

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

VALORACION DE AMMOIDIN, COMO PRINCIPIO
ACTIVO, EN TABLETAS, TINTURA Y POMADA

166

T E S I S

QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A

ADOLFO GALICIA ANAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS. TESIS
AÑO 1976
FECHA
ROC ME-168

JURADO ASIGNADO OFICIALMENTE SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE : PROF . RAMON ULACIA ESTEVE .
VOCAL : PROF . ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES .
SECRETARIO : PROF . HECTOR JARA FARJEAT .
1er . SUPLENTE : PROF . MARIO MIRANDA CASTRO .
2o . SUPLENTE : PROF . MIGUEL A . CEVALLOS LEAL .

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

PRODUCTOS FARMACEUTICOS , S.A.
"CHINOIN"

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE :

Adolfo Galicia Anaya .

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Adolfo Galicia Anaya', written over a large, faint circular stamp or watermark.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR :

Q.F.B. Héctor Jara Farjeat .

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Héctor Jara Farjeat', written over a large, faint circular stamp or watermark.

A MIS PADRES CON CARÍÑO

Y GRATITUD .

A MIS HERMANOS Y AMIGOS

COMO UN ESTIMULO

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

II.- GENERALIDADES:

II A.- VITILIGO.

- 1.- Definición.
- 2.- Historia.
- 3.- Clasificación.
- 4.- Posibles factores en la extensión de vitiligo.
- 5.- Incidencia.

II B.- AMMOIDIN

- 1.- Obtención :
 - a).- Extracción
 - b).- Síntesis.

- 2.- Monografía del ammoidin:

- Nombre químico
- Sinónimos
- Fórmula condensada
- Fórmula desarrollada
- Peso molecular
- Descripción
- Solubilidad
- Identidad
- Punto de fusión
- Pérdida al secado
- Cenizas sulfatadas
- Metales pesados
- Absorción al ultravioleta

Absorción al infra - rojo
Métodos de valoración

3.- Farmacología :

1).- ACTIVIDAD FARMACOLOGICA.

- a).- Acción fotosensibilizante en la piel vitiliginosa.
- b).- Aumento de la capacidad de bronceamiento de la piel.
- c).- Aumento de la tolerancia a la luz solar y disminución de quemaduras en la piel.

2).- MECANISMO DE ACCION.

- a).- El Ammoidin y su actividad fotosensibilizante en la piel.
- b).- Fotoreactividad del Ammoidin con DNA natural y su correlación con su actividad fotosensibilizante.
- c).- Mecanismo de fotosensibilización en la piel y orden de reacción.
- d).- Estudios sobre las reacciones de Foto-C - cicloadición entre Furocumarinas Fotosensibilizantes de la piel y ac. nucléicos.

3).- INTERACCION DE FARMACOS.

4).- TOXICIDAD.

III.- PARTE EXPERIMENTAL:

III A.- MATERIAL.

III B.- METODO:

1.- SISTEMA UNIDIMENSIONAL ASCENDENTE.

- a).- Método de Valoración en Principio Activo.
- b).- Método de Valoración para Tabletas .
- c).- Método de Valoración para Tintura.
- d).- Método de Valoración para Pomada.

IV.- RESULTADOS Y ESTUDIO ESTADISTICO .

V.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

I.- INTRODUCCION.

El Ammoidin es una sustancia aislada de los extractos del Ammi-majus, planta herbácea anual que crece libremente y en abundancia en la región Delta del Nilo, aunque se encuentra repartida por casi todos los países de clima cálido.

Las propiedades fotosensibilizantes en la piel del Ammi-majus, son conocidas desde la antigüedad. El Bittar publica en el siglo XIII las propiedades terapéuticas del polvo de esta planta empleado ya en todo el norte de África para el tratamiento de leucoderma. En el siglo XVII Dawood El Antaki, - confirma las propiedades de la planta en los extractos de ella. Fué en 1947 - cuando I.R. Famly y Hamed Abu-Shady, logran aislar de los frutos del Ammi-majus los derivados del Psoralen, el Ammoidin (Xantotoxina; 8-metoxi-Psoralen), el Ammidin (Imperatorina; Dimetil-etano-2-metoxi-Psoralen), y el Bergapten (5-metoxi-Psoralen), que pertenecen, incluyendo al mismo Psoralen - al grupo químico de las Furocumarinas. A partir de esa fecha son publicados por diversos autores, trabajos sobre la separación, purificación, identificación cuantificación, farmacología y la clínica terapéutica de estas sustancias.

Tomando como base los resultados empíricos con los extractos y el polvo de Ammi-majus, se han realizado trabajos administrando Ammoidin, por vía oral y tópica, con sustancia pura y en combinación con los otros derivados del Psoralen (Imperatorina o Bergapten), observándose que la presencia simultánea de Ammoidin y Bergapten, produce un aumento de la actividad fotosensibilizante en la piel (Sinergismo), originando eritema y aún edema en la piel, los cuales pueden considerarse como efectos tóxicos.

La presente tesis, tiene como objeto (considerando el aumento de esta actividad fotosensibilizante), la identificación, separación y valoración del Ammoidin y de posibles impurezas, en el principio activo y en las formas farmacéuticas tabletas, tintura y pomada.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento al DR. JOSE KUTHY-PORTER Gerente General de los LABORATORIOS PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A. CHINOIN* por las facilidades brindadas dentro del Laboratorio para el desarrollo del presente estudio, así como el interés por el mismo del ING. ERIC HAGSATER GARTENBERG.

De la misma manera agradezco al SR. QFB. HECTOR JESUS JARAFARJEAT por su acertada asesoría, al SR. QFB. JOSE LUIS IBARMEA AVILA, por su apreciable ayuda, a la PROFRA. QFB. ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES por su estímulo y apoyo, al PROFR. QFB. RAMON ULACIA ESTEVE-

por sus valiosos y atinados consejos que hicieron posible la realización de este estudio y término del mismo; y a todos aquellos quienes han hecho posible y - contribuido de alguna manera al logro de mi formación humana y profesional.

II.- GENERALIDADES.

II A.- VITILIGO.

1.- DEFINICION.

El término Vitiligo, que por mucho tiempo, ha sido usado incorrectamente para indicar los diferentes tipos de leucoderma, se restringió su uso — para indicar al Leucomelanoderma de origen idiopático. Sus características — esenciales son, un pedazo de piel blanca con hiperpigmentación en la periferia. En algunos casos la función pilomotor y las glándulas sebáceas son afectadas, y por consiguiente es común encontrar bello sobre las manchas blancas.

Las lesiones tienen topografía y tamaño variable, se encuentran — principalmente en la cara, cuello, antebrazos, dorso de las manos y en órganos genitales externos. Raramente se observan manchas blancas en las palmas de las manos y plantas de los pies, la distribución de las manchas es segmentada a menudo, bilateral y casi simetral.

2.- HISTORIA.

Vitiligo, uno de los problemas dermatológicos más comunes, es una

enfermedad de tiempo inmemorial. La información más antigua data del inicio de los escritos acerca de la Medicina Faraónica en el Ebers Papyrus (1), donde se describen 2 tipos de enfermedades que afectan el color de la piel. - Uno donde hubo destrucción de tejidos, posiblemente lepra, el otro, el cual - fué probablemente vitiligo.

En el libro sagrado de la India, Atharva Veda, el cual data de - - 1400 A.C., se encontró mencionado un mal conocido como "Shwetakustha", - que posiblemente fué vitiligo (2).

El término "vitiligo" deriva del latín vitelius, que significa "becerro", fué usado primero por el físico romano Celsus en la segunda centuria D. C.; las áreas blancas características de la enfermedad se parecen a las manchas blancas de un becerro manchado (4).

3.- CLASIFICACION.

De acuerdo al grado de áreas involucradas, el vitiligo ha sido clasificado en 3 tipos :

- 1.- Vitiligo localizado
- 2.- Vitiligo generalizado
- 3.- Vitiligo universal

En el vitiligo localizado; la depigmentación de la piel y/o el cabello se restringe a una región, tal como el cuero cabelludo, área genital, --

área perineal, o un lado de la cara; la nuca es uno de los sitios favoritos para las lesiones localizadas. La configuración de las lesiones puede ser lineal y ocasionalmente parece seguir el modelo de un dermatoma.

En el vitiligo generalizado; las manchas depigmentadas se extienden por todas las áreas, cara, nuca, cabello, extremidades, pliegues del cuerpo, orificios externos, ombligo, membranas mucosas y genitales. En algunos casos, la distribución puede simular a aquella de las áreas del mal de Addison previamente reportada por Lerner (5). En el vitiligo generalizado ampliamente extendido, puede ser difícil saber cual es la pigmentación normal de la piel del paciente.

En el vitiligo universal, la superficie cutánea entera está depigmentada. Pequeñas manchas hiperpigmentadas aparecen en la piel, como respuesta a la imposibilidad de exposición al sol. Este vitiligo universal puede confundirse con el albinismo, excepto por la existencia de pigmento en los ojos y cabello.

4.- POSIBLES FACTORES EN LA EXTENSION DE VITILIGO.

En vitiligo, la depigmentación tiende a progresar con el aumento en la duración de la enfermedad. En algunos casos, la enfermedad puede progresar muy lentamente y la depigmentación puede permanecer localizada en un área por un período largo antes de que otras manchas aparezcan. Por

otra parte en algunos casos de vitiligo la extensión de la depigmentación puede ser tan rápida que las áreas anchas del integumento llegan a ser involucradas en pocas semanas.

Muchos autores se inclinaron a establecer que la rápida extensión de vitiligo se debía a un choque emocional o a una tensión nerviosa continua. También las reacciones graves de quemaduras de luz solar pueden ser un factor precipitante en el desarrollo o extensión de algunos casos.

5.- INCIDENCIA.

Un número de estudios han sido realizados para determinar la incidencia de vitiligo en diferentes partes del mundo, con estimaciones con un rango de 0.14 a 3.2%. Es probablemente seguro establecer que la muy amplia incidencia mundial de vitiligo es aproximadamente de 1% (6). En Egipto es aproximadamente de 1%; en Suiza se reportó que es de aproximadamente 0.39%; en Rusia es de 0.14%; en Londres 0.24% y en Japón es de 1.64 % (7); en los Estados Unidos se reportó que es aproximadamente de 1%, en la India, la incidencia se piensa que es de 3% (5).

II B.- AMMOIDIN.

1.- OBTENCION.

El Ammoidin se puede obtener por :

a).- Extracción de plantas naturales.

b).- Síntesis.

a).- Extracción :

Industrialmente, el Ammoidin se obtiene del Ammi majus Linn (Um_ belliferae), encontrándose en concentraciones de aproximadamente 1% en sus frutos. Pero se encuentra también en las siguientes fuentes naturales (8).

