ohaus®, NJ, USA.
- Vortex-genie® Scientific Products, Illinois, USA.
- Rotavapor Büchi® R-205, Switzerland.
- Baño para rotavapor Büchi® B-490, Switzerland.
- Controlador de vacío Büchi® V-805, Switzerland.
- Liofilizadora Labconco® Freeze Dry 6.
- Incubadora con temperatura regulada a 50° C JM Ortiz®, México.
- Bomba de vacío EVAR® Power Electric, México.
- Licuadora casera Osterizer®, México.

- Lámpara ultravioleta Blak Ray®, 365 nm, Upland, Ca, USA.

- Pipeta automática Eppendorf®.
- Pipeta automática Transferpette®, 20-200 µL.
- Pipetor Oxford®.

2.1.5 Reactivos

- Metanol grado analítico JT Baker®, México.
- Agua destilada, Proveedor Casa Guerra Bejarano, México.

- Hexano grado analítico JT Baker®, México.
- Acetato de etilo grado analítico JT Baker®, México.
- n-Butanol grado analítico JT Baker®, México.
- Dimetilsulfóxido grado analítico Caledon®, Ontario, Canadá.
- Nitrógeno comprimido de alta pureza, Proveedor, AGA SA de CV, México.
- Mezcla de gas carbógeno (95% de oxígeno y 5 % de CO₂) Proveedor, AGA SA de CV, México.

- Agua de mar artificial (Instant Ocean® Aquarium Systems, Mentor, Ohio, 44060 USA).
- Solución de Tyrode (composición g/L de agua destilada: NaCl, 8.0; KCl, 0.2; CaCl₂, 0.2; MgCl₂, 0.1; NaH₂PO₄, 0.05, glucosa, 1.0 y NaHCO₃, 1.0) todos los reactivos grado analítico JT Baker®, México.

- Acetilcolina Sigma- Aldrich®, St Louis, USA.

- Atropina Sigma-Aldrich®, St Louis, USA.

2.2 Métodos

2.2.1 Selección y recolección del material vegetal

Se realizó una fase previa al diseño experimental para obtener y analizar la información de los usos e indicaciones terapéuticas de un grupo de 15 plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de síntomas gastrointestinales. De este grupo se seleccionaron seis plantas tomando en cuenta los criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos descritos por Willimason y colaboradores (1995).

Las plantas frescas se recolectaron en diferentes localidades del área rural de la Comarca Lagunera ubicada entre los estados de Coahuila y Durango al norte de México en los meses de septiembre del 2002 a abril del 2004. Tres especies fueron silvestres y tres especies fueron obtenidas de una parcela agrícola. Se siguieron los lineamientos para recolección de material vegetal propuestos por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1998).

La identificación botánica la realizaron Héctor Madinaveitia y Eduardo Blanco Contreras, botánicos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ubicada en la ciudad de Torreón, Coahuila. Se depositó un ejemplar de cada especie en el herbario de la misma universidad.

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente (25° C) a la sombra durante 5 a 10 días y luego de separar las partes aéreas se molieron hasta obtener un polvo seco.

2.2.2 Extracción del material vegetal

2.2.2.1 Extracción metanólica a temperatura ambiente

Se prepararon extractos metanólicos (Capasso y cols., 2000; Rojas-Vera y cols., 2002) colocando 100 g de material seco y molido en 400 mL de metanol grado reactivo durante 24 horas a temperatura ambiente (25° C) con agitación esporádica. El macerado se filtró y se repitió la extracción dos veces más. El residuo sólido se guardó para la extracción acuosa. El solvente se evaporó a presión reducida en rotavapor a temperatura inferior a los 50° C y el extracto se llevó a sequedad completa. El extracto crudo se pesó y se determinó el rendimiento de la extracción.

2.2.2.2 Extracción acuosa caliente

Para obtener los extractos acuosos calientes se utilizó el residuo vegetal obtenido de la extracción metanólica. Se colocaron 100 g de material vegetal en agua destilada y desionizada a ebullición durante 10 minutos. Al enfriar la mezcla se filtró y se sometió a liofilización. Se llevó a sequedad completa bajo corriente de nitrógeno comprimido hasta obtener un polvo seco. El polvo seco se pesó y determinó el rendimiento de la extracción.

2.2.3 Prueba biológica para la Actividad antiespasmódica

2.2.3.1 Preparación de los segmentos aislados de ileon de cobayo.

Para evaluar la actividad antiespasmódica se utilizó el modelo experimental en ileon de cobayo propuesto inicialmente por Magnus en 1904 y modificado por Turner en 1965 (Edinburgh University Staff, 1970). Se utilizaron cobayos albinos de ambos sexos con peso de 250 - 400 g. Se enjaularon en un ambiente controlado de luz y temperatura.

Se siguieron los lineamientos éticos para el manejo y sacrificio de animales de experimentación (AVMA, 2001)

En cada sesión experimental los animales se mantuvieron en ayuno de 14 horas con acceso libre de agua. Se sacrificaron con golpe en la nuca y dislocamiento cervical.

La cavidad abdominal se abrió mediante incisión longitudinal para extraer un segmento de ileon terminal de 10 cm de longitud, se lavó en solución de Tyrode a pH 7.4 y temperatura de 37° C (Edinburgh University Staff, 1970). Se cortó un segmento de 2 cm y se montó en un baño de órganos conteniendo solución de Tyrode a 37° C aireada con mezcla carbógena a burbujeo constante. La solución de Tyrode se preparó una hora antes de su uso.

Se registró la amplitud de la tensión desarrollada durante la contracción mediante un transductor de fuerza bajo condiciones isométricas, conectado a un poligrafo calibrado a 1 g de tensión (10 mN).

2.2.3.2 Preparación de los extractos y soluciones de prueba

Los extractos metanólicos y acuosos se diluyeron en solución de Tyrode para obtener concentraciones finales en el baño de 0.1, 1.0, 2.5 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$. Como soluciones de prueba se utilizaron diferentes concentraciones de acetilcolina en un rango de 1.8×10^{-2} M a 5×10^{-6} M para obtener la máxima respuesta de contracción.

2.2.3.3 Concentración-respuesta

Se realizaron series de ensayos concentración-respuesta de los extractos utilizando acetilcolina 1×10^{-4} M para inducir la contracción del tejido. Las contracciones fueron expresadas como porcentaje de la máxima respuesta inducida con acetilcolina 1×10^{-4} M.

Una vez que se montó el segmento de ileon en el baño de órganos y se estabilizó el sistema durante una hora, se indujo la contracción administrando acetilcolina hasta conseguir cuando menos tres máximas respuestas uniformes. El tejido se lavó tres veces con solución de Tyrode después de cada aplicación. El período de lavado entre cada aplicación de acetilcolina fue de tres minutos, tiempo suficiente para que el tejido regresara al valor de la contracción basal.

Después de que la contracción fue estable, el tejido se expuso a diferentes concentraciones de los extractos vegetales durante cinco minutos de impregnación, seguidas de un ciclo de tres lavados con solución de Tyrode entre cada aplicación, ya

que además de haber dado oportunidad para que actuara el extracto, se dio tiempo suficiente para que el tejido recuperara el valor basal de la contracción.

2.2.3.4 Análisis estadístico de los resultados

Los datos de la inhibición de la contracción (relajación) se expresaron como la media de seis experimentos \pm el error estándar de la media. Se realizó análisis de varianza, estableciendo la significancia estadística a un valor de $p < 0.05$. Se realizaron curvas de concentración (dosis)-respuesta de los extractos y sus fracciones con el paquete estadístico GraphPad Prisma®.

2.2.4 Fraccionamiento de extractos con solventes de distinta polaridad

Los extractos metanólicos más activos para la actividad antiespasmódica se fraccionaron con solventes de distinta polaridad; hexano, acetato de etilo y n-butanol. Se pesaron dos gramos de cada extracto y se procedió a realizar el fraccionamiento. Se adicionó 15 mL de metanol. Se adicionaron 5 mL de agua destilada y se vertieron en un embudo de separación, después se adicionaron 15 mL de hexano (o el doble del volumen de la mezcla metanol agua). Se agitó, decantó y separó la fracción menos polar en un vaso de precipitado y se repitió el proceso de 3 a 4 veces.

La fracción más polar se sometió a extracción con acetato de etilo y n-butanol. Las tres fracciones se evaporaron en rotavapor a presión reducida y posteriormente se llevaron a sequedad completa con corriente de gas nitrógeno (Diagrama 1).