FUENTE NATURAL	NOMBRE COMUN	FAMILIA
Angelica archangelica	Engelwurz	Umbelliferae
Pastinaca sativa	Garden parsnip	Umbelliferae
Ficus carica	Fig	Moraceae
Ruta chalepensis		Rutaceae
Fagara xanthoxyloides		Rutaceae
Ruta montana		Rutaceae
Aegle marmelos	Bel	Rutaceae
Ruta graveolens	Rue	Rutaceae
Luvanga scandens	Lavanga	Rutaceae
Xanthoxylum flavun	West indian	Rutaceae
Ruta bracteosa	Satin wood	Rutaceae

Se puede extraer de las diversas partes de la planta, tallo, hojas, - fruto, raíz, dependiendo de la especie y lugar en donde se cultiven, ya que - se encuentran distribuidas por todos los países.

El proceso de extracción se puede reducir en los siguientes pasos :

- 1.- Recolección de la planta y selección de las partes de ella.
- 2.- Secado.
- 3.- Machacado o triturado.

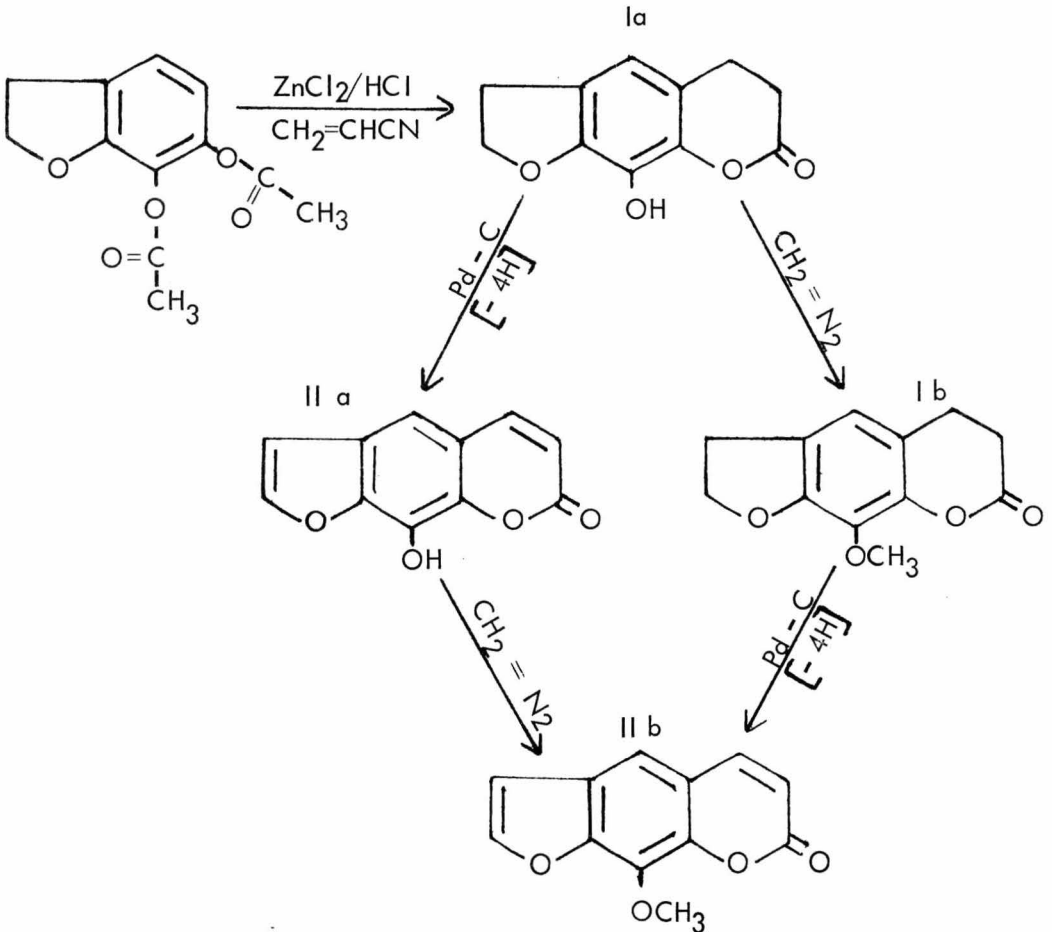
4.- Extracción propiamente dicha.

5.- Purificación.

6.- Cristalización.

b).- Síntesis :

El Ammoidin (Xantotoxina), ha sido sintetizado por varios investigadores (9). Dilip K. Chatterjee y Kalyanmay Sen (10), reportan una nueva síntesis por su método general, la cual parte del pirogalol. Las reacciones — que se efectúan se muestran a continuación :



El 6-7 Diacetoxi-2, 3-Dihidrobenzofurano, fué condensado con - - Acilonitrilo usando $ZnCl_2$ anhidro y HCl como agente condensante para producir el 2,3,5,6,-Tetrahidroxantotoxol Ia (66%). Este producto Ia fué deshidrogenado con Carbón-Paladio en Oxido de Difenilo (Eter de Fenilo) hirviendo para producir Xantotoxol IIa, posteriormente este producto IIa se metila - - con Diazometano para obtener el Ammoidin (Xantotoxina) IIb.

Por otra parte, el producto Ia se metila con Diazometano a 2,3,5,6-Tetrahidroxantotoxina Ib, este producto Ib en deshidrogenación con Carbón-Paladio en Oxido de Difenilo hirviendo se transforma en el Ammoidin (Xantotoxina) IIb, el cual fué purificado a P.F. $146^{\circ}C$ (Benzeno-Eter de Petróleo) (45%) (Lit. 9a.) (P. F. $146^{\circ}C$).

2.- MONOGRAFIA DEL AMMOIDIN.

NOMBRE QUIMICO :

Delta-Lactona del Acido 6-Hidroxi-7-Metoxi-5-Benzofurana-crílico.

9-Metoxi-7 H-Furo (3,2-g) (1) Benzopirano-7-ona.

SINONIMOS:

Metoxalen

8-Metoxipsoralen

Xantotoxina

8 Metoxi-4', 5' : 6,7-Furocumarina.

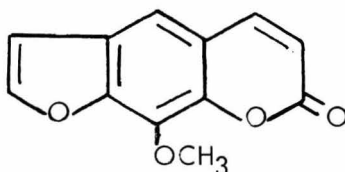
8 Metoxi (Furano-3', 2': 6,7-Cumarina).

8-MOP

8-MP

FORMULA CONDENSADA : $C_{12}H_8O_4$

FORMULA DESARROLLADA :



PESO MOLECULAR : 216.195

DESCRIPCION :

El Ammoidin es una sustancia que se presenta en forma de pequeños cristales alargados, de color blanco con sabor amargo seguido por una sensación picante, sin olor.

SOLUBILIDAD :

Es una sustancia insoluble en agua fría, ligeramente soluble en - - agua hirviente, petrolato líquido, éter; soluble en benceno, ácido acético, - aceites vegetales fijos, propilenglicol y en etanol hirviente; muy soluble en - cloroformo y acetona.

IDENTIDAD (11) :

- a).- Con calentamiento disolver 10 mg de Ammoidin en aproximadamente 5 ml de HNO_3 dil. : la solución se torna amarilla. Alcalinizar con solución de NaOH al 40% : la solución se torna rojo-café.
- b).- Suspender aproximadamente 10 mg de Ammoidin en 5 ml de H_2SO_4 conc. : Se desarrolla un color amarillo, el cual cambia gradualmente a café oscuro.
- c).- Por cromatografía en capa fina, mediante la técnica reportada en esta presente tesis, muestra un R_f de 0.248.

PUNTO DE FUSION :

146 - 147°C (Por cristalización de Etanol-Eter).

PERDIDA AL SECADO :

Pesar 1 g de Ammoidin, secar a una temperatura de 105°C durante 6 horas : la pérdida en peso no debe exceder de 0.5%.

CENIZAS SULFATADAS :

Carbonizar 1.0 g de Ammoidin, enfriar el residuo, agregar 1 ml de Ac. Sulfúrico conc., calentar cuidadosamente hasta que no se desprenda trióxido de azufre, hacer la ignición, enfriar y pesar : los residuos no excederán

de 0.1%.

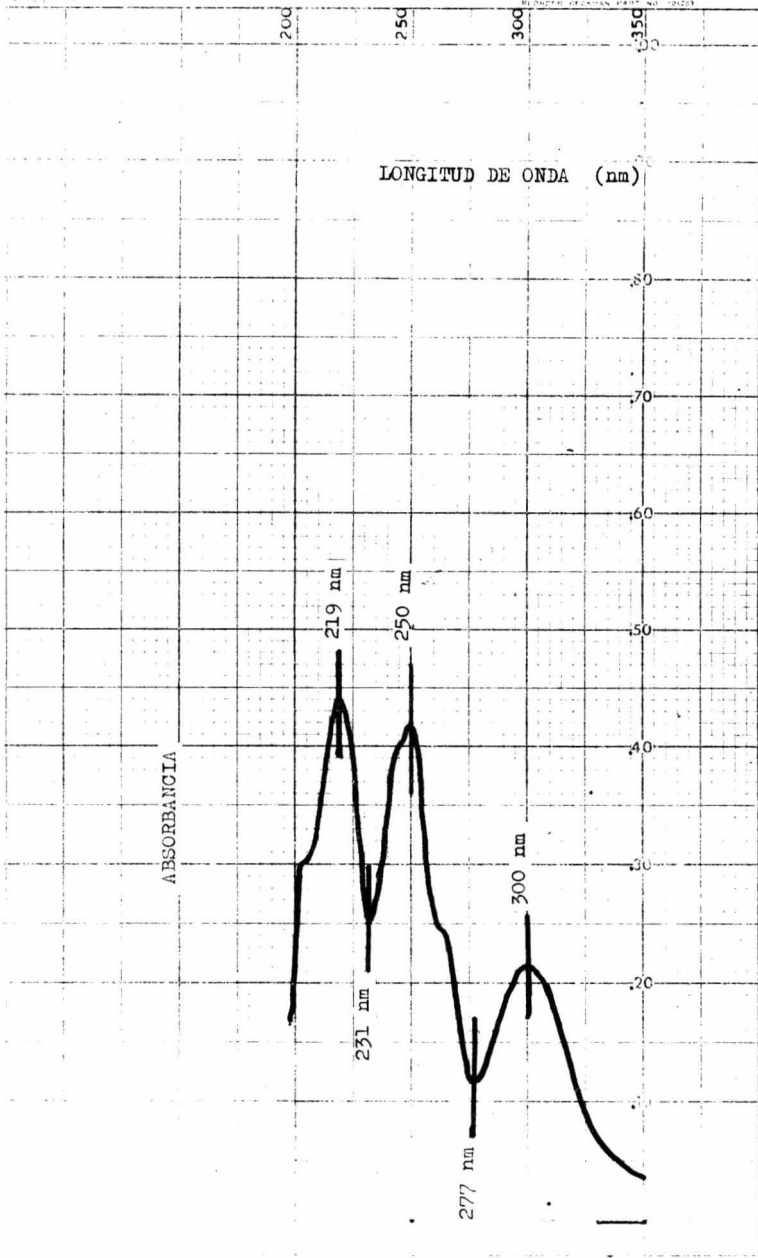
Esta muestra está libre de residuos para la determinación de metales pesados.

METALES PESADOS :

Disolver el residuo de la determinación de cenizas sulfatadas en 23 ml de agua, agregar 2 ml de Acido Acético diluido, la cantidad de metales pesados no excederá de 20 p.p.m.

ABSORCION AL ULTRAVIOLETA :

Una solución al 0.0004% en etanol, exhibe máximas absorbancias al UV. a aproximadamente 219, 250 y 300 nm, mínimas a aproximadamente 231 y 277 nm, tales absorbancias se muestran en la gráfica No 1. La E (1%₁ / 1 cm) en etanol a 219, 250 y 300 nm es de aproximadamente 1125, 1050 y 560 respectivamente.



GRAFICA No. 1

Beckman INSTRUMENTS, INC. FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A.

SAMPLE: AMMOIDIN REFERENCE: _____

SOURCE: W H₂X D₂

ANALYST: ADOLFO GALICIA A.

DATE: 5 Nov., 1974. NO. 4

PATH: _____

SCAN SPEED: 50 Mμ/MIN

CHART SPEED: 1 IN/MIN

SLOT PROGRAM: _____

SOLVENT: ETANOL

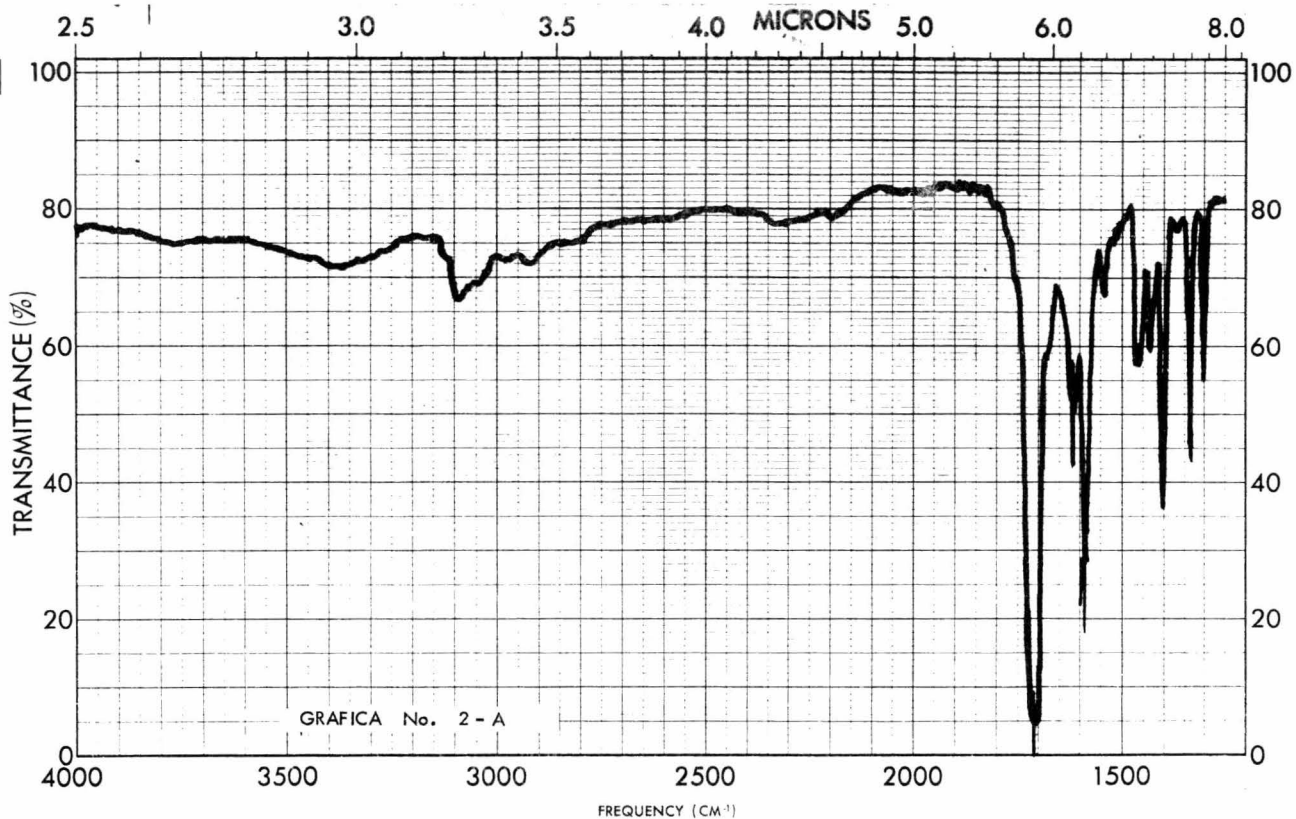
CONCENTRATION: 4 mcg/ml

ABSORCION AL INFRAROJO :

En el rango del Infrarojo, el Ammoidin presenta las siguientes absorciones características :

LONGITUD DE ONDA nm	FRECUENCIA (cm^{-1})	ENLACE CAUSANTE DE LA ABSORCION.
5.87	1705	enlace C=O de la Delta Lactona.
6.17 y 6.33	1620 y 1580	enlace C=C Aromáticos
9.1	1095	enlace del grupo -CH ₃
9.8	1020	enlace C-O-C del grupo CH ₃ O-
11.43	875	enlace Ar-H

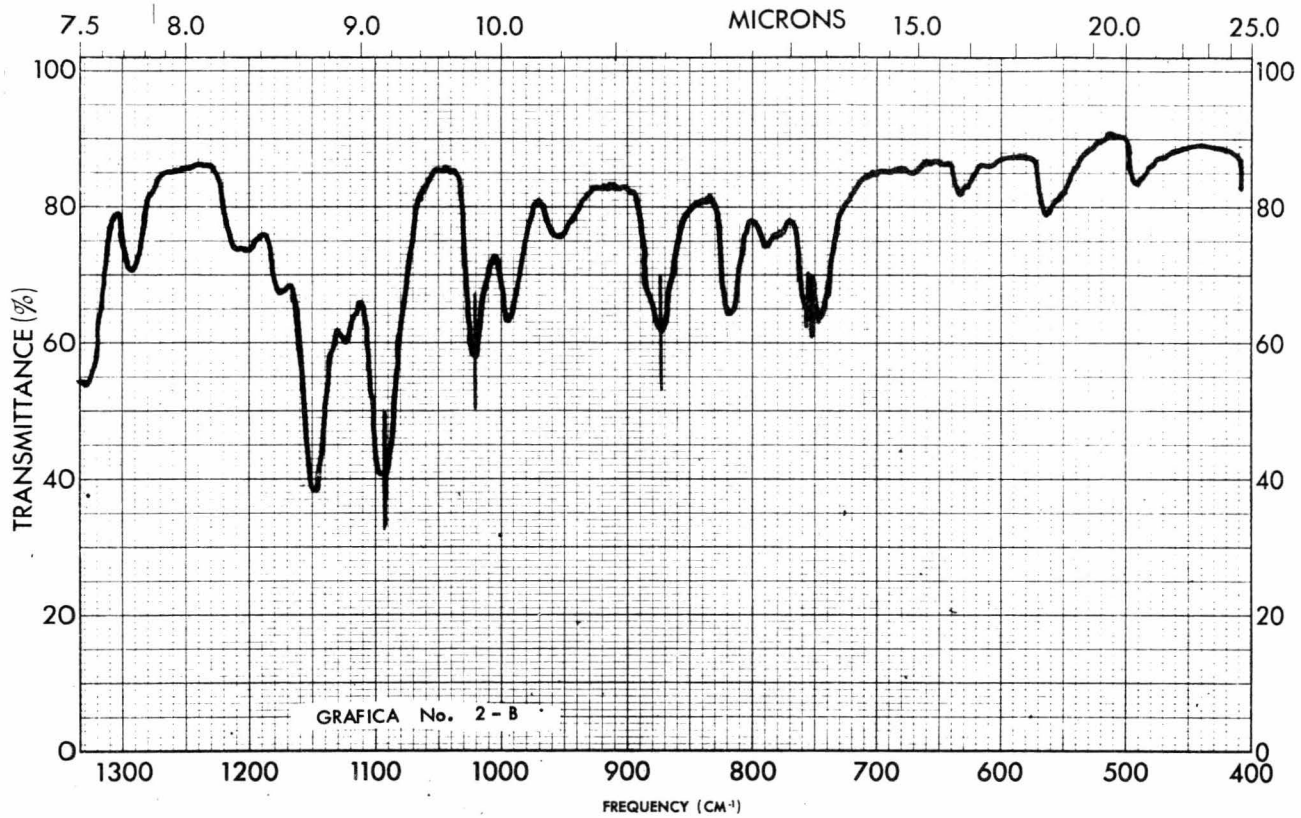
Estas absorciones se muestran en las gráficas 2 A y 2B.



SAMPLE <u>AMMOIDIN</u>	CURVE NO. <u>18896</u>	SCAN SPEED <u>LENTO</u>	OPERATOR <u>Ch</u>
	CONC. <u>—</u>	SLIT <u>N</u>	DATE <u>9/X/75.</u>
ORIGIN <u>ADOLFO GALICIA ANAYA</u>	CELL PATH <u>—</u>	REMARKS <u>PASTILLA</u>	
SOLVENT <u>KBr</u>	REFERENCE <u>AIRE</u>		

PART NO. 337-1203

PERKIN-ELMER[®]



SAMPLE <u>AMMOIDIN</u>	CURVE NO. <u>18896</u>	SCAN SPEED <u>RAPIDO</u>	OPERATOR <u>Ch</u>
ORIGIN <u>ADOLFO GALICIA AMAYA</u>	CONC. <u> </u>	SLIT <u>N</u>	DATE <u>9/X/75.</u>
SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH <u> </u>	REMARKS <u>PASTILLA</u>	
	REFERENCE <u>AIRE</u>		

PART NO. 337-1204

PERKIN-ELMER®

METODO DE VALORACION :

Varios métodos han sido publicados para la estimación cuantitativa del Ammoidin y otras furocumarinas tanto en las frutas de Ammi-majus L. como en productos farmacéuticos, ejem. : Gravimétrico, Colorimétrico, Espectrofotométrico y Densitofotométrico (12).

El método gravimétrico fué el primero, usado para la estimación de furocumarinas presentes en las frutas de Ammi-majus L. (13). Este método — tiene muchas desventajas, entre las cuales se tienen, la pérdida de cantidades apreciables de furocumarinas durante la purificación y las impurezas no eliminadas como las cumarinas, que dirigen a cálculos erróneos. Sin embargo, este método fué usado para la estimación de furocumarinas totales, aunque algunas de las cuales pueden ser farmacológicamente inactivas.

El método colorimétrico ha sido adoptado para la valoración de furocumarinas totales (14) e individuales (15). Beyrich (16), sin embargo criticó este método y estableció que no es adecuado para la estimación de Ammoidin e Imperatorina, pero pudo ser aplicado para la estimación de furocumarinas que tienen libre la posición 8, tal como el Bergapten y Psoralen.