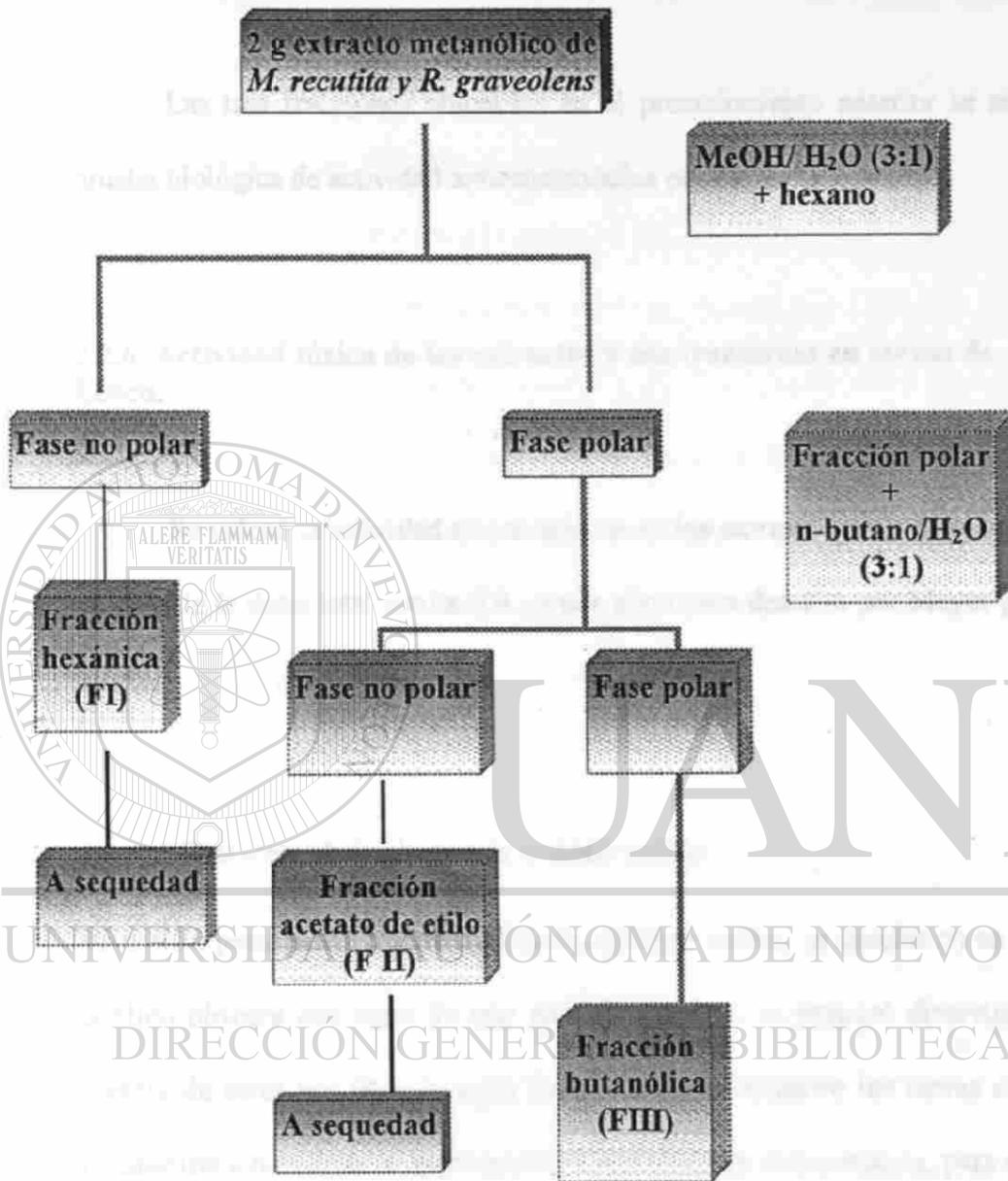


Diagrama 1. Procedimiento del fraccionamiento de los extractos más activos con actividad antiespasmódica.

2.2.5 Actividad antiespasmódica de las fracciones

Las tres fracciones obtenidas en el procedimiento anterior se sometieron a la prueba biológica de actividad antiespasmódica previamente descrita.

2.2.6. Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de *Artemia salina* Leach.

Se valoró la actividad tóxica *in vitro* de los extractos y sus fracciones mediante el cálculo de la dosis letal media (DL₅₀) por el método descrito por Meyer y colaboradores (1982).

2.2.6.1 Obtención de las larvas de *Artemia salina*.

Se pesaron 40 mg de huevos de *Artemia salina*, se incubaron en una cámara de acrílico oscura con agua de mar artificial, la cual se preparó disolviendo 38 g de la mezcla de sales por litro de agua destilada. Se cosecharon las larvas con 48 horas de incubación a temperatura ambiente bajo una lámpara de luz blanca, para someterlas a las diferentes concentraciones de los extractos.

2.2.6.2 Preparación de los extractos y adición de las larvas

Los extractos vegetales y sus fracciones se disolvieron para obtener una serie de diluciones según el esquema modificado de Meyer y cols., (1982). Se disolvieron 50 mg

de extracto en 5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) (solución A). La solución B se preparó diluyendo 0.5 mL de la solución A con 10 mL de DMSO. Se colocaron una serie de tubos de ensayo de 13 x 100 en los que se depositaron 100 μ L y 500 μ L de la solución B a los dos primeros y 50 μ L, 250 μ L y 1000 μ L de la solución A a los restantes para obtener concentraciones de 10, 50, 100, 500 y 1000 μ g/mL. Se dejó evaporar el disolvente. Cada concentración se ensayó por triplicado. Con pipeta se transfirieron 10 larvas de *Artemia salina* a cada tubo y se aforó a 5 mL con agua de mar artificial. Paralelamente se prepararon los blancos por dilución de la siguiente forma: se tomaron 10 larvas en un vial y se completó el volumen de cada tubo a 5 mL con agua de mar artificial. Los tubos se incubaron bajo una lámpara de luz blanca. Después de 24 horas se contaron las larvas vivas de cada tubo.

2.2.6.3 Análisis estadístico

Con el número de las larvas muertas se calculó la concentración letal media (CL_{50}) de los extractos con el 95 % de confianza, utilizando el método Probit de Finney (Anderson y cols., 1991).

2.2.7 Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos

Los extractos se sometieron a pruebas fitoquímicas cualitativas para los principales metabolitos secundarios según el esquema de Domínguez (1988) modificado. Se tomó una pequeña porción de cada extracto y se disolvió en 2 mL de

solvente hasta obtener una mezcla homogénea. Para el caso de la determinación de flavonoides, cumarinas sesquiterpenlactonas y saponinas se utilizó metanol. Para el caso de los triterpenos/esteroides se utilizó cloroformo.

Flavonoides: Se determinaron añadiendo unas gotas de cloruro férrico etanólico al 1%, la presencia de flavonoides se corroboró mediante la reacción de Wilstatter con magnesio y HCl (Maldonado, 1985).

Cumarinas y/o sesquiterpenlactonas: Se determinaron mediante la adición de una solución de NaOH al 10%, siendo positiva al aparecer una coloración amarilla que desaparece al acidular con H_2SO_4 . Se confirmó la presencia de cumarinas/sesquiterpenlactonas con el desarrollo de un cromatograma en capa fina de sílica gel en fase móvil cloroformo:acetona, 9:1 y posterior revelado (Bruneton, 1991).

Compuestos fenólicos Se determinaron con la prueba general de oxhidrilos fenólicos adicionando solución acuosa de $FeCl_3$ al 12.5%.

Triterpenos y/o esteroides: Se determinaron con la prueba de Liebermann-Burchard adicionando una gota de una mezcla de H_2SO_4 y anhídrido acético.

Saponinas: Se determinaron mezclando y filtrando el extracto con 9 ml de agua caliente, enseguida 1 mL del filtrado se agitó vigorosamente durante 30 segundos para observar la presencia persistente de espuma con apariencia de panal de abeja.

Alcaloides: Se determinaron con la prueba de Dragendorff a base de yoduro de bismuto, para lo cual se adicionaron unas gotas de reactivo de Dragendorff al extracto diluido. La presencia de alcaloides se verificó con el reactivo de Mayer y con el desarrollo de cromatograma en capa fina de sílica gel en fase móvil cloroformo:acetona, 9:1 (Dominguez, 1988), la placa se reveló con reactivo de Dragendorff.

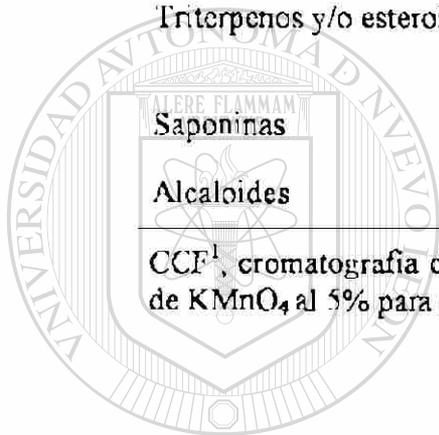
En todos los casos, las observaciones se anotaron como abundante (+++), moderado (++) , escaso (+) y negativo (-). En la Tabla 2.1 se presentan las pruebas fitoquímicas cualitativas realizadas para los grupos químicos y su interpretación.

Tabla 2.1

Pruebas fitoquímicas cualitativas para determinar los principales grupos de metabolitos secundarios.

Grupo fitoquímico	Prueba	Interpretación positiva
Flavonoides	FeCl ₃	Color verde oscuro
Cumarinas y/o sesquiterpenos	CCF ¹	Fluorescencia verde
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	Precipitado rojo, azul o verde
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	Color azul, verde, rojo, anaranjado
Saponinas	Prueba de la espuma	Espuma mayor de 15 mm
Alcaloides	Dragendorff y Mayer	Anaranjado-marrón

CCF¹, cromatografía de capa fina, revelado con luz ultravioleta y solución acuosa de KMnO₄ al 5% para cumarinas y sesquiterpenolactonas respectivamente



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3



RESULTADOS

3.1 Selección y recolección del material vegetal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

De la lista de plantas mostradas en la Tabla 1.1 se seleccionaron seis especies de acuerdo a criterios etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos. La recolección de las plantas se realizó en algunos poblados de la Comarca Lagunera geográficamente ubicada entre los estados de Coahuila y Durango a una altitud de entre 1,100 y 1,150 metros sobre el nivel del mar.

Se recolectaron plantas frescas de las especies silvestres *Argemone mexicana* (chicalote), *Lippia graveolens* (orégano) y *Marrubium vulgare* (marrubio), y plantas

frescas cultivadas en parcela agrícola de las especies *Matricaria recutita* (manzanilla), *Ruta graveolens* (ruda) y *Thymus vulgaris* (tomillo).

La recolección de *Lippia graveolens* se realizó en el cerro denominado “La Borrega”, en un terrero ondulado y accidentado con características de tipo calizo rocoso, ubicado en la zona rural a 15 km del núcleo urbano del municipio de Gómez Palacio en el Estado de Durango. En esta región, algunos lugareños explotan esta especie con fines comerciales para uso culinario.

La especie *Argemone mexicana* se recolectó en el municipio de Francisco I. Madero en el Estado de Coahuila, en un predio agrícola abandonado, en donde este arbusto crece abundantemente durante los meses de febrero a septiembre, aunque la germinación depende del agua de lluvia la cual es escasa en esta región.

La especie *Marrubium vulgare* se recolectó en el borde de las acequias secas del río Nazas a dos kilómetros del municipio de Peñón Blanco en el Estado de Durango.

Las especies *Matricaria recutita*, *Ruta graveolens* y *Thymus vulgaris* se recolectaron en un predio agrícola de hortalizas y plantas medicinales ubicado en la zona rural a 2 km del municipio de Juárez en el Estado de Durango.

En la Tabla 3.2 se muestra la ubicación de la localidad de recolección de las plantas y el número del registro del herbario donde quedó depositado un ejemplar de cada especie.