El método espectrofotométrico se ha usado para la valoración de furocumarinas individuales, principalmente Ammoidin, Imperatorina y Bergapten después de la separación, ya sea por cromatografía de papel que se ha - -

adoptado en muchos casos (17) ó por cromatografía en capa fina (18).

El método densitofotométrico fué sugerido por Abu Mustafa y otros - (19), pero su aplicabilidad no ha sido confirmada.

Después de varias tentativas se encontró que el método espectrofo-
tométrico con previa separación por cromatografía en capa fina es el más ade-
cuado para la estimación de furocumarinas individuales.

3.- FARMACOLOGIA.

El estudio de la Farmacología es muy extenso y difícil de tratarlo -
brevemente, por ello, en este caso se tratarán los puntos más indispensables -
para comprender los efectos terapéuticos del Ammoidin, por consiguiente se -
enunciarán los trabajos publicados sobre :

- 1).- ACTIVIDAD FARMACOLOGICA.
- 2).- MECANISMO DE ACCION.
- 3).- INTERACCION DE FARMACOS.
- 4).- TOXICIDAD.

1).- ACTIVIDAD FARMACOLOGICA.

- a).- Acción Fotosensibilizante en la piel vitiliginosa.

Ibn El Bittar (20), reporta por primera vez como efecto terapéutico
del Ammi-majus una repigmentación de manchas blancas de la piel vitiliginosa.

sa. Posteriormente, este efecto y otros posibles fueron publicados por diversos autores, tales como :

Abdel Monem, en 1947, llevó a cabo pruebas clínicas usando 8- -- MP. en el tratamiento de vitiligo, teniendo resultados insatisfactorios. En -- ese mismo año Fahmy y Abou Shady (21), realizaron una extracción de las -- frutas de Ammi majus Linn., logrando una separación de 3 compuestos cristali -- nos : Ammoidin (Metoxalen, Xantotoxina), Imperatorina y Bergapten. Es -- tos productos cristalinos fueron clínicamente probados de 3 maneras :

- 1.- Por vía oral,
- 2.- Por aplicación local únicamente.
- 3.- Por combinación de ambas.

Esta forma cristalina de Ammoidin fué dada en dosis de 50 mg por -- día, seguida por irradiación solar o de luz ultravioleta obteniéndose un resul -- tado satisfactorio.

En 1948, Abdel Monem (22), aplicó Psoralenes por vía tópica. -- El Ammoidin fué aplicado como solución a las manchas vitiliginosas, seguidas -- por irradiación solar y se observó que únicamente las manchas tratadas tenían -- repigmentación, sin embargo, un alto porcentaje de las curaciones se alcanzó -- mediante la combinación del tratamiento oral y tópico, seguido por irradia -- ción solar. Concluyó que este tratamiento oral-tópico es más efectivo que --

cada uno de ellos por separado.

También observó que no era necesario que ocurriera vesiculación o inflamación severa para que haya repigmentación, puesto que esta última apareció en las manchas, las cuales no mostraron algún signo de vesiculación o inflamación severa. En 1952 (23), este mismo autor llevó a cabo pruebas clínicas sobre un grupo de pacientes de ambos sexos y distintas edades, teniendo una distribución y grados diferentes de la enfermedad. De estas pruebas, se hicieron las siguientes observaciones :

- 1.- El fármaco es efectivo en el tratamiento de vitiligo y la respuesta es específica.
- 2.- No hay relación entre la velocidad de repigmentación y el sexo del paciente.
- 3.- La sola irradiación solar o de luz ultravioleta sin el fármaco no tiene efecto.
- 4.- El desarrollo de eritema severo y vesiculación no fué esencial para el proceso de repigmentación.
- 5.- Se encontró que, una dosis diaria de 40-50 mg de Ammoidin es la óptima, dando el efecto terapéutico completo sin algún síntoma tóxico aún si es usado en períodos largos.

Pathak y Fitzpatrick han demostrado que la aplicación tópica o ad-

ministración oral de Ammoidin puede hacer que aparezcan respuestas de eritema y pigmentación, en animales y en el hombre, con fuentes de luz artificial (long. onda de 320 - 390 nm) ó solar.

b).- Aumento de la capacidad de bronceamiento de la piel.

Los Psoralenes aumentan la capacidad de la piel para el bronceamiento. El bronceamiento aumentado de la piel después de la ingestión de Psoralenes ha sido observado por muchos autores, ejem. : Arnold (25), Fitzpatrick y colaboradores (26) e Imbrie y colaboradores (27). Los pacientes con vitiligo bajo la terapia con Psoralenes siempre muestran un bronceamiento incrementado de las áreas normales de su piel expuesta a la luz del sol o ultravioleta.

c).- Aumento de la tolerancia a la luz solar y disminución de quemaduras en la piel.

Hay evidencias de que el Ammoidin administrado oralmente, posee una propiedad de protección de la piel contra la luz ultravioleta, aumentando el promedio de tolerancia de las personas normales a la luz solar.

Lerner y colaboradores (28), reportan que dos pacientes con vitiligo a quienes se les dió Ammoidin, establecieron que ellos pudieron tolerar la luz solar en las áreas de vitiligo mejor que antes del tratamiento. Tres albinos se les dió Ammoidin de manera semejante, se observó un aumento de la

tolerancia a la luz solar.

De 1952 a 1954, Fitzpatrick y Lerner (29), usando 8-MP. oralmente en el tratamiento de 110 pacientes con vitiligo, extendieron la evidencia de la tolerancia incrementada a la luz solar de la piel vitiliginosa siguiendo el tratamiento. Por otra parte, 36 personas normales tuvieron un bronceamiento incrementado y una disminución de quemaduras, mientras usaban 20 mg de Ammoidin por vía oral diariamente.

Imbrie y colaboradores (27, 30), demostraron que el aumento marcado de protección de la piel expuesta previamente a la luz solar después de la ingestión de Ammoidin, se debía a la administración de este fármaco.

2).- MECANISMO DE ACCION.

Se sabe que las reacciones de fotosensibilización biológica resultan de la absorción de un amplio espectro de radiación. La energía asociada con los fotones de longitud de onda diferente, puede iniciar alteraciones biológicas. La absorción de la energía es un fenómeno específico primordialmente asociado con la estructura de las moléculas. Por otra parte se sabe que únicamente la radiación absorbida es capaz de producir un cambio. Sin la absorción de la energía de luz no puede haber fotosensibilización biológica. Es importante también tener en cuenta que la energía absorbida no necesariamente tiene que producir alteraciones biológicas. Dicha energía puede ser -

degradada en los tejidos en forma de calor (ejem. : elevación de la temperatura). Es obvio por consiguiente que hay una relación estrecha entre el espectro de absorción de la molécula y el espectro de acción, como por ejemplo, — aquellas longitudes de onda que evocan alteraciones biológicas.

El espectro de acción de Ammoidin en la fotosensibilización cutánea en el hombre ha sido reportado por Buck y colaboradores (31) y Pathak (32). Los datos de estos autores indican que el espectro de acción fotosensibilizante de Ammoidin se extiende entre 340 y 380 nm, con máxima efectividad a 360 nm.

Recientemente, usando intensidad alta de radiación UV. monocromática de una lámpara de Xenón, Pathak y El Mofty, han reexaminado la acción fotosensibilizante de Ammoidin y otras furocumarinas. Sus observaciones revelaron que las longitudes de onda abajo de 320 nm (240–260, 280–290 nm) son las absorbidas más rápidamente por estos compuestos, sin embargo no aumentan la respuesta eritemal normal en conejillo de indias, siendo principalmente la radiación en el rango entre 320 y 360 nm la que tiene un efecto fotosensibilizante sobre la piel de estos animales. Ellos notaron sin embargo, que la respuesta eritemal producida por la irradiación con longitud de onda de 300 nm fué marcadamente aumentada por administración de estos fármacos. — De estos estudios concluyeron que la acción fotosensibilizante de furocumarinas biológicamente activas está en el rango de 300–360 nm con efectividad —

máxima de 320 y 360 nm.

Puesto que la administración de estos compuestos es seguida por un aumento de la respuesta eritemal de la piel a longitudes de onda de 300 a 320 nm, es claro que hay una relación definida entre el espectro de absorción de Psoralenes y el espectro de acción de fotosensibilización cutánea en la región entre 295-320 nm, por otro lado, no ha sido bien definida la longitud de onda de 360 nm que aún no siendo marcadamente absorbida por Psoralenes, aumenta la fotosensibilización cutánea.

Jarrett y Szabó (33) estudiaron histológicamente la respuesta de la piel normal y vitiliginosa a la Soln. de Ammoidin y radiación solar o ultravioleta. En la piel normal encontraron un aumento marcado de reactividad de la Dopa en los melanocitos pero no hubo un aumento significativo en su número.

Fué demostrado por Pathak, Szabó y El Mofty, que la pigmentación aumentada que sigue de la ingestión de Psoralen y luz, parece ser debida al aumento en el número de melanocitos. Los melanocitos no únicamente aumentan en número, sino que también aumentan en tamaño y en su capacidad para producir melanina. La microscopía de luz ha revelado que las áreas de piel tratadas con Psoralen tienen un aumento en la reactividad de Dopa en los melanocitos y también en la actividad de tirosinasa.

Posteriormente en 1967 Nobuyuki Mizuno (34), realizó estudios --

histológicos e histoquímicos de la fotosensibilidad de Ammoidin administrado por vía intraperitoneal a conejillo de indias con irradiación posterior de luz UV., observando que inmediatamente después de la aplicación había variación en los procesos enzimáticos y en las cantidades de las enzimas, principalmente en la deshidrogenasa succínica y NADH Tetrazolium reductasa.

Por otra parte Musajo Luigi y Rodighiero Giovanni, por separado y después juntos, ayudados por otros investigadores realizaron estudios a nivel macromolecular de la fotoreactividad del Ammoidin y otras furocumarinas derivados del Psoralen con ácidos nucleicos (35, 36,37), estableciendo una correlación estrecha entre la actividad fotosensibilizante de furocumarinas en la piel y su fotoreactividad con DNA natural; para ello, hicieron comparación de ambos fenómenos, los cuales se mencionan a continuación.

a).- El Ammoidin y su actividad fotosensibilizante en la piel.

Para evaluar la actividad fotosensibilizante, Rodighiero y Musajo (38, 39) hicieron una prueba que consistió en lo siguiente : En la espalda de hombres voluntarios colocaron 5 mcg de la sustancia por cm^2 de la piel, e irradiaron a 365 nm; determinaron el tiempo mínimo de la irradiación necesario para la aparición de eritema, tomando como actividad fotosensibilizante de referencia, la que produce el Psoralen que es la furocumarina de la cual se obtienen sus derivados, estando entre ellos el Ammoidin.

Pathak y otros investigadores (40, 41), obtuvieron resultados análogos, trabajando sobre la piel de conejillo de indias, determinaron la cantidad mínima de sustancia necesaria para producir eritema después de un constante período de irradiación. Posteriormente se hicieron modificaciones para esta prueba (42), atendiendo a metil derivados más activos que Psoralen; se usó piel de conejillo de indias, se redujo la cantidad de la sustancia aplicada a 2.5 mcg por cm^2 de piel y se determinó el tiempo mínimo de irradiación en condiciones estandar de temperatura, distancia e intensidad de irradiación, necesario para obtener el eritema. Los datos que aparecen en la tabla No 1 están referidos a esta prueba.

TABLA No 1

Furocumarinas	Actividad relativa fotosensibilizante -- en la piel (Psoralen 100).
8-Metil-Psoralen	540
5-Metil-Psoralen	450
Psoralen	100
Ammoidin	71
Bergapten	61
Angelicin	12
4',5' Dihidro-Psoralen	Inactivo
Xantotoxol	Inactivo

b).- Fotoreactividad del Ammoidin con DNA Natural y su correlación con su actividad fotosensibilizante.

Para establecer la fotoreactividad, se determinaron las velocidades de fotoreacción entre DNA natural y las furocumarinas, entre ellas el Ammoidin.

La prueba consistió en colocar DNA natural de timo de becerro en una solución acuosa, se agregaron pequeñas cantidades de soluciones alcohólicas de las furocumarinas marcadas con Tritio para dar concentraciones finales de 10 mcg por ml, las concentraciones de alcohol en las soluciones fueron menores de 1%, para evitar la precipitación del ácido nucléico. 2 ml de las soluciones obtenidas se irradiaron a 365 nm, después se agregó Cloruro de Sodio sólido a las soluciones para obtener concentraciones de 0.1 M. Se precipitó el DNA por adición de 4 ml de Etanol-agua (80:20) (V/V). Se redisolvió en 2 ml de agua. Las soluciones obtenidas fueron utilizadas para determinar la fotoreactividad de las furocumarinas marcadas que reaccionan con el DNA natural, mediante la radioactividad estimada con un actinómetro.

Para definir las fotoreactividades en números, de los datos obtenidos, expresados en porcentajes de furocumarinas fotoreaccionantes en relación a la cantidad inicialmente presente, se calculó el tiempo de irradiación necesario para ligar a DNA natural un 20% de las furocumarinas agregadas, consi-

derando la fotoreactividad de Psoralen como igual a 100.

Los resultados obtenidos de manera previa sobre la fotosensibilidad en la piel que aparecen en la Tabla No 2 confirman que la fotoreacción DNA natural y furocumarinas, se relacionan con los efectos fotosensibilizantes producidos por las furocumarinas sobre la piel (35).

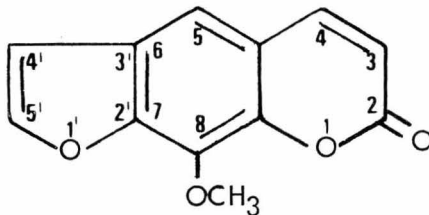
TABLA No 2

Fotoreactividad relativa de furocumarinas con DNA y su actividad relativa fotosensibilizante en la piel.

Furocumarinas	Tiempo de Irradiación necesario para un 20% de enlace a DNA (seg.)	Fotoreactividad relativa con DNA (Psoralen = 100)	Actividad Relativa fotosensibilizante en la piel (Psoralen = 100)
8-Metil -Psoralen	90	378	540
5-Metil-Psoralen	144	233	450
Psoralen	336	100	100
Ammoidin	558	60	71
Bergapten (5-metoxi-Psoralen)	1026	33	61
Angelicin (Iso-Psoralen)	2160	15	12
4',5'-Dihidro-Psoralen	-	-	Inactivo
Xantotoxol (8-Hidroxi-Psoralen)	-	-	Inactivo

c).- Mecanismo de Fotosensibilización en la piel, y orden de --
reacción (36).

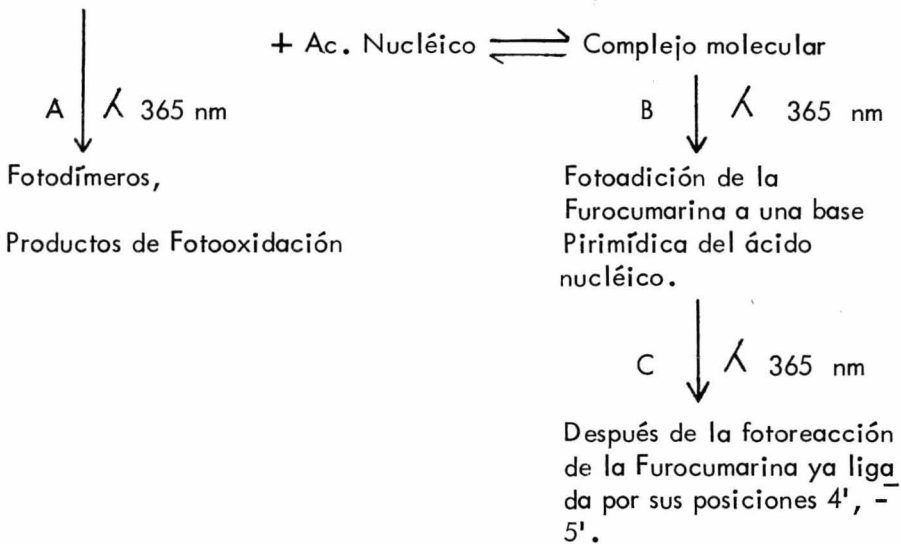
Partiendo del conocimiento de que, las furocumarinas fotoreaccio-
nantes con los ácidos nucleicos dan una fotoreacción de C_4 -cicloadición al -
doble enlace 5,6 de una base pirimídica (Timina, Citosina, Uracilo); las -
furocumarinas pueden emplear ya sea su doble enlace 4',5' ó 3,4. En el pri-
mer caso las fotoadiciones que se formaron no absorbe arriba de 320 nm. En
el segundo, las fotoadiciones tienen una absorción a 365 nm. Se puede suge-
rir por tanto que, cuando una furocumarina fotoreacciona con los ácidos nucleí-
cos para formar una fotoadición 4', 5', se puede dar una fotoreacción adicio-
nal, una segunda C_4 -cicloadición a otra base pirimídica con su doble enlace-
3,4.



Por otra parte, se sabe que las furocumarinas libres pueden dar foto-
dímeros o productos de fotooxidación cuando se irradia en soluciones acuosas-
a 365 nm. Los productos, sin embargo, en este caso son siempre muy bajos pa-
ra el mismo período de irradiación.

Las reacciones se pueden resumir como sigue :

Furocumarina Libre



La complejidad del sistema hace muy difícil determinar el orden de la fotoreacción entre furocumarinas y ácidos nucleicos. Sin embargo podemos considerar que la reacción A es generalmente lenta y que en el período inicial de la irradiación, la influencia de la reacción C es también muy pequeña. Por consiguiente, podemos asumir que en el período inicial de la irradiación la reacción B tendrá una prevalencia absoluta sobre las otras.

De acuerdo a los resultados reportados (36) los cuales se refieren únicamente al período inicial, hacen suponer que el orden de reacción es de pseudo-primer orden con respecto a las furocumarinas.

- d).- Estudios sobre las reacciones de Foto-C₄-Cicloadición entre furocumarinas fotosensibilizantes de la piel y ácidos nucleicos.

Algunos autores (37) hicieron estudios de las fotoreacciones de furocumarinas con ácidos nucleicos (DNA natural, DNA desnaturizado y RNA ribosomal), teniendo como base las reacciones de Foto-C₄-Cicloadición comprobadas, sugirieron que en el caso de DNA natural ocurre una intercalación de las furocumarinas entre pares de bases pirimídicas adyacentes de la doble hélice como primer paso de la reacción. Esta fotoreacción no está acompañada por rompimientos en la cadena de polinucleótidos o por modificación conformacional de la macromolécula. Observaron un paralelismo entre el grado de actividad de las sustancias de este grupo para la fotoreacción con DNA natural y la fotosensibilización en la piel.

Por otra parte, concluyeron que no existe una correlación estrecha entre la fotoreactividad de furocumarinas con RNA ribosomal, DNA desnaturizado y su actividad fotosensibilizante en la piel.

Determinaron también que, dentro del campo de fotosensibilización, las furocumarinas dan fotoreacciones las cuales pertenecen a aquellas que son independientes del oxígeno, ya que hay otras que son dependientes del oxígeno.

3).- INTERACCION DE FARMACOS.

Palicska y colaboradores (44), realizan estudios sobre derivados -- de furocumarinas fotodinámicamente activas de origen natural que causan in-- flamación de la piel. Ellos concluyeron que las inflamaciones causadas por - Parsnid (planta natural), se puede explicar por la presencia simultánea de - - Ammoidin y Bergapten.

Se puede suponer que hay un sinergismo que surge de la asociación_ de los dos fármacos, pero que este incremento de la actividad terapéutica se - manifiesta en forma tóxica, produciendo eritemas, edemas e inflamaciones.

4).- TOXICIDAD.

En vista de la LD 50 por vía oral (470 ± 30 mg por Kg) en ratas, - Ammoidin parece ser un fármaco relativamente sin riesgo. Los estudios de to_ xicidad crónica en ratones revelaron que el fármaco en pequeñas dosis (0.4 - mg por día por vía intraperitoneal), no indujo a cambios detectables aún des- pués de un período de un año de administración. Cuando se inyectó en ratas_ en la relación de un décimo, la LD 50 (46 mg por Kg) por 15 días, el fárma-- co indujo hemorragias internas y produjo degeneración prematura en el híga-- do y riñones (45). Estos descubrimientos están de acuerdo con los resultados_ de Elwi (46) quien reportó efectos similares en conejillo de indias.

La administración oral del Ammoidin en humanos se sabe que causa_

una amplia variedad de signos desagradables y síntomas tales como náuseas, — vómitos, quemaduras gástricas, dermatitis, sangrado rectal, albuminuria. Algunos de estos efectos fueron reportados en el siglo XVII por Dawwod El-Antaki (47).

El fármaco parece reaccionar de manera diferente cuando se administra a través de las diferentes vías de administración, estas introducen factores que complican el estudio de la toxicidad. Parece ser que hay un índice terapéutico razonable entre dosis terapéutica y dosis letales. Sin embargo, — cuando la dosis terapéutica es seguida por exposición a la longitud de onda -- UV., Ammoidin causa un intenso eritema y edema, adquiriendo toxicidad potencial en ratones albinos, ratas y conejillos de indias. A causa de estos — efectos farmacológicos, este principio activo fué causa de investigaciones posuteriores. Sin embargo se enfatizará que el fármaco tiene que ser administrado bajo supervisión cuidadosa.

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

III A.- MATERIAL.