Tabla 3 2

Localidades de recolección y número de registro del material vegetal

Especie	Familia	Localidad	No del Registro
<i>Argemone mexicana</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	Fco. I. Madero, Coah.	UAAAN-H06/03
<i>Lippia graveolens</i> HBK	<i>Verbenaceae</i>	Gómez Palacio, Dgo.	UAAAN-H02/03
<i>Matricaria recutita</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Juárez, Dgo.	UAAAN-H01/03
<i>Marrubium vulgare</i> L.	<i>Labiatae</i>	Peñón Blanco, Dgo.	UAAAN-H05/03
<i>Ruta graveolens</i> L.	<i>Rutaceae</i>	Juárez, Dgo.	UAAAN-H04/03
<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Labiatae</i>	Juárez, Dgo.	UAAAN-H03/03

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



3.1.1 Preparación del material vegetal

El clima cálido de la región permitió que el secado del material vegetal a temperatura ambiente y a la sombra fuera rápido, con esto se disminuyó la pérdida de los principios activos. Se obtuvo un rendimiento del proceso de secado que fluctuó entre 6.2 y 16.6 % (Tabla 3.3) que para fines prácticos se consideró aceptable para los ensayos posteriores

Tabla 3.3
Rendimiento del material vegetal recolectado

Especie	Peso húmedo del material recolectado (kg)	Parte utilizada de la planta	Peso seco de la parte utilizada de la planta (g)
<i>Argemone mexicana</i>	5.1	hojas	420
<i>Lippia graveolens</i>	1.5	hojas	250
<i>Matricaria recutita</i>	2.5	inflorescencias	290
<i>Thymus vulgaris</i>	1.3	Hojas y tallos	155
<i>Ruta graveolens</i>	2.0	Hojas y tallos	125
<i>Marrubium vulgare</i>	5.8	hojas	670

3.2 Extracción del material vegetal.

En la Tabla 3.4 se presentan los rendimientos de la extracción metanólica y acuosa del material vegetal.

3.3 Actividad antiespasmódica

3.3.1 Preparación del ensayo de la actividad antiespasmódica *in vitro*

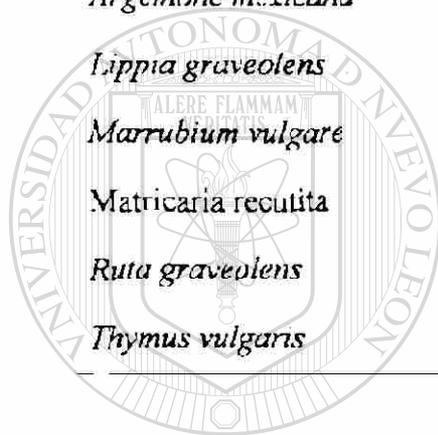
Para la respuesta de la atropina en el modelo de actividad antiespasmódica en segmentos de ileon de cobayo se obtuvieron los siguientes resultados: 100.0 % de

relajación con atropina a una concentración de 1×10^{-3} M; 15.3 % de relajación con atropina a una concentración de 1×10^{-4} M (Tabla 3.5).

Tabla 3.4

Rendimiento de la extracción metanólica y acuosa del material vegetal _____

Especie	Rendimiento del extracto metanólico/100 g de material seco (g)	Rendimiento del extracto acuoso/100 g de material seco (g)
<i>Argemone mexicana</i>	13.7	7.7
<i>Lippia graveolens</i>	27.9	17.6
<i>Marrubium vulgare</i>	11.7	5.7
<i>Matricaria recutita</i>	16.4	8.6
<i>Ruta graveolens</i>	11.4	6.4
<i>Thymus vulgaris</i>	21.6	3.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tabla 3.5

Concentración-respuesta de la atropina para producir relajación de la contracción inducida con acetilcolina 4×10^{-4} M (n = 3).

Concentración de Atropina	por ciento de la relajación
1×10^{-4} M	15.3
2×10^{-4} M	44.7
5×10^{-4} M	74.3
1×10^{-3} M	100.0

3.3.2 Actividad antiespasmódica de los extractos

Los datos de la actividad antiespasmódica de los extractos metanólicos, así como las curvas de concentración respuesta se presentan en la Tabla 3.6 y en la Figura 1.

Tabla 3.6

Porcentaje de inhibición de la contracción de los extractos metanólicos sobre el ileon aislado de cobayo.

Concentración en el baño ($\mu\text{g/mL}$)	<i>A.</i> <i>mexicana</i>	<i>L.</i> <i>graveolens</i>	<i>M.</i> <i>vulgare</i>	<i>M.</i> <i>recutita</i>	<i>R.</i> <i>graveolens</i>	<i>T.</i> <i>vulgaris</i>
0.1	7.6 \pm 5.8	12.5 \pm 2.4	4.6 \pm 1.5*	17.3 \pm 1.4	12.6 \pm 2.3	11.5 \pm 1.1*
1.0	14.9 \pm 7.9	18.3 \pm 2.8*	8.6 \pm 2.0*	36.7 \pm 2.8	28.3 \pm 16.3	15.0 \pm 1.5*
2.5	25.1 \pm 12.5*	26.8 \pm 3.3*	14.8 \pm 3.0*	48.4 \pm 1.6	34.6 \pm 5.0	23.6 \pm 0.5*
10.0	39.3 \pm 4.9*	40.8 \pm 3.4*	31.9 \pm 1.7*	82.3 \pm 1.8	70.4 \pm 13.8	43.6 \pm 2.3*

Media de seis experimentos \pm error estándar de la media, * $p < 0.05$ comparada con *Matricaria recutita*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



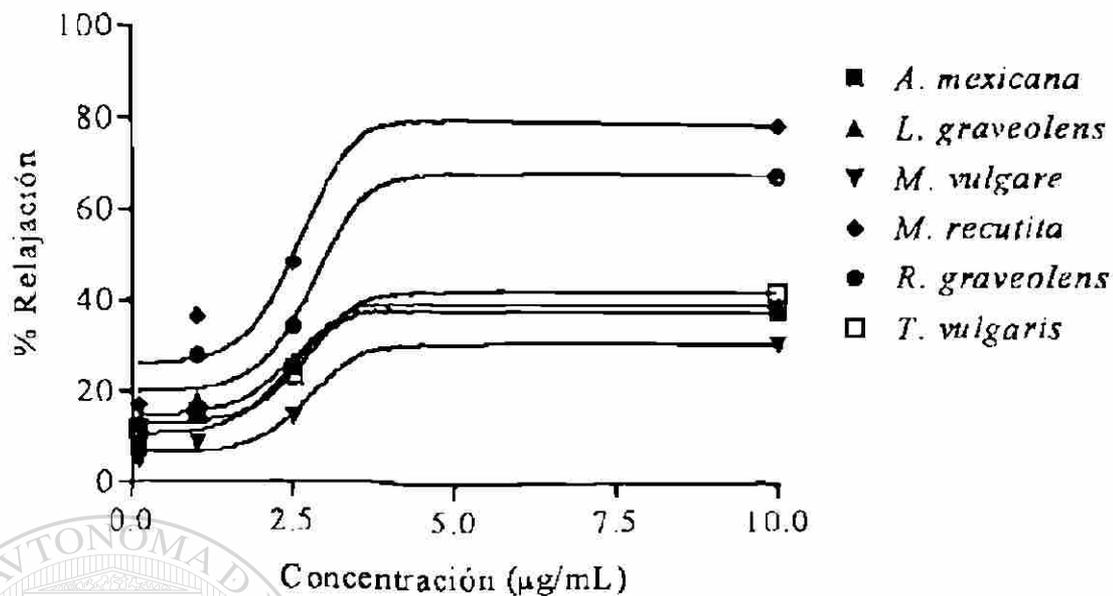


Figura 1. Curvas concentración respuesta de relajación de los extractos metanólicos en ileon aislado de cobayo.

Tabla 3.7

Porcentaje de inhibición de la contracción de los extractos acuosos sobre el ileon aislado de cobayo.

Concentración en el baño (µg/mL)	<i>A. mexicana</i>	<i>L. graveolens</i>	<i>M. vulgare</i>	<i>M. recutita</i>	<i>R. graveolens</i>	<i>T. vulgaris</i>
0.1	2.9±1.6*	3.6±1.0*	26.9±0.7	10.6±3.1*	26.0±0.7	1.4±0.04*
1.0	8.1±4.6*	12.3±1.8*	26.7±1.4*	14.4±0.9*	36.9±2.2	5.5±0.15*
2.5	14.7±3.8*	22.2±1.2*	31.8±2.5*	17.2±1.8*	51.2±1.0	32.9±1.2*
10.0	22.6±4.5*	46.9±1.2	42.6±1.5*	31.7±1.5*	61.8±3.9	51.2±3.8

Media de seis experimentos ± error estándar de la media, *p<0.05 comparada con *Ruta graveolens*

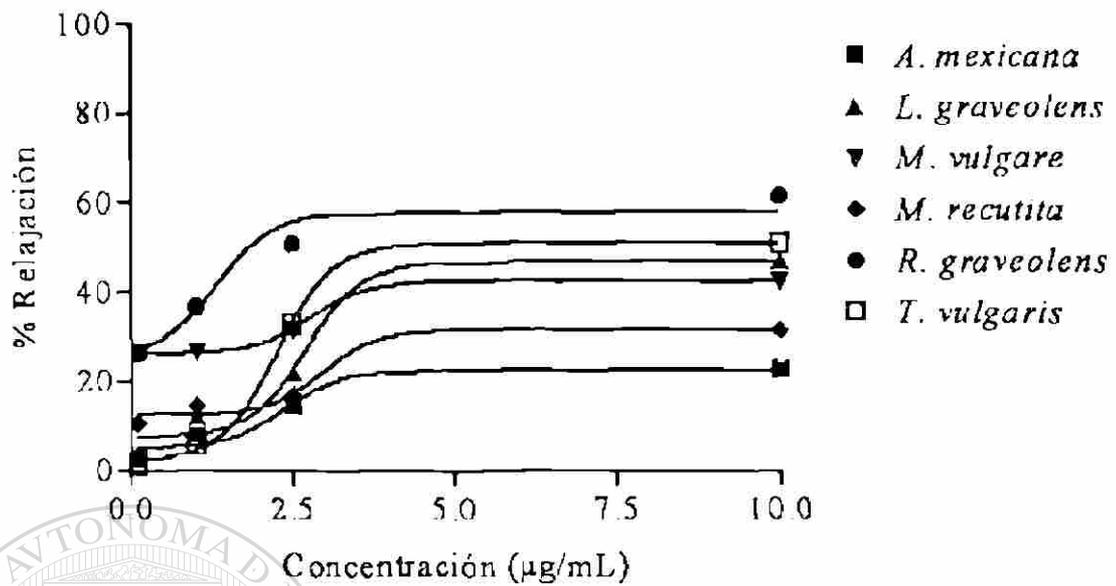


Figura 2.
Curvas concentración respuesta de relajación de los extractos acuosos en ileon aislado de cobayo.

3.4 Fraccionamiento de extractos con solventes de distinta polaridad

El rendimiento del fraccionamiento de los extractos más activos para la actividad antiespasmódica se presenta en la Tabla 3.8

Tabla 3.8

Rendimientos del fraccionamiento de los extractos metanólicos con mayor actividad antiespasmódica con solventes de distinta polaridad.