- 1.- Placas de vidrio de 20 x 20 cm
- 2.- Extendedor
- 3.- Plantilla de trabajo
- 4.- Gradilla
- 5.- Placa graduada (para medir el corrimiento)
- 6.- Cámara de vidrio de 10 x 22 x 22 cm
- 7.- Mortero
- 8.- Estufa a 110°C
- 9.- Micropipetas aforadas de 100 y 200 mcl
- 10.- Sílica gel GF-254
- 11.- Lámpara de luz UV. (254 y 360 nm)
- 12.- Matraces aforados de 10 ml
- 13.- Matraces aforados de 25 ml
- 14.- Matraces aforados de 100 ml
- 15.- Reactivos : Formamida

Cloroformo

Acetona

Dibutil éter ó n-Butil éter

- 16.- Ammoidin : a).- Patrón Interno
 b).- Muestras de Principio Activo (5 Lotes)
 Muestras de Tabletas
 Muestras de Tintura
 Muestras de Pomada

a).- Para obtener un Patrón de Ammoidin, utilizado como referencia para los ensayos, se partió de diferentes muestras de este fármaco para proceder con ellas de la siguiente manera :

Se realizó una separación de Ammoidin e impurezas por cromatografía en capa fina, usando el sistema reportado en esta presente tesis. Las -- muestras aplicadas fueron de 40 mcg de principio activo disueltos en cloroformo.

De los resultados obtenidos, que se muestran en la Fig. No 1, se escogió aquella muestra que sólo mostró la presencia de Ammoidin con un R_f de aproximadamente 0.248, ya que en algunas muestras, se detectó otra mancha que corresponde al Bergapten con un R_f de aproximadamente 0.455, el -- cual se considera impureza.

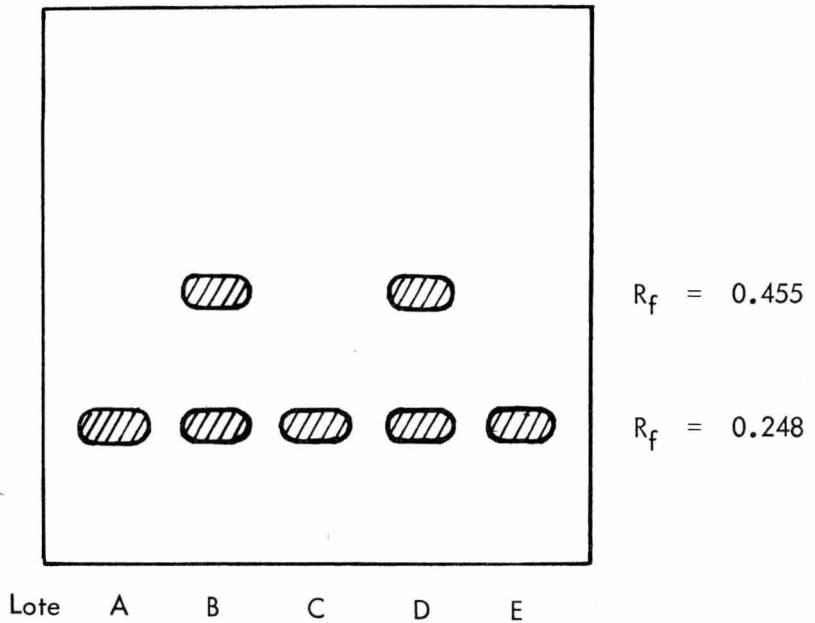


Fig. No 1 : Resultados de la cromatografía practicada de diferentes Lotes de Ammoidin.

Esta muestra se recristalizó en una mezcla de etanol-éter (2:1).

Se sometió a las pruebas físicas y químicas que se reportan en la parte de generalidades de este trabajo, con el objeto de asegurar la identidad y la mayor pureza.

b).- Las muestras de : Principio activo, tabletas, tintura y pomada utilizadas para los ensayos de valoración, se tomaron de aquel Lote, cuya muestra presentaba Bergapten, con el objeto de realizar la separación y estimación.

ción cuantitativa de Ammoidin (Principio Activo) y Bergapten (Impureza).

III B.- METODO.

La técnica de separación utilizada fué la cromatografía en capa fina, siguiendo un sistema unidimensional ascendente con las siguientes características.

a).- Fase estacionaria : Placas de sílica gel GF-254, de 0.25 mm de grosor, activadas a 110°C durante 1 hora, e impregnadas con solución de formamida al 25% en acetona.

b).- Fase móvil : Dibutil éter (n-Butil éter).

c).- Detección de las manchas a la luz UV. (254 y 360 nm).

Este método dió una adecuada separación de furocumarinas siendo reportado anteriormente por Beyrich (49).

Esta previa separación de Ammoidin e impurezas por cromatografía en capa fina, hizo posible la cuantificación individual por espectrofotometría en el rango del UV, de Ammoidin y posibles impurezas, en principio activo y formas farmacéuticas, tabletas, tintura y pomada.

A continuación se mencionan los procedimientos que se siguieron para dichas valoraciones.

a).- METODO DE VALORACION EN PRINCIPIO ACTIVO (12).

PROCEDIMIENTO :

Poner 40 mg tanto del patrón de Ammoidin como de la muestra de materia prima en matraces aforados de 10 ml, disolver con cloroformo y aforar con el mismo solvente. De ambas soluciones medir muestras con micropipetas aforadas de 100 mcl, aplicar a las placas previamente preparadas, activadas e impregnadas como se indicó anteriormente. Colocar las placas en una cámara de vidrio saturada con más o menos 100 ml de Dibutil éter, correr el solvente 15 cm, sacar las placas y evaporar el solvente, detectar y delimitar las manchas a la luz UV. (254, 360 nm). Raspar las manchas, colocar la mancha del Patrón de Ammoidin con R_f 0.248 aproximadamente en un matraz aforado de 100 ml; para la muestra, colocar la mancha con R_f de 0.248 en un matraz aforado de 100 ml y la de R_f 0.455 (impureza : Bergapten) en un matraz aforado de 10 ml, aforar con cloroformo y filtrar las soluciones.

Raspar un área blanca de la sílica gel GF-254 y colocarla en un matraz aforado de 10 ml, aforar con cloroformo, filtrar y utilizar la solución filtrada como blanco.

Leer las absorbancias de todas las soluciones :

Para Ammoidin a 300 nm

Para Bergapten (impureza) a 311 nm

Usar en ambos casos el Patrón de Ammoidin como referencia.

CALCULOS :

Los cálculos de los porcentajes de Ammoidin y de Bergapten (impureza), se obtuvieron aplicando las siguientes fórmulas :

$$\text{Para Ammoidin (P.A.)} \quad \% = \frac{A_m}{A_p} \times 100$$

$$\text{Para Bergapten (impureza)} \quad \% = \frac{A_m}{A_p} \times \frac{100}{10}$$

En donde : A_m = Absorbancia de la muestra.

A_p = Absorbancia del Patrón de Ammoidin.

Se efectuaron 20 determinaciones de la materia prima obteniéndose un promedio de 96.25% para el Ammoidin y un 5.35% de Bergapten, dichos resultados se muestran en la Tabla No 3.

TABLA No 3

PRINCIPIO ACTIVO

	AMMOIDIN (P.A.)		BERGAPTEN (IMPUREZA)
1.-	98.44 %	6.476 %
2.-	98.44 %	6.062 %
3.-	100.0 %	5.693 %
4.-	97.19 %	5.654 %
5.-	96.29 %	5.972 %
6.-	92.34 %	5.180 %
7.-	100.0 %	5.581 %
8.-	96.78 %	6.046 %
9.-	94.59 %	6.306 %
10.-	98.58 %	5.896 %
11.-	94.22 %	5.333 %
12.-	98.65 %	6.053 %
13.-	94.22 %	5.422 %
14.-	95.49 %	5.630 %
15.-	94.82 %	5.301 %
16.-	93.56 %	5.364 %
17.-	94.03 %	3.394 %
18.-	96.66 %	3.571 %
19.-	95.41 %	4.220 %
20.-	95.41 %	4.036 %
\bar{X}	96.25 %	5.350 %

b).- METODO DE VALORACION PARA TABLETAS. (12) (49)

FORMULA :

Cada tableta contiene :

Ammoidin.....	0.010 g
Almidón de maíz	0.096 g
Lactosa	0.067 g
Grenetina	0.002 g
Talco	0.020 g
Estearato de magnesio	0.005 g
	<hr/>
	0.200 g

VALORACION.-

SOLUCION PATRON :

Poner 40 mg del Patrón de Ammoidin en un matraz aforado de 10 ml, disolver y aforar con cloroformo.

SOLUCION PROBLEMA :

Del polvo de no menos de 20 tabletas, pesar el equivalente a 40 mg de Ammoidin, pasar a un aparato Soxhlet, extraer a reflujo con 60 ml de cloroformo por 30 minutos, pasar la solución clorofórmica a un vaso de preci-

pitado, lavar el aparato con 10 ml de cloroformo e incorporar los lavados a la solución del vaso. Concentrar la solución clorofórmica, evaporando el solvente hasta tener unos 5 ml, pasar a un matraz aforado de 10 ml y aforar con cloroformo.

De ambas soluciones medir muestras de 100 mcl y proceder de la misma manera que en la valoración descrita para el principio activo.

Se efectuaron 20 determinaciones de las tabletas, obteniéndose un promedio de 95.93% para el Ammoidin y un 5.45% de Bergapten, dichos resultados se muestran en la Tabla No 4.

TABLA No 4

TABLETAS

	AMMOIDIN (P.A.)		BERGAPTEN (IMPUREZA)
1.-	92.33 %	6.571 %
2.-	94.62 %	5.102 %
3.-	96.30 %	5.960 %
4.-	97.13 %	6.062 %
5.-	94.85 %	4.216 %
6.-	99.14 %	3.817 %
7.-	96.22 %	6.025 %
8.-	97.44 %	5.961 %
9.-	96.15 %	5.190 %
10.-	93.21 %	6.047 %
11.-	96.89 %	5.870 %
12.-	94.22 %	5.662 %
13.-	92.58 %	3.971 %
14.-	95.38 %	5.420 %
15.-	98.45 %	6.496 %
16.-	98.68 %	4.321 %
17.-	96.87 %	5.850 %
18.-	95.94 %	5.360 %
19.-	97.78 %	5.689 %
20.-	94.59 %	5.542 %
\bar{X}	95.93 %	5.450 %

c).- METODO DE VALORACION PARA TINTURA.

FORMULA :

Cada 100 ml. contiene :

Ammoidin	0.750 g
Acetona	10 ml
Propilenglicol	10 ml
Alcohol etílico 96° c.s.p.	100 ml

VALORACION.-

Solución Patrón :

Poner 37.5 mg del Patrón de Ammoidin en un matraz aforado de 10 ml, disolver y aforar con cloroformo.

Solución Problema :

Medir con una pipeta volumétrica, 5 ml de Tintura, pasar a un matraz aforado de 10 ml y aforar con cloroformo.

De ambas soluciones medir muestras de 100 mcl y proceder de la misma manera que en la valoración descrita para el principio activo.

Se efectuaron 20 determinaciones de la Tintura, obteniéndose un promedio de 95.43% para el Ammoidin y un 5.06% de Bergapten, dichos resultados se muestran en la Tabla No 5.

TABLA No 5

TINTURA

	AMMOIDIN (P.A.)		BERGAPTEN (IMPUREZA)
1.-	96.19 %	5.210 %
2.-	95.23 %	3.835 %
3.-	95.23 %	2.969 %
4.-	96.19 %	8.224 %
5.-	97.61 %	5.319 %
6.-	96.19 %	6.351 %
7.-	97.56 %	4.213 %
8.-	95.12 %	4.268 %
9.-	95.12 %	4.376 %
10.-	97.61 %	5.581 %
11.-	95.23 %	6.726 %
12.-	95.23 %	4.253 %
13.-	95.23 %	5.169 %
14.-	94.28 %	6.017 %
15.-	94.28 %	3.252 %
16.-	95.55 %	5.573 %
17.-	95.55 %	4.728 %
18.-	95.55 %	5.748 %
19.-	95.23 %	5.261 %
20.-	90.47 %	4.285 %
\bar{X}	95.43 %	5.060 %

d).- METODO DE VALORACION PARA POMADA.

FORMULA :

Cada 100 g contienen :

Ammoidin	0.400 g
Acido para-aminobenzoico	2.000 g
Carbowax E-400	95.600 g
Propilenglicol.....	2.000 g
	<hr/>
	100.000 g

VALORACION.-

Solución Patrón :

Poner 50 mg del Patrón de Ammoidin en un matraz aforado de 25-ml, disolver y aforar con cloroformo.

Solución Problema :

Poner 5 g de pomada en un matraz aforado de 10 ml, diluir y aforar con cloroformo.

De ambas soluciones, medir muestras con micropipetas aforadas de 200 mcl y se procede de la misma manera que en la valoración descrita para el principio activo.

Se efectuaron 20 determinaciones de la pomada, obteniéndose un promedio de 96.32% para el Ammoidin y un 4.99% de Bergapten, dichos resultados se muestran en la Tabla No 6.

TABLA No. 6

P O M A D A

	AMMOIDIN (P. A.)		BERGAPTEN (IMPUREZA)
1.-	96.50 %	5.600 %
2.-	100.96 %	5.288 %
3.-	98.55 %	4.567 %
4.-	98.55 %	5.048 %
5.-	104.8 %	4.951 %
6.-	96.15 %	5.769 %
7.-	100.0 %	4.878 %
8.-	93.33 %	4.888 %
9.-	93.27 %	5.067 %
10.-	95.30 %	4.600 %
11.-	97.18 %	4.788 %
12.-	95.30 %	4.613 %
13.-	93.27 %	5.067 %
14.-	93.33 %	4.888 %
15.-	92.35 %	5.200 %
16.-	98.50 %	6.051 %
17.-	94.26 %	3.160 %
18.-	92.90 %	5.130 %
19.-	97.14 %	4.216 %
20.-	95.48 %	6.148 %
\bar{X}	96.32 %	4.990 %

IV.- RESULTADOS Y ESTUDIO ESTADISTICO

PRINCIPIO ACTIVO

AMMOIDIN (P. A.)			BERGAPTEN (IMPUREZA)			
	x (%)	x- \bar{x}	(x- \bar{x}) ²	x (%)	x- \bar{x}	(x- \bar{x}) ²
1.-	98.44	2.19	4.7961	6.476	1.12	1.2611
2.-	98.44	2.19	4.7961	6.062	0.712	0.5069
3.-	100.00	3.75	14.0625	5.693	0.343	0.1176
4.-	97.19	0.94	0.8836	5.654	0.304	0.0924
5.-	96.29	0.04	0.0016	5.972	0.622	0.3869
6.-	92.34	-3.91	15.2881	5.180	-0.170	0.0289
7.-	100.00	3.75	14.0625	5.581	0.231	0.0534
8.-	96.78	0.53	0.2809	6.046	0.696	0.4844
9.-	94.59	-1.66	2.7556	6.0306	0.956	0.9139
10.-	98.58	2.33	5.4289	5.896	0.546	0.2981
11.-	94.22	-2.03	4.1209	5.333	-0.017	0.0003
12.-	98.65	2.40	5.7600	6.053	0.703	0.4942
13.-	94.22	-2.03	4.1209	5.422	0.072	0.0052
14.-	95.49	-0.76	0.5776	5.630	0.280	0.0784
15.-	94.82	-1.43	2.0449	5.301	-0.049	0.0024
16.-	93.56	-2.69	7.2361	5.364	0.014	0.0002
17.-	94.03	-2.22	4.9284	3.394	-1.956	3.8259
18.-	96.66	0.41	0.1681	3.571	-1.779	3.1648
19.-	95.41	-0.84	0.7056	4.220	-1.130	1.2769
20.-	95.41	-0.84	0.7056	4.036	-1.314	1.7266
Σ .-	1925.12		92.724	107.190		14.7185

AMMOIDIN

BERGAPTEN

$$\bar{X} = 96.25 \%$$

$$\bar{X} = 5.35 \%$$

$$S^2 = \frac{(\sum x - \bar{x})^2}{n-1} = \frac{92.724}{19} = 4.8802 \quad S^2 = \frac{14.7185}{19} = 0.7746$$

$$S = \sqrt{S^2} = 2.2091 \quad S = \sqrt{S^2} = 0.87977$$

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{2.2091}{4.4721} = 0.4939 \quad S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.87977}{4.4721} = 0.1967$$

LIMITES DE CONFIANZA

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$96.25 \pm 2.093 (0.4939)$$

$$5.35 \pm 2.093 (0.1967)$$

$$96.25 \pm 1.0337$$

$$5.35 \pm 0.4117$$

TABLETAS

AMMOIDIN			BERGAPTEN (IMPUREZA)			
	x (%)	x- \bar{x}	(x- \bar{x}) ²	x (%)	x- \bar{x}	(x- \bar{x}) ²
1.-	92.33	-3.6	12.96	6.571	1.121	1.2565
2.-	94.62	-1.31	1.7161	5.102	-0.348	0.1211
3.-	96.30	0.37	0.1369	5.960	0.51	0.2601
4.-	97.13	1.2	1.4400	6.062	0.612	0.3745
5.-	94.85	-1.08	1.1664	4.216	-1.234	1.5228
6.-	99.14	3.21	10.3041	3.817	-1.633	2.6667
7.-	96.22	0.29	0.0841	6.025	0.575	0.3306
8.-	97.44	1.51	2.2801	5.961	0.511	0.2611
9.-	96.15	0.22	0.0484	5.190	-0.260	0.0676
10.-	93.21	-2.72	7.3984	6.047	0.597	0.3564
11.-	96.89	0.96	0.9216	5.870	0.420	0.1764
12.-	94.22	-1.71	2.9241	5.662	0.212	0.0449
13.-	92.58	-3.35	11.2225	3.971	-1.479	2.1874
14.-	95.38	-0.55	0.3025	5.420	-0.03	0.0009
15.-	98.45	2.52	6.3504	6.496	1.046	1.0931
16.-	98.68	2.75	7.5625	4.321	-1.129	1.2746
17.-	96.87	0.94	0.8836	5.850	0.400	0.1600
18.-	95.94	0.01	0.0001	5.360	-0.090	0.0081
19.-	97.78	1.85	3.4225	5.689	0.239	0.0571
20.-	94.59	-1.34	1.7956	5.541	0.092	0.0085
Σ .-	1918.77		72.9199	109.132		12.2285

AMMOIDIN

BERGAPTEN

$$\bar{X} = 95.93 \%$$

$$\bar{X} = 5.45 \%$$

$$s^2 = \frac{72.9199}{19} = 3.8378$$

$$s^2 = \frac{12.2285}{19} = 0.6436$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{3.8378} = 1.957$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0.6436} = 0.80187$$

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1.957}{4.4721} = 0.4376$$

$$s_m = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0.80187}{4.4721} = 0.1793$$

LIMITES DE CONFIANZA

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_{.95} s_m$$

$$\bar{X} \pm t_{.95} s_m$$

$$95.93 \pm 2.093 (0.4376)$$

$$5.45 \pm 2.093 (0.1793)$$

$$95.93 \pm 0.9159$$

$$5.45 \pm 0.3753$$

TINTURA

AMMOIDIN (P. A.)			BERGAPTEN (IMPUREZA)			
	x (%)	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$	x (%)	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$
1.-	96.19	0.76	0.5776	5.210	0.15	0.0225
2.-	95.23	-0.20	0.0400	3.835	-1.225	1.5006
3.-	95.23	-0.20	0.0400	2.969	-2.091	4.3723
4.-	96.19	0.76	0.5776	8.224	3.164	10.0109
5.-	97.61	2.18	4.7524	5.319	0.259	0.0671
6.-	96.19	0.76	0.5776	6.351	1.291	1.6667
7.-	97.56	2.13	4.5369	4.213	-0.847	0.7174
8.-	95.12	-0.31	0.0961	4.268	-0.792	0.6273
9.-	95.12	-0.31	0.0961	4.376	-0.684	0.4679
10.-	97.61	2.18	4.7524	5.581	0.521	0.2714
11.-	95.23	-0.20	0.0400	6.726	1.666	2.7756
12.-	95.23	-0.20	0.0400	4.253	-0.807	0.6512
13.-	95.23	-0.20	0.0400	5.169	0.109	0.0119
14.-	94.28	-1.15	1.3225	6.017	0.957	0.9158
15.-	94.28	-1.15	1.3225	3.252	-1.808	3.2689
16.-	95.55	0.12	0.0144	5.573	0.513	0.2632
17.-	95.55	0.12	0.0144	4.728	-0.332	0.1102
18.-	95.55	0.12	0.0144	5.748	0.688	0.4733
19.-	95.53	0.1	0.0100	5.261	0.201	0.0404
20.-	90.47	-4.96	24.6016	4.285	-0.7750	0.6006
Σ	1908.65		43.4665	101.358		28.8352

AMMOIDIN

BERGAPTEN

$$\bar{X} = 95.43 \%$$

$$\bar{X} = 5.06 \%$$

$$S^2 = \frac{43.4665}{19} = 2.2877$$

$$S^2 = \frac{28.8352}{19} = 1.5176$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{2.2877} = 1.512$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{1.5176} = 1.229$$