	Rendimiento (mg/g de extracto metanólico)		
	hexánica	acetato de etilo	butanólica
<i>Matricaria recutita</i>	80	220	55
<i>Ruta graveolens</i>	190	25	33

3.5 Actividad antiespasmódica de las fracciones.

Los datos de la actividad antiespasmódica de las fracciones obtenidas con solventes de distinta polaridad, así como las curvas de concentración respuesta se presentan en la Tabla 3.9 y en las Figuras 3 y 4.

Tabla 3.9

Porcentaje de inhibición de la contracción de las fracciones sobre el ileon aislado de cobayo.

Concentración en el baño ($\mu\text{g/mL}$)	Fracción hexánica		Fracción de acetato de etilo		Fracción butanólica	
	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Ruta graveolens</i>
0.1	11.49 \pm 0.3*	44.6 \pm 1.0	24.9 \pm 1.2*	6.7 \pm 0.8	7.0 \pm 1.0*	12.8 \pm 0.5
1.0	15.9 \pm 0.6*	53.8 \pm 1.2	39.6 \pm 1.5*	20.6 \pm 0.8	18.5 \pm 1.4*	26.4 \pm 0.8
2.5	36.4 \pm 1.6*	72.3 \pm 1.8	44.7 \pm 1.6	48.2 \pm 0.8	35.6 \pm 2.0*	40.5 \pm 0.7
10.0	55.0 \pm 1.3*	79.8 \pm 1.3	66.7 \pm 1.3	81.5 \pm 0.7	55.2 \pm 3.9*	74.9 \pm 0.5

Media de seis experimentos \pm error estándar de la media, * $p < 0.05$ de *Ruta graveolens* con *Matricaria recutita*

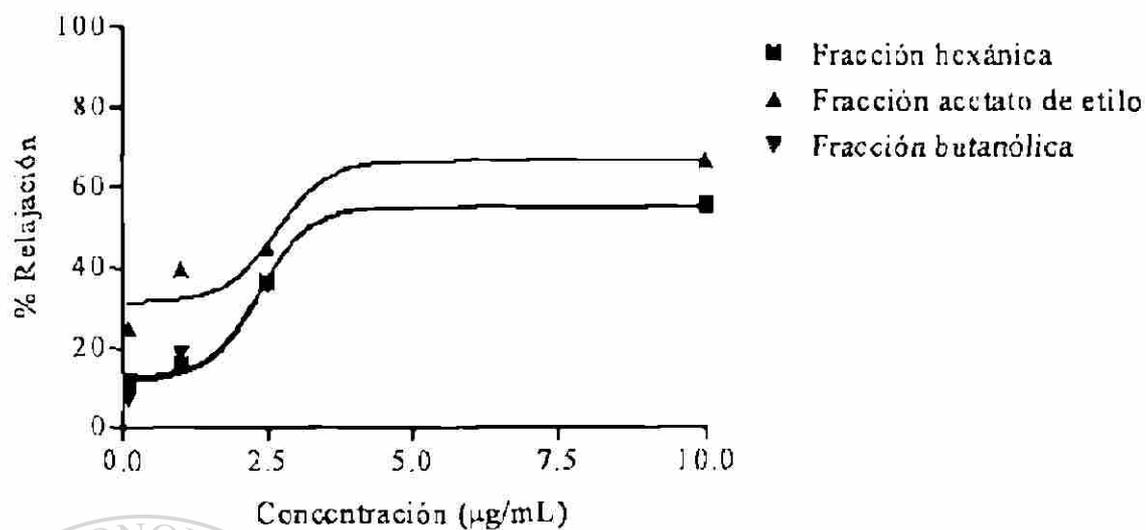


Figura 3. Curvas concentración-respuesta de relajación de las fracciones de *Matricaria recutita* en ileon aislado de cobayo.

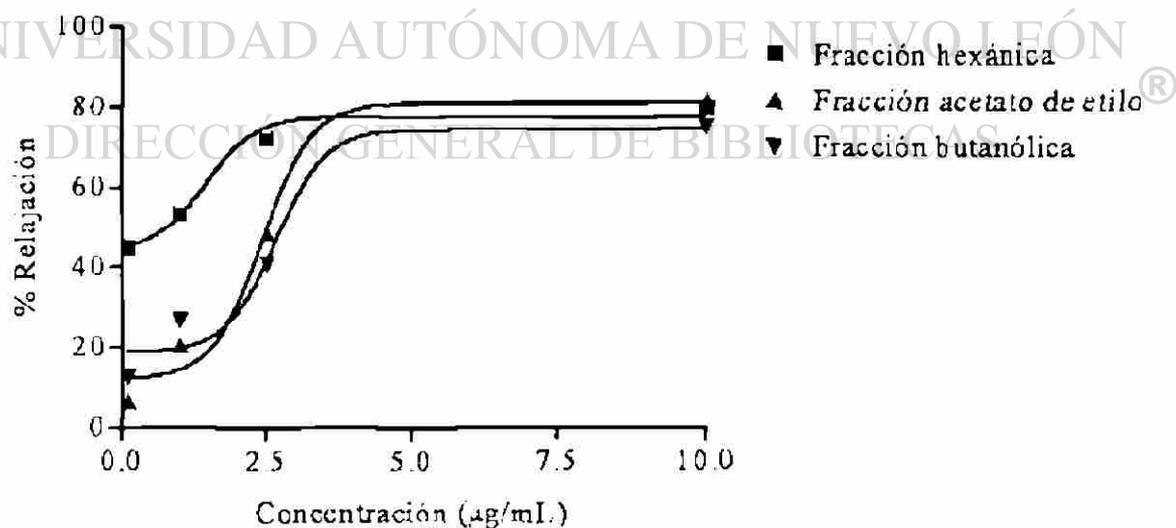


Figura 4. Curvas concentración-respuesta de relajación de las fracciones de *Ruta graveolens* en ileon aislado de cobayo.

3.6 Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de *Artemia salina*.

En las Tablas 3.10 y 3.11 se presenta la concentración letal media y sus respectivos límites de confianza al 95 % de los extractos y sus fracciones.

Tabla 3.10
Concentración letal media (CL₅₀) de los extractos metanólicos y acuosos en larvas de *Artemia salina*.

Especie	Extractos metanólicos		Extractos acuosos	
	CL ₅₀ (µg/mL)	LC 95 % (µg/mL)	CL ₅₀ (µg/mL)	LC 95 % (µg/mL)
<i>Argemone mexicana</i>	>1,000	ND	258.2	195.5 – 331.0
<i>Lippia graveolens</i>	141.9	54.4 – 374.5	2,106.2	972.0 – 13,343.
<i>Marrubium vulgare</i>	1,576.2	802.0 – 6,707	258.7	190.0 – 355.0
<i>Matricaria recutita</i>	1,993.1	958.0 – 24,284	268.7	183.0 – 415.0
<i>Ruta graveolens</i>	38.2	24.6 – 56.0	10.0	5.9 – 14.0
<i>Thymus vulgaris</i>	2,645.8	1,201 – 26,640	450.2	280.7 – 868.0

CL₅₀, concentración letal media; LC 95%, límites de confianza al 95%

ND, no determinada

Tabla 3.11

Concentración letal media (CL_{50}) de las fracciones de los extractos en larvas de *Artemia salina*.

	hexánicos		acetato de etilo		butanólicos	
	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	LC 95 % ($\mu\text{g/mL}$)	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	LC 95 % ($\mu\text{g/mL}$)	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	LC 95 % ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Matricaria recutita</i>	131.3	84.9-204.6	387.8	254.3-564.3	33.8	23.6-45.7
<i>Ruta graveolens</i>	11.8	7.3 – 16.4	11.6	6.7 – 16.6	31.6	21.0-47.5

CL_{50} , concentración letal media; LC 95%, límites de confianza al 95%

ND, no determinada

3.7 Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos.

En la Tabla 3.12 se presentan los resultados obtenidos del análisis fitoquímico

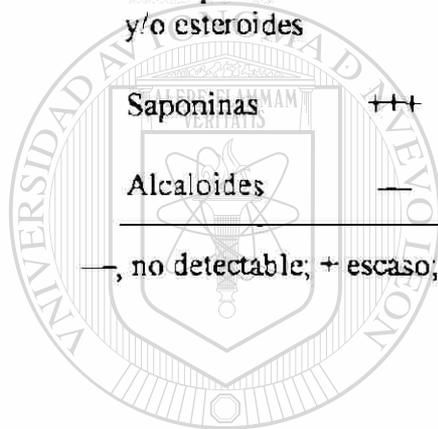
cualitativo de los extractos.

Tabla 3.12

Principales grupos fitoquímicos presentes en los extractos de las plantas en estudio

	<i>Argemone mexicana</i>	<i>Lippia graveolens</i>	<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
Flavonoides	+	++	++	+	+	+
Cumarinas y/o sesquiterpenos	+	+	+	+	+	+
Compuestos fenólicos	+	++	+	+	+	+
Triterpenos y/o esteroides	+	+	+	+	+	+
Saponinas	+++	+	—	—	—	—
Alcaloides	—	—	—	—	—	—

—, no detectable; + escaso; ++ moderado; +++, abundante



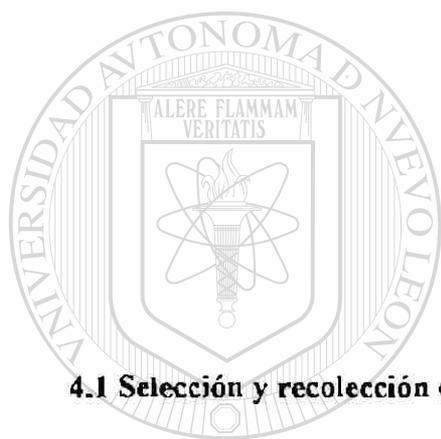
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Capítulo 4



DISCUSIÓN

4.1 Selección y recolección del material vegetal

En este estudio se evaluaron los extractos de seis plantas de uso común en la medicina tradicional para el tratamiento de algunos síntomas gastrointestinales. Tres plantas silvestres: *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, y tres plantas cultivadas: *Matricaria recutita*, *Ruta graveolens* y *Thymus vulgaris*.

La búsqueda bibliográfica en la base de datos Medline del National Library of Medicine de los Estados Unidos de América para realizar este trabajo, puso en evidencia que algunos géneros son ampliamente citados en la literatura, como es el caso de la

Matricaria, *Ruta* y *Thymus*. En cambio, el marco referencial disponible para los géneros *Argemone* y *Lippia* es escaso.

Es necesario destacar que la taxonomía de las plantas seleccionadas correspondieron a especies bien identificadas y fueron reconocidas para su uso medicinal por los pobladores del sitio de recolección. Esto coincide además con las monografías que sobre cada planta hay descritas en la literatura (Wren, 1984; Trease y Evans, 1991).

Entrevistas etnofarmacológicas previas a este trabajo, mostraron que las plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de síntomas gastrointestinales tipo cólico son de uso común en nuestro medio. El conocimiento es transmitido de generación en generación, sin embargo la transmisión del conocimiento se encuentra amenazada por el gran desarrollo de la medicina occidental (Fabricant y Farnsworth, 2001) y por la apatía de los pobladores en perpetuar las tradiciones.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

De las 15 plantas medicinales documentadas para el uso del tratamiento de síntomas gastrointestinales, seis fueron las más comunes, sin embargo no existe una planta que sea utilizada exclusivamente para las enfermedades gastrointestinales, más bien existe diversidad en el uso. Tres especies son de origen silvestre, y frecuentemente se recolectan enteras, por lo que pueden desaparecer como resultado de la sobreexplotación o destrucción de su hábitat (Caniago, 1998).

Acercas de la recolección de las plantas cultivadas, el propietario del predio no aportó información acerca del uso de agroquímicos en el cultivo, por lo que existe la posibilidad de que el material vegetal pudo haber estado contaminado con sustancias químicas que pudieran haber influido en el resultado de la actividad biológica.

El proceso de secado de las especies colectadas dio un rendimiento que fluctuó entre 6.2 y 16.6 % (Tabla 4.3) que para fines prácticos se considera aceptable para el proceso de maceración.

Los resultados de este trabajo demuestran que si bien es cierto que se estudiaron algunas plantas ampliamente citadas en la literatura como es el caso de la *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris*, en otras plantas existe escaso marco referencial como es el caso de *Argemone mexicana* y *Lippia graveolens*.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.2 Extracción del material vegetal

En este estudio se realizó la extracción de los principios activos con metanol a temperatura ambiente por su capacidad de extraer un mayor número de componentes en un solo evento, tanto los polares como los no polares. Además, el metanol es un solvente ampliamente utilizado en la obtención de extractos para la valoración de la actividad biológica en general y de la actividad antiespasmódica de las plantas (Bringmann y cols., 2002; Pironi y cols., 2000, Gilani y cols, 2000).

El residuo vegetal de la extracción metanólica de cada planta se sometió al proceso de extracción acuosa caliente para obtener los constituyentes más polares no extraídos con el metanol. Este procedimiento se llevó a cabo por el hecho de que las personas extraen los principios activos presentes en las partes de la planta por medio de la decocción e ingieren los extractos en forma de infusión. La extracción acuosa se convierte en un método útil en la valoración de la actividad biológica en general y de la actividad antiespasmódica en particular (Kamgang y cols., 2001; Tanira y cols., 1996).

4.3 Actividad antiespasmódica.

Aún no se ha establecido una base científica para comprobar la actividad antiespasmódica de la mayoría de las plantas utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de los síntomas gastrointestinales como la dispepsia, cólicos intestinales, ulcera péptica, náusea, vómito, constipación y diarrea (Williamson y cols., 1996).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La investigación de este trabajo se centró en el estudio de la actividad antiespasmódica de los extractos metanólicos y acuosos de las plantas que fueron previamente seleccionadas. Se escogió un modelo farmacológico *in vitro* con intestino de cobayo, descrito ampliamente para reproducir algunas de las características de la vía de administración oral con fines de estudiar las propiedades espasmolíticas (Hernández Romero y cols., 2004; Astudillo y cols., Lima y cols., 2000).

El intestino es sensible a los compuestos xenobióticos ingeridos vía oral dentro de los cuales se incluyen los fármacos y los productos naturales, por otro lado la selección del modelo experimental es un criterio importante para la caracterización farmacológica (Liu y cols., 1999, Claeson y cols., 1991; Edinburgh University Staff, 1970).

Las plantas pueden producir el efecto antiespasmódico por diferentes mecanismos, aunque es posible que pueda haber una combinación de los mismos (Abyssique y cols., 1999; Lis-Balchin y Hart, 1999).

Por naturaleza intrínseca, el ileon de cobayo mantiene una baja contracción espontánea la cual es posible aumentar con diversos espasmógenos, entre otros acetilcolina a dosis conveniente. En el diseño de este trabajo experimental se eligió como espasmógeno la acetilcolina por considerarla como el principal mensajero químico estimulante de la contracción del intestino (Seitz y cols., 1997). Además, la acetilcolina es capaz de modular la actividad de sus propias terminales colinérgicas y su respuesta puede tener valor para la posible aplicación terapéutica en la regulación de la motilidad del intestino (Marcoli y cols., 2000).

4.3.1 Preparación del ensayo de la actividad antiespasmódica in vitro

Fue necesario adecuar el ensayo de contracción-relajación a las condiciones de trabajo sin extracto, es por ello que el modelo experimental fue probado con atropina

(inicialmente obtenida de la planta *Atropa belladonna*). Una de las principales propiedades farmacológicas de la atropina es la de antagonizar los receptores muscarínicos, siendo su efecto principal en el intestino delgado la relajación (Hardman y cols., 2003)

La atropina es el fármaco más potente del grupo de los compuestos antiespasmódicos indicados para el tratamiento del cólico intestinal (Hardman y cols., 2003). En la adecuación del ensayo, se demostró que en presencia de atropina la acetilcolina produjo una respuesta dependiente de la concentración, lo que indicó que la atropina inhibió la acción de la acetilcolina. Los datos de este comportamiento se indican en la Tabla 3.5.

Una vez que se adicionó la atropina a la preparación, se encontró una posible mayor afinidad que la de la acetilcolina, por lo que la recuperación de la preparación fue muy lenta, a dosis mayor de 1×10^{-3} M el tejido se paralizó sin recuperación. Se verificó la acción antiespasmódica con papaverina y butilioscina solamente con fines de adecuación del modelo con magnífica respuesta.

Durante los ensayos de preparación para el modelo experimental, no hubo cambios significativos en el íleon tratado con los solventes, agua o solvente orgánico en ausencia del extracto.

4.4 Actividad antiespasmódica de los extractos metanólicos

En este trabajo, los principios activos presentes en los extractos metanólicos de todas las especies estudiadas actuaron sobre el ileon aislado de cobayo, produciendo una inhibición de la contracción dependiente de la concentración (0.1 – 10 µg/mL).

Para calificar la escala de potencia de la relajación de los resultados de este estudio, se tomó la referencia de Rojas-Vera y colaboradores (2002) que al estudiar la actividad relajante del extracto de hojas de *Rubus idaeus* obtuvieron respuesta fuerte, moderada y pequeña con relajación mayor de 80 %, 70 % y menor de 15 % respectivamente.

Se pudo comprobar que de los seis extractos probados, el de *Matricaria recutita* mostró una mayor respuesta de relajación (82.3 %) a concentración de 10 µg/mL. El extracto de *Ruta graveolens* a la misma concentración, presentó una respuesta moderada (70.4 %). Entre ambos extractos la diferencia fue de aproximadamente 12.0 % (Tabla 4.6).

Los extractos de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare* y *Thymus vulgaris* mostraron una respuesta pobre de relajación a la máxima concentración de los extractos. La diferencia de la respuesta entre ellas con 10 µg/mL fue menor en un 40% con respecto a la extractos de *Matricaria recutita*.

Se compararon las medias de la respuesta de relajación del extracto de *Matricaria recutita* (el más activo) con el resto de los extractos en estudio por medio de un análisis de varianza (ANOVA); se encontró una menor respuesta con una diferencia significativa ($p < 0.05$) de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare* y *Thymus vulgaris*. En el caso de *Ruta graveolens* no hubo diferencia estadística con respecto al extracto de *Matricaria recutita*

Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que el extracto de *Matricaria recutita* fue el que presentó mayor actividad relajante, coincide esto con los resultados obtenidos por Forster y colaboradores (1980) y Achterrath-Tuckerman y colaboradores (1980), que reportan una respuesta de relajación de 85 %.

En este estudio, los extractos metanólicos de *Thymus vulgaris* también utilizado en medicina tradicional como antitusivo, produjeron relajación de aproximadamente 40 %, repuesta que se considera baja. Este dato resultó similar al que obtuvieron en 1983 van den Broucke y Lemli en Bélgica cuando analizaron los extractos de esta misma especie en íleon y en tráquea de cobayo; ellos reportaron que los principios activos, no fueron capaces de relajar el músculo liso en el íleon, pero en cambio observaron relajación del músculo liso de la tráquea.

En la Figura 1, se muestran las curvas de la concentración-respuesta del efecto de los extractos metanólicos sobre el íleon de cobayo, en las que se observó que los

extractos de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* presentaron mayor actividad de relajación. En ambos extractos, las curvas muestran una respuesta de relajación paralela a 2.5 µg/mL, aunque el extracto de *Ruta graveolens* muestra desplazamiento a la derecha con menor potencia.

Los extractos metanólicos de las plantas fueron capaces de relajar el músculo liso de intestino a diferentes concentraciones, este efecto fue reversible en todos los casos después de lavar el tejido. No sabemos su mecanismo de acción, pero al menos determinamos que los extractos contienen principios activos inhibidores de la contracción inducida con acetilcolina.

Puede ser que uno o más de los principios activos presentes en los extractos sean los responsables del efecto relajante tal y como Gilani y colaboradores (2004) han concluido. En ese mismo sentido, estudios *in vitro* realizados por Acherrath-Tuckerman y colaboradores (1980) en extracto de manzanilla, concluyeron que el efecto antiespasmódico *in vitro* se debe a los múltiples constituyentes de los extractos, que al aislarlos e identificarlos determinaron que en especial el α -bisabolol tiene un efecto espasmolítico comparable a la papaverina, y los óxidos de α -bisabolol tienen la mitad de esta potencia.

La fuerte actividad antiespasmódica *in vitro* de los extractos de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* apoyan farmacológicamente su uso en medicina popular en el

tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Aunque se han reportado diversos estudios clínicos para *Matricaria recutita* (Tschiersch y Holz, 1993; Krivenko y cols., 1989) no hay suficientes datos clínicos con el uso de *Ruta graveolens* para los padecimientos gastrointestinales.

La baja respuesta de relajación de los extractos (0.1 - 10 µg/mL) de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare* y *Thymus vulgaris* no aportan datos farmacológicos que apoyen el uso de estas especies en el tratamiento de los padecimientos gastrointestinales.

4.5 Actividad antiespasmódica de los extractos acuosos

Al igual que los extractos metanólicos, los extractos acuosos actuaron sobre el íleon aislado de cobayo, produciendo una inhibición de la contracción dependiente de la concentración (0.1 - 10 µg/mL). El extracto de *Ruta graveolens* presentó la máxima respuesta de todos los que se evaluaron con una relajación moderada de 61.8 %. La magnitud de la respuesta de los extractos acuosos sobre el íleon de cobayo fue menor en 20 % a la que se observó en los extractos metanólicos. En el análisis estadístico se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) al comparar el extracto de *Ruta graveolens* con los extractos de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris*.

En la literatura consultada no se encontraron suficientes reportes para discutir la actividad antiespasmódica de los extractos acuosos. En 1985, Noamesi y colaboradores corroboraron las propiedades relajantes (antiespasmódicas) del extracto acuoso de *Lippia multiflora* sobre el músculo liso en ratones machos, dato que no coincidió con el presente trabajo ya que la respuesta de *Lippia graveolens* también conocido como orégano mexicano fue de tan solo 46.9 % de relajación.

Los extractos de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris* fueron poco activos ya que mostraron una respuesta de relajación menor a 50 %. Esto probablemente es porque los principios activos que participan en el efecto espasmolítico quedaron retenidos en el extracto metanólico, o también pudo ocurrir una transformación de los mismos durante el proceso de decocción que hizo disminuir la actividad.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La baja respuesta de relajación de los extractos acuosos (en comparación con la buena respuesta de los extractos metanólicos y fracciones), de ninguna manera se considera desalentador, ya que la vía oral es la forma tradicional del consumo de las plantas medicinales, esto explicaría porque en las personas que ingieren la infusión de la planta los beneficios superan a los efectos adversos.

En la Figura 2 se presentan las curvas de la relación de la concentración de los extractos acuosos con la respuesta de relajación del ileon de cobayo. Como se puede

observar, el extracto de *Ruta graveolens* presentó la mayor potencia a una concentración menor de 2.5 µg/mL. Los extractos de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris* mostraron una respuesta pobre con pendientes no paralelas con meseta por debajo de los 5.0 µg/mL.

4.6 Actividad antiespasmódica de las fracciones con solventes de distinta polaridad

Los extractos relativamente polares de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* fueron los de mayor actividad antiespasmódica *in vitro*, resultaron ser 1 - 2 veces más potentes que los extractos de *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris*, por este motivo se eligieron para someterlos al fraccionamiento con solventes de distinta polaridad.

De manera similar a los extractos metanólicos y acuosos, las fracciones hexánica, etilacetato y butanólica actuaron sobre el ileon aislado de cobayo, produciendo una inhibición de la contracción dependiente de la concentración (0.1 – 10 µg/mL). La comparación de la relajación de las tres fracciones de distinta polaridad presentado en la Tabla 3.9 entre *Ruta graveolens* y *Matricaria recutita* mostró una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Llama la atención que en el ensayo farmacológico de las fracciones de distinta polaridad se encontró que las fracciones hexánica, etilacetato y butanólica de *Ruta*

graveolens a la concentración de 10 µg/mL presentaron fuerte respuesta de relajación con 79.8, 81.5 y 74.9 % respectivamente.

Si se toma en cuenta que el extracto polar de esta especie resultó con una actividad moderada de 61.8 % de relajación (Tablas 3.6 y 3.7), la actividad estuvo presente tanto en los extractos no polares como en los polares, es decir el fraccionamiento con solventes de distinta polaridad incrementó la actividad con respecto al extracto que le dio origen. Esto es difícil de explicar, particularmente porque la fracción acuosa reveló una moderada respuesta de relajación, lo que podría sugerirnos la presencia de dos diferentes tipos de componentes polares y no polares con efecto espasmolítico, similar a lo que reportaron Lozoya y colaboradores (1990) con la planta *Psidium guajava*.

En cuanto al extracto metanólico de *Matricaria recutita* resultó con fuerte respuesta de relajación (82.3 %) y únicamente la fracción de acetato de etilo (Tabla 3.9) mostró una moderada respuesta de relajación (66.7 %). Es posible que el extracto de esta planta contenga constituyentes activos que muestren combinación sinérgica y se pierda durante el fraccionamiento, como ha ocurrido en otros ensayos (Gilani y cols, 2004).

No se encontró información relevante en la literatura que indicara el comportamiento del fraccionamiento de los extractos de estas dos especies.

En la Figura 3 se presentan las curvas de la concentración-respuesta de relajación de las fracciones hexánica, etilacetato y butanólica de *Matricaria recutita* en donde se observó que la fracción de acetato de etilo presentó la mayor respuesta de relajación. La curva concentración-respuesta de la fracción de acetato de etilo se encuentra a la izquierda, lo que claramente indica una mayor potencia que las fracciones hexánica y butanólica con pendientes gráficamente paralelas entre si. La meseta que indica la máxima respuesta quedó ubicada en una concentración de 5.0 µg/mL.

En la Figura 4 se presentan las curvas de la concentración con la respuesta de relajación de las fracciones hexánica, etilacetato y butanólica de *Ruta graveolens* en donde se percibe que la fracción hexánica presenta un desplazamiento a la izquierda por sobre las fracciones de acetato de etilo y butanólica. No difiere la actividad antiespasmódica de las tres fracciones en la máxima respuesta de 10 µg/mL.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Todo parece indicar que es determinante el método de extracción para conservar o aislar los principios activos de los extractos que por características químicas sean diferentes resultando con mayor actividad para unos que otros.

Nos atrevemos a decir que esto pudiera servir de guía para aprovechar al máximo el tipo de extracto que parece caracterizar el aislamiento de sus principios de máxima actividad, por ejemplo el metanólico en el que se encontró mayor actividad de la *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens*, mientras que con los extractos acuosos el mayor efecto correspondió a *Ruta graveolens*

4.7 Actividad tóxica de los extractos y sus fracciones en larvas de *Artemia salina*

Según se ha descrito "lo natural no siempre es inocuo", esto motivó a que en este estudio se incluyera la evaluación de la actividad tóxica de los extractos por considerarla un complemento de la valoración farmacológica. La evaluación de la actividad tóxica de las plantas medicinales juega un papel importante para el establecimiento de los criterios de seguridad y efectividad promovidos por la Organización Mundial de la Salud (Kumar y Shukla, 2003).

Con el ensayo de toxicidad para larvas de *Artemia salina*, los compuestos biológicamente activos son aquellos con una concentración letal media (CL₅₀) menor a 200 µg/mL (Anderson y cols., 1991). A pesar de su simplicidad, la prueba de toxicidad con larvas de *Artemia salina* ha sido aceptada como una prueba de tamizaje estándar (McLaughlin y cols., 1998; Kinghorn y Balandrin, 1993).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el presente trabajo, se evaluó la actividad tóxica *in vitro* de los extractos metanólicos, acuosos y fracciones con solventes de distinta polaridad en larvas de *Artemia salina*. Las larvas fueron altamente sensibles a la presencia de los constituyentes de los diferentes extractos y sus fracciones (Tabla 3.9 y 3.10). El bioensayo resultó fácil de reproducir y mostró un amplio rango de letalidad media (10 - 2,646 µg/mL). La viabilidad de las larvas en el grupo control negativo fue de un 100 % y no se observaron alteraciones en la motilidad de las larvas.

Se encontró que del total de extractos sometidos a la prueba, ocho resultaron bioactivos según la estimación de la concentración letal media y diez resultaron biológicamente inactivos. Por los resultados obtenidos, la hipótesis sobre la toxicidad propuesta inicialmente, pudiera ser rechazada ya que los extractos de *Ruta graveolens* fueron altamente tóxicos en el ensayo con larvas de *Artemia salina*. Sin embargo, por la naturaleza del diseño de este estudio no se rechaza la hipótesis porque hacen falta más estudios que aporten mayor información y que están fuera del alcance de esta propuesta.

De los extractos metanólicos que resultaron bioactivos, el de más alta toxicidad fue el extracto de *Ruta graveolens* con una estimación de $CL_{50} = 38.2 \mu\text{g/mL}$ con límites de confianza de 95 %. El extracto metanólico de *Lippia graveolens* igualmente presentó una estimación de $CL_{50} = 141.9 \mu\text{g/mL}$. Los extractos metanólicos de *Argemone mexicana*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris*, resultaron

biológicamente inactivos para *Artemia salina*.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con respecto a los extractos acuosos, el extracto de *Ruta graveolens* mostró la más alta toxicidad de todos los extractos estudiados con una $CL_{50} = 10.0 \mu\text{g/mL}$. Los extractos de *Argemone mexicana*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Matricaria recutita* y *Thymus vulgaris* resultaron con una concentración letal media por encima de $200 \mu\text{g/mL}$ lo que indicó que fueron inactivos.

En la literatura científica consultada hay escasos reportes sobre la toxicidad con el ensayo de *Artemia salina* de las plantas seleccionadas en este estudio. Uno de ellos publicado por Alicia Lagarto Parra y colaboradores en el año 2001, reporta que el extracto de *Ruta graveolens* presentó una estimación de la $CL_{50} = 5.39 \mu\text{g/mL}$. Los datos del presente trabajo de investigación son similares a los que presentó el grupo de Lagarto Parra.

La evaluación de la toxicidad de las fracciones de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* resultó interesante, ya que como se observa en la Tabla 3.10, solamente la fracción de acetato de etilo de *Matricaria recutita* resultó biológicamente inactiva. Las fracciones hexánica y butanólica resultaron bioactivas para este bioensayo. Mert y Ozturk (2002) en una serie de fracciones de plantas colectadas en Turquía, coincidentemente encontraron que los extractos de acetato de etilo no mostraron actividad tóxica de manera similar a los hallazgos en este trabajo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al igual que en los extractos metanólicos y acuosos, las fracciones de *Ruta graveolens* resultaron con elevada toxicidad con estimación de CL_{50} de 11.8, 11.6 y 31.6 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones hexánica, de acetato de etilo y butanólica respectivamente.

La propiedad tóxica de las fracciones de *Matricaria recutita* se presentó únicamente en los componentes de naturaleza no polar. Al parecer la propiedad tóxica de los extractos y fracciones de *Ruta graveolens* se debe a los componentes de

naturaleza polar y no polar. La relación actividad tóxica y constituyentes no polares de este trabajo resultó consistente con otros estudios (Carballo y cols., 2000; Huang y cols., 2002).

La mayor parte de la literatura mundial describe algunos efectos adversos de *Ruta graveolens*, destacando que puede provocar sangrado uterino, aborto y fototoxicidad (Madari y Jacobs, 2004; Wren, 1994). Los resultados de toxicidad de *Ruta graveolens* encontrados en este estudio con el ensayo de *Artemia salina*, pudieran estar relacionados directamente con la información de estos efectos adversos. Recientemente se ha confirmado que las fitotoxinas de *Ruta graveolens* están asociadas a uno de sus principales constituyentes denominados furanocumarinas (Massot y cols., 2000).

4.8 Identificación fitoquímica cualitativa de los extractos

En este estudio se determinó la composición química cualitativa de los extractos con un esquema de reacciones coloridas.

En el extracto de *Argemone mexicana* se detectó la presencia de flavonoides, cumarinas y/o sesquiterpenos, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides con reacción escasa, saponinas con reacción abundante. No se detectaron alcaloides. Estudios fitoquímicos previos han reportado la presencia de compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides y alcaloides en las partes aéreas de la planta (Shaukat y cols.,

2002; Capasso y cols., 1997). Llama la atención que en el presente estudio se detectaron compuestos fenólicos, terpenos y flavonoides, mas no se detectaron alcaloides. Esto se pudiera deber a que se perdieron o inactivaron durante el proceso de extracción o bien la época de recolección no coincidió con la síntesis de estos constituyentes.

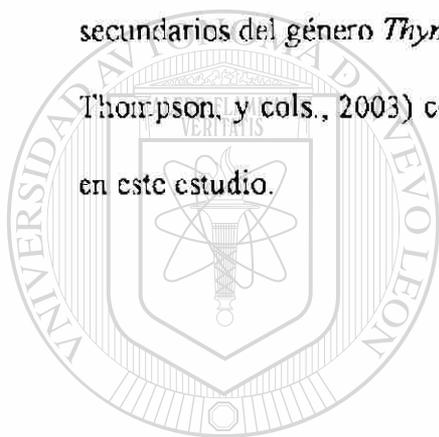
En el extracto de *Lippia graveolens* se detectó la presencia moderada de flavonoides, escasa respuesta de cumarinas y/o sesquiterpenos, triterpenos y/o esteroides y saponinas así como moderados compuestos fenólicos. No se detectaron alcaloides. El género *Lippia* con más de 52 especies, es reconocido por sus aceites esenciales carvacrol y timol (Costa y cols., 2001), pero Pascual y colaboradores (2001) reportaron compuestos fenólicos de tipo flavonoide presentes en los extractos de esas plantas de manera similar a los resultados cualitativos encontrados en este estudio.

En el extracto de *Marrubium vulgare* se detectó la moderada presencia de flavonoides, así como escasa respuesta de cumarinas y/o sesquiterpenos, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides, no se detectaron saponinas ni alcaloides.

En el extracto de *Matricaria recutita* se detectó la presencia de flavonoides, cumarinas y/o sesquiterpenos, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides, todos con escasa respuesta. En este estudio no se detectaron saponinas ni alcaloides.

En el extracto de *Ruta graveolens* se detectó escasa presencia de flavonoides, cumarinas y/o sesquiterpenos, compuestos fenólicos, triterpenos y/o esteroides. En este estudio no se detectaron saponinas ni alcaloides.

En el extracto de *Thymus vulgaris* se detectó la presencia escasa de flavonoides, cumarinas y/o sesquiterpenos, compuestos fenólicos, triterpenos, saponinas y/o esteroides, además no se detectaron alcaloides. Los más notable de los compuestos secundarios del género *Thymus* son quizá el carvacrol y el timol (Pina-Vaz y cols., 2004; Thorpson, y cols., 2003) compuestos fenólicos que cualitativamente fueron detectados en este estudio.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Los principios activos presentes en los extractos vegetales actuaron sobre el íleon aislado de cobayo produciendo inhibición dependiente de la concentración de la contracción inducida con acetilcolina. Los extractos metanólicos de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens* mostraron el mejor efecto de relajación con respuesta superior al 80 % relacionado directamente con la actividad antiespasmódica.
2. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* mostró el mejor efecto de relajación del íleon con respuesta de aproximadamente 60 %, que es considerada baja para un bioensayo *in vitro* que pudiera ser, para el uso en medicina tradicional aparentemente efectiva. Esto es importante porque una planta con toxicidad probada en este ensayo y bibliográficamente referida como planta tóxica es usada

en medicina popular. Esto pudiera indicar que tal vez los efectos tóxicos se disminuyen con la decocción.

3. Las fracciones hexánicas, de acetato de etilo y butanólicas de *Ruta graveolens* mostraron la mejor respuesta de relajación cercana al 80 %.

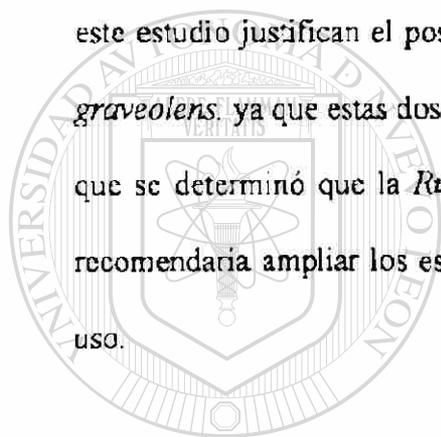
4. Los ensayos de toxicidad con el modelo de *Artemia salina* mostraron que la especie *Ruta graveolens* fue la de mayor toxicidad.

5. La especie *Ruta graveolens* mostró mayor actividad antiespasmódica y mayor toxicidad que la especie *Matricaria recutita*.

6. Los efectos antiespasmódicos de *Ruta graveolens* y *Matricaria recutita* son parcialmente consistentes con el uso de éstos en medicina popular para los desórdenes gastrointestinales.

5.2 Recomendaciones

Ante el atraso de investigación en estudios que validen el uso de los productos herbolarios, es recomendable apresurar el estudio de la actividad farmacológica, tóxica y fitoquímica de las plantas medicinales con un abordaje multidisciplinario, en principio con pruebas de tamizaje para descartar aquellas plantas sin interés y posteriormente mediante ensayos de alto rendimiento de procesamiento. Los resultados encontrados en este estudio justifican el posterior estudio farmacológico de *Matricaria recutita* y *Ruta graveolens*, ya que estas dos especies resultaron significativamente importantes. Una vez que se determinó que la *Ruta graveolens* resultó tóxica en los ensayos realizados, se recomendaría ampliar los estudios de efectividad y toxicidad de sus fracciones para su uso.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS

Abysique, A., S. Lucchini, et al. (1999). "Effects of alverine citrate on cat intestinal mechano-receptor responses to chemical and medicinal stimuli." Aliment Pharmacol Ther **13**: 561-566.

Achterrath-Tuckermann, U., R. Kunde, et al. (1980). "Investigations on the spasmolytic effect of compounds of chamomile and Kamillosan on the isolated guinea pig ileum." Planta Med **39**: 38-50.

Adame, J. and H. Adame (2000). Plantas curativas del noreste mexicano. Monterrey, México, Ediciones Castillo.

Aguilar, A., J. Camacho, et al. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, Información etnobotánica. México, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Anderson, J., C. Goetz, et al. (1991). "A blind comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumor Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens." Phytochemical Analysis **2**: 107-111.

AVMA (2001). "2000 Report of the AVMA panel on euthanasia." JAVMA **218**(5): 669-696.

Balandrin, M., A. Kinghorn, et al. (1993). Plant derived natural products in drug discovery and development Human medicinal agents from plants. A. Kinghorn and M. Balandrin. San Francisco, American Chemical Society.

Bilia, A. and A. Riva (2000). "Herbal Medicinal Products." Fitoterapia **71**: 343-345.

Bowman, W. and M. Rand (1984). Farmacología, Bases bioquímicas y patológicas, aplicaciones clínicas. México, Interamericana.

Bringmann, G., K. Messer, et al. (2002). "Dioncophylline E from *Dioncophyllum thollonii*, the first 7,3'-coupled dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid." *Phytochemistry* **60**(4): 389-397.

Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza, España, Editorial Acribia.

Campos-Navarro, R. (1997). *Nosotros los curanderos*. México, Nueva Imágen.

Capasso, R., Izzo, A., Pinto, L., Bifulco, T., Vitobello, C., Mascolo, N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* **71**: S58-S65.

Carballo, J., Z. Hernández-Inda, et al. (2002). "A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products." *BMC Biotechnology* **2**: 17-21.

Claeson, P., Anderson, R., Samuelsson, G. (1991). T-cadinol: a pharmacologically active constituent of scented myrrh: introductory pharmacological characterization and high field ¹H- and ¹³C-NMR data. *Planta Med* **57**(4): 352-6.

Corral-Terrazas, M., H. Martínez, et al. (2002). "Creencias y conocimientos de un grupo de médicos sobre el manejo de la alimentación del niño con diarrea aguda." *Salud Pública Mex* **44**: 303-314.

Costa, S., T Lemos, et al. (2001). "Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity." *J Nat Prod* **64**: 792-795.

Domínguez, X. (1988). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México, Limusa.

Drews, J. (2000). "Drug discovery: a historical perspective." *Science* **287**: 1960-1964.

Edinburgh University Staff (1970). *Pharmacological Experiments in Isolated Preparations*. 2nd edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp 2, 44, 58-62 y 71.

Elvin-Lewis, M. (2001). "Should we be concerned about herbal remedies." *J Ethnopharmacol* **75**: 141-164.

Etkin, N. (1998). "Indigenous patterns of conserving biodiversity: pharmacologic implications." J Ethnopharmacol **63**: 233-245.

Fabricant, D and N. Farnsworth (2001) "The value of plants used in traditional medicine for drug discovery." Environ Health Perspect **109**: 69-75.

Florez, J. y A. González (1999). Fármacos antagonistas muscarínicos. Farmacología Humana. J. Florez, J. Armijo and A. Mediavilla. Barcelona, Masson.

Forster, H., H. Niklas, et al. (1980). "Antispasmodic effects of some medicinal plants " Planta Med **40(4)**: 309-319.

Gilani, A. y Ghayur, M. (2004). "Pharmacological basis for the gut stimulatory activity of *Raphanus sativus* leaves " J Ethnopharmacol **95**: 169-172.

Gilani, A., N. Aziz, et al. (2000). "Ethonopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L." J Ethnopharmacol **71**: 161-167.

Guyton, A. and J. Hall (2001). Tratado de Fisiología Médica. México

Hardman, J., L. Limbird, et al. (2003). Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. México, McGraww-Hill Interamericana. pp 163-181.

Harvey, A. (1999). "Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery?" Trends Pharmacol Sci **20(5)**: 196-198.

Heinrich, M., M. Robles, et al. (1998). "Ethnopharmacology of mexican asteraceae (compositae)." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 539-565.

Hosler, D and M. Mikita (1987). "Ethnobotany: The Chemist's Source for the Identification of Useful Natural Products " J Chem Educ **64(4)**: 328-334.

Hostettmann, K., J Wolfender, et al. (1997) "Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts." Planta Med **63**: 2-10.

Huang, J., K. Nakade, et al. (2002). "Brine shrimp lethality test active constituents and new highly oxygenated seco-prezizaane-type sesquiterpenes from *Illicium merrillianum*." Chem Pharm Bull 50(1): 133-136.

Kalra, Y.P. (Ed.) 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Soil.

Kamgang, R., R. Zintchem, et al. (2001). "Effects of total aqueous of *Mallotus oppositifolium* and *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) on intestinal contractile activity of the rat." AJST 2(2): 8-11.

Kenakin, T. (1997). Pharmacologic Analysis of Drug-receptor interaction. 3rd edn. Lippincott-Raven Philadelphia, New York, pp 232-233, 335-339.

Kinghorn, A.D., Balandrin, N.F. (Eds). Human Medicinal Agents from Plants. ACS Symposium Series 534, 1993, pp. 2-12.

Krapp, K., J. Longe, et al. (2003). Enciclopedia de las Medicinas Alternativas. Barcelona, Océano.

Krivenko, V. V., G. P. Potebnia, et al. (1989). "[Experience in treating digestive organ diseases with medicinal plants]." Viach Delo(3): 76-8.

Kuklinski, C. (2003). Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, Ediciones Omega.

Kumar, S and Y. Shukla (2003). "Herbal medicine: Current Status and the Future." Asian Pacific J Cancer Prev 4: 281-288.

Lagarto-Parra, A., R. Silva-Yhebra, et al. (2001). "Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀) in mice in order to determine oral acute toxicity of plant extracts." Phytotherapy 8(5): 395-400.

Lima, C., D. Criddle, et al. (2000). "Relaxant and antispasmodic Actions of Methyl Eugenol on Guinea-Pig Isolated ileum." Planta Med 66: 408-411.

Lin, J. H., M. Chiba, et al. (1999). "Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized?" Pharmacol Rev 51(2): 135-58.

Lis-Balchin, M. and S. Hart (1999). "Studies on the mode of action of peppermint oil *Mentha x piperita* L. in the guinea pig ileum *in vitro*." Med Sci Res 27: 307-309.
Tomado de resumen en Medline.

Lozoya, X., G. Becerril, et al. (1990). "Model of intraluminal perfusion of the guinea pig ileum *in vitro* in the study of the antidiarrheal of the guava (*Psidium guajava*)." Arch Invest Med (Mex) 21(2): 155-62.

Madari, H. and R. Jacobs (2004). "an analysis of cytotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as abortifacients." J Nat Prod 67: 1204-1210.

Maldonado-García, R. (1985). Los productos de las plantas. Una visión integral. Saltillo, México, CIQA

Marcoli, M., Scarrone, S., Maura, G., Bonanno, G., Raiteri, M. (2000). "A subtype of the γ -aminobutyric acid receptor regulates cholinergic twitch response in the guinea pig ileum." J Pharmacol Exp Ther. 293: 42-47.

Massot, B., S. Milesi, et al. (2000). "Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*." Plant Cell Tissue and Organ Culture 62: 11-19.

Mata, R., J. Rivero-Cruz, et al. (1999). Bioactive natural products of medicinal and agrochemical interest from selected mexican medicinal plants. Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas. K. Hostettmann, M. Gupta and A. Marston, Harwood Academic: 161-206.

Mata, R., A. Rojas, et al. (1997). "Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*." Planta Med 63(1): 31-5.

McLaughlin, J. L., L. Lingling, et al. (1998). "The use of biological assays to evaluate botanicals." Drug Inform J 32: 513-524.

Mert, B. and H. Ozturk (2002). "antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts." Turk J Biol 26: 197-200.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.F., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med 45, 31-34

Nisbet, L. and M. Moore (1997). "Will natural products remain an important source of drug research for the future?" Curr Opin Biotech 8: 708-712.

Noamesi, B. K., G. I. Adebayo, et al. (1985). "Muscle relaxant properties of aqueous extract of *Lippia multiflora*." Planta Med (3): 253-5.

Pascual, M. E., K. Slowing, et al. (2001). "Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review." J Ethnopharmacol 76(3): 201-14.

Phillipson, J. (2001). "Phytochemistry and medicinal plants." Phytochemistry 56: 237-242.

Pieroni, A., P. Pachaly, et al. (2000). "Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae)." J Ethnopharmacol 70(3): 213-7.

Pina-Vaz, C., A. Goncalvez-Rodriguez, et al. (2004). "Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds." JEADV 18: 73-78.

Plotkin, M. (2001). "Global Phytochemistry : the ethnobotanist view." Phytochemistry 56: 117-120.

Rakman, A., M. Choudhary, et al. (2001). Bioassay techniques for drug development. San Diego, USA, Harwood Academic.

Rates, S. (2001). "Plants as source of drugs." Toxicon 39: 603-613.

Rojas, A., M. Bah, et al. (2000). "Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *gentiana spathacea*." Planta Med 66(8): 765-7.

Rojas-Vera, J., A. Patel, et al. (2002). "Relaxant activity of Raspberry (*Rubus idacus*) leaf extract in guinea pig ileum in vitro " Phytother Res 16: 665-668.

Sarna, S. (1998). "In vivo signal transduction pathways to stimulate phasic contractions in normal and inflamed ileum." Am J Physiol 274. C618-C625.

Shaukat, S., I. Siddiqui, et al. (2002). "Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed." Plant Soil 245: 239-247.

Seitz, U., A. Ameri, et al. (1997). "Relaxation of evoked contractile activity of isolated guinea pig ileum by (\pm)-kavain." Pflanzl Med 63: 303-306.

Tanira, M. O., B. H. Ali, et al. (1996). "Evaluation of the relaxant activity of some United Arab Emirates plants on intestinal smooth muscle." J Pharm Pharmacol 48(5): 545-50.

Thomas, E., P. Bertrand, et al. (1999). "Genesis and role of coordinated firing in a feedforward network: a model study of the enteric nervous system." Neuroscience 93(4): 1525-1537.

Thompson, J., J. Chalchat, et al. (2003). "Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes." J Chem Ecol 29(4): 859-880.

Trease, G. and W. Evans (1991). Farmacognosia. México, Interamericana McGraw-Hill.

Tschiersch, K. and J. Holzl (1993). "[Absorption and excretion of apigenin, apigenin-7-glycoside and herniarin after oral administration of extracts of *Matricaria recutita* (L.) (syn. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert)]." Pharmazie 48(7): 554-5.

Turner RA (1965). Screening methods in pharmacology. Acad. Press, New York.

Van Den Broucke, C. and J. Lemli (1983). "Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*." Pharm Weekbl Sci 5: 9-14.

Wallis, R.M. (1995). Preclinical and clinical pharmacology of selective muscarinic M₃ receptor antagonists. Life Sci 56 (11/12): 861-868.

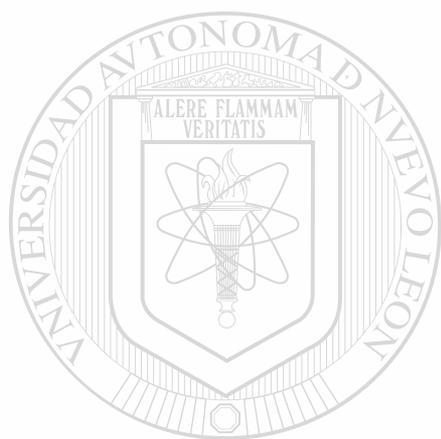
Weimann C, Goransson U, et al. (2002). "Spasmolytic effects of *baccharis conferta* and some of its constituents." J Pharm Pharmacol 54(1): 99-104.

WHO (1992). Quality control methods for medicinal plants materials. Geneva, World Health Organization.

Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ (1996). Pharmacological Methods in Phytotherapy Research, Wiley and Sons.

Wren, R. (1994). Nueva Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos México, Editorial Grijalbo.

Zolla, C. (1980). "Traditional medicine in Latin America, with particular reference to México." J Ethnopharmacol 2(1): 37-51.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

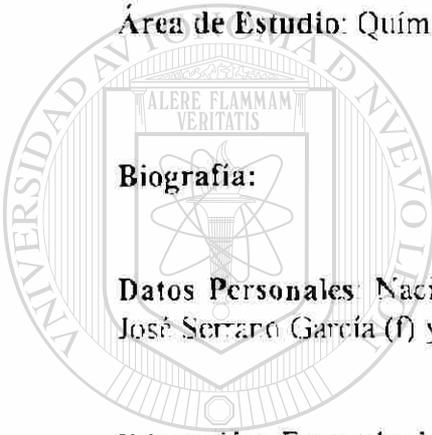
Luis Benjamín Serrano Gallardo

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación Terminal en Química Biomédica

**Tesis: ACTIVIDAD ANTIESPASMÓDICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES EN PREPARACIONES DE ÍLEON DE COBAYO**

Área de Estudio: Química Biomédica



Biografía:

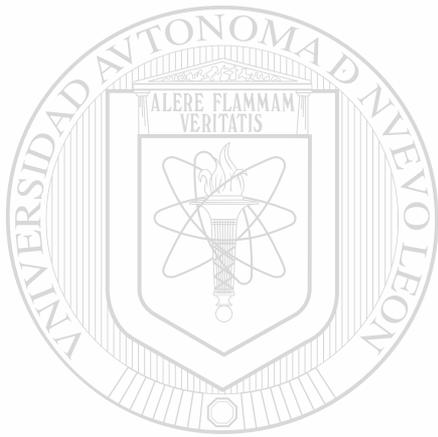
Datos Personales: Nacido en Gómez Palacio, Durango el 4 de Julio de 1956, hijo de José Serrano García (f) y Alicia Gallardo Acosta.

Educación: Egresado de la Licenciatura de Químico Farmacobiólogo en la Universidad Autónoma de Coahuila en 1979. Egresado de la Maestría en Reproducción Animal en la Universidad Agraria Antonio Narro en 1987.

Experiencia Profesional: Ocho años como analista en el área de Análisis Clínicos en el laboratorio del Centro Médico de Torreón. Jefe del Departamento de Análisis Clínicos y Banco de Sangre del hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Coahuila de 1992 a 1998. Jefe del Departamento de Bioquímica y Profesor de tiempo completo Titular A en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila en la ciudad de Torreón, Coahuila desde el año 2003. Profesor de Bioquímica Clínica en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango en la ciudad de Gómez Palacio, Durango.

Publicaciones: Diez publicaciones en revistas nacionales arbitradas.

Reconocimientos: Mejor promedio en calificaciones del programa de Maestrías en la Universidad Agraria Antonio Narro ciclo 1995-1997. Reconocimiento a la investigación como mejor trabajo de Tesis de la Maestría en Reproducción Animal en la Universidad Agraria Antonio Narro.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