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{1.512}{4.4721} = 0.338$$

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{1.229}{4.4721} = 0.2748$$

LIMITES DE CONFIANZA

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$95.43 \pm 2.093 (0.338)$$

$$5.06 \pm 2.093 (0.2748)$$

$$95.43 \pm 0.7074$$

$$5.06 \pm 0.5152$$

P O M A D A

AMMOIDIN			BERGAPTEN (IMPUREZA)		
x (%)	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$	x (%)	$x-\bar{x}$	$(x-\bar{x})^2$
1.- 96.50	0.18	0.032	5.600	0.61	0.3721
2.- 100.96	4.64	21.5296	5.288	0.298	0.0888
3.- 98.55	2.23	4.9729	4.567	-0.423	0.1789
4.- 98.55	2.23	4.9729	5.048	0.058	0.0034
5.- 104.80	8.48	71.9104	4.951	-0.039	0.0015
6.- 96.15	-0.17	0.0289	5.769	0.779	0.6068
7.- 100.00	3.68	13.5424	4.878	-0.112	0.0125
8.- 93.33	-2.99	8.9401	4.888	-0.102	0.0104
9.- 93.27	-3.05	9.3025	5.067	0.077	0.0059
10.- 95.30	-1.02	1.0404	4.600	-0.39	0.1521
11.- 97.18	0.86	0.7396	4.788	-0.202	0.0408
12.- 95.30	-1.02	1.0404	4.613	-0.377	0.1421
13.- 93.27	-3.05	9.3025	5.067	0.077	0.0059
14.- 93.33	-2.99	8.9401	4.888	-0.102	0.0104
15.- 92.35	-3.97	15.7609	5.200	0.21	0.0441
16.- 98.50	2.18	2.1800	6.051	1.061	1.1257
17.- 94.26	-2.06	4.2436	3.160	-1.83	3.3489
18.- 92.90	-3.42	11.6964	5.130	0.14	0.0196
19.- 97.14	0.82	0.6724	4.216	-0.774	0.5991
20.- 95.48	-0.84	0.7056	6.148	1.158	0.3410
Σ 1926.40		191.5540	99.911		7.1100

AMMOIDIN

$$\bar{X} = 96.32 \%$$

$$S^2 = \frac{191.5540}{19} = 10.0817$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{10.0817} = 3.165$$

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{3.165}{4.4721} = 0.7077$$

BERGAPTEN

$$\bar{X} = 4.99 \%$$

$$S^2 = \frac{7.11}{19} = 0.3742$$

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{0.3742} = 0.61156$$

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{0.61156}{4.4721} = 0.1367$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$96.32 \pm 2.093 (0.7077)$$

$$96.32 \pm 1.4812$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm t_{.95} S_m$$

$$4.99 \pm 2.093 (0.1367)$$

$$4.99 \pm 0.2861$$

V.- COMENTARIOS Y CONCLUSIONES.

A través del presente estudio, se han podido determinar algunos -- puntos de valiosa importancia como contribución a la Química Analítica de -- las Furocumarinas, que a continuación se mencionan :

1.- Es de gran importancia, la previa separación de Furocumari-- nas por cromatografía en capa fina para su valoración individual, ya que, co-- mo en este caso, el Bergapten (Impureza), influye en la absorbancia presenta-- da por el Ammoidin (Principio Activo) al ser cuantificado por espectrofotome-- tría directa en la región de luz ultravioleta.

2.- La previa separación de excipiente o vehículo por cromatogra-- fía en capa fina para la valoración de Ammoidin (en Tintura y Pomada), evi-- ta la posible influencia en la absorbancia del fármaco, permitiendo tener ma-- yor exactitud del método analítico.

3.- De acuerdo con el estudio estadístico de los datos, se observó-- que los límites de confianza con un 5% de influencia al azar son aceptables.

4.- Se debe tomar en cuenta que, aún cuando se logró cuantificar

el Bergapten, no se pueden establecer límites de tolerancia de esta impureza, debido a que no se sabe de manera cuantitativa la influencia en el aumento — de la actividad terapéutica. Se puede advertir sin embargo, que cantidades detectables de Bergapten por cromatografía en capa fina, son suficientes para que se produzca el fenómeno de sinergismo, que como se dijo anteriormente, se manifiesta en forma tóxica tópicamente (eritema, edema e inflamaciones).

De lo anterior se concluye que :

a).- El método analítico propuesto para la valoración de Ammoin y Bergapten es adecuado y confiable.

b).- Es preferible que el Bergapten (impureza) no esté presente -- en el Principio Activo, Tabletas, Tintura y Pomada; de ésta manera se tiene -- una mayor seguridad en la acción terapéutica.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ebbell, B., The Papyrus Ebers, Levin and Munksgaard, Copenhagen -- (1937) (citado por P. Ghalioungui en Magic and Medical Science in-Ancient Egypt, Hodder and Stoughton, p. 87, 1963).
- 2.- Whitney, W. D., Atharva-Veda Samhitā (Translation and Notes), - Harvard Oriental Series, Vol. 7, Lanman, Harvard University Press, - Cambridge, Mass (1905) (citado por Fitzpatrick y Pathak, Ref. 3).
- 3.- Fitzpatrick, T. B. and Pathak, M. A., Historical Aspects of Methoxsalen and other furocumarins, J. Invest. Derm. 32, 229 (1959).
- 4.- Fitzpatrick, T. B., Hypomelanosis, J. sth. Med. Ass. 57, 995 (1964).
- 5.- Lerner, A. B., Vitiligo, J. Invest. Derm. 32, 285 (1959).
- 6.- Kugelman, T. P., and Lerner, A.B., Albinism, Partial Albinism, and Vitiligo, Yale J. Biol. Med. 33, 407 (1961).
- 7.- Robert, P., Uber Die Vitiligo, Dermatologica 86, 257 (1941).
- 8.- Abdel Monem el Mofty., Vitiligo and Psoralens, 1a. Ed., Pergamon - Press p. 96, (1968).
- 9.-
 - a) E. Späth and M. Pailer, Ber., 69, 767 (1936).
 - b) C. Lagercrantz, Acta Chem. Scand., 10, 647 (1956).
 - c) G. Rodighiero and C. Antonello, Ann Chim (Rome), 46, 960 --

(1956).

d) T. R. Seshadri and M. S. Sood, Ind. J. Chem., 1, 291 (1963).

- 10.- Dilip K. Chatterjee and Kalyanmay Sen. New Syntheses of Xanthoxol and Xanthotoxin. Tetrahedron Letters No 59 pp. 5223-5224, — 1969.
- 11.- Drugs Standards, Vol. 25 No 3, 89-92 (1957).
- 12.- Balbah, S.I., S. H. Hilal and M. Y. Haggag. Planta Med., 22 (2). 209-12, (1972).
- 13.- a) Akacic, B., and Kustrak, D.: Acta Pharm. Vogsli., 8, 205 (1958).
b) Tarpo, E., Gheorghin, M., and Contz, O.: Farmacia, 13, 331- (1965).
- 14.- Blazek, Z., and Stary, F.: Mitt. Dtsch. Pharmaz. Ges. V. Pharmaz. Ges. D. D. R. 35, 117 (1965).
- 15.- a) Ananichev, A.V.: Med. Prom. S.S.S.R., 19, 44 (1963).
b) Lutomski, J. y Szostok, H., and Speichert, H.E.: Herba Polonica 3 y 200 (1966).
c) Usmanov, B. Z. and Abubakirov, N. K. : Khim. Pharm. ZH. 5,- 45 (1967).
d) Julia Tyfczynska. Photometric Determination of Imperatorin and - Xanthotoxin by Reactions with Carbonyl - Groups. Dissert. Pharm Pharmacol, XXI, 4, 375-379 (1969).
- 16.- Beyrich, T.: Pharmazie 22, 661 (1967).
- 17.- Beyrich, T.: Pharmazie
a) 19 (1964)

- b) 20 (1965)
 c) 21, 365 (1966)
 d) Ibid.: J. Chromatography, 20, 173 (1965)
- 18.- Karawya, M. S. Khuyal, S. E., and Yojsf, G. E.: Planta Med. 18, 195 (1970).
- 19.- Abu Mustafa, E.A., El Bay, F. K., and Fayez, M. B.: Planta Medica 18, 90 (1970).
- 20.- Ibn El-Bitar, Mofradat al Adwiya, Egyptian Government Press, 1, 4 (1877).
- 21.- Fammy, I. R. and Abou Shady, H. A. A., Pharmacognostical Study - and Isolation of Crystalline Constituent, Ammoidin, J. Pharm. Pharmac. 20, 281 (1948).
- 22.- El Mofty, A. M., A Preliminary Clinical Report on the Treatment of Leucoderma with Ammi Majus Linn., J. Egypt. Med. Ass., 31, 651 -- (1948).
- 23.- El Mofty, A. M., Further Study on Treatment of Leucoderma with Ammi Majus Linn., J. Egypt. Med. Ass. 36, 1 (1952).
- 24.- Pathak, M. A. and Fitzpatrick, T. B., Relation Ship of Molecular -- Configuration to the Activity of Furocoumarins wich increase the cutaneous responses following long wave Ultraviolet radiation. J. Invest. Derm. 32, 255 (1959).
- 25.- Arnold, H. L. Jr., Effect of Methoxypsoralen on Inability to Tan, --- J. Invest. Derm. 32, 341 (1959).

- 26.- Fitzpatrick, T. B., Hopkins, C. E., Blickenstaff, D. D., and -- Swift, S., Augmented pigmentation and other responses of normal human skin to solar radiation following oral administration of 8-Methoxypsoralen, J. Invest. Derm. 25, 187 (1955).
- 27.- Imbrie, J. D., Daniels, F., Jr., Bergeron, L., Hopkins, C. E. and Fitzpatrick, T. B., Increased erythema threshold six weeks after a -- single exposure to sunlight plus oral Methoxypsoralen, J. Invest. Derm. 32, 331 (1959).
- 28.- Lerner, A.B., Denton, C. R. and Fitzpatrick, T. B., Clinical Experi -- mental Studies with 8-Methoxypsoralen in Vitiligo, J. Invest. Derm. 20, 299 (1959).
- 29.- Fitzpatrick, T. B. and Lerner, A. B., datos no publicados (citados -- por Fitzpatrick y Pathak, Ref. 3).
- 30.- Imbrie, J. D., Bergeron, L. and Fitzpatrick, T. B., Follow up study of effect of oral Methoxsalen (8-Methoxypsoralen) on sunburn and -- Suntan, Acta Derm. 82, 617 (1960).
- 31.- Buck, H. W., Magnus, L. A. and Porter, A. D., The Action Spec -- trum of 8-Methoxypsoralen for Erythema in Human Skin Preliminary -- studies with a Monochrometer, Br. J. Derm. 72 249 (1960).
- 32.- Pathak, M. A., Mechanism of Photosensitization and in vivo Biologi -- cal Action Spectrum of 8-Methoxypsoralen, J. Invest. Derm. 27, -- 397 (1961).
- 33.- Jarrett, A. J. and Szabó, G., The Pathological Varieties of Vitili -- go and their Response to Treatment with Meladinine, Br. J. Derm. - 68, 313 (1956).

- 34.- Nobuyuki, Mizuno: Igaku no Ayumi 63 (12), 637-46 (1967).
- 35.- Rodighiero, Giovanni; Musajo Luigi; Dall' Acqua, Francesco; Marciani, Sebastiano; Caporale Giuseppe; Ciavatta, M. L., Comparison between the Photoreactivity of some Furocoumarins with Native DNA, -- and their skin Photosensitizing Activity. Experientia, 25 (5), 479-81, (1969).
- 36.- Rodighiero, Giovanni; Musajo Luigi; Dall' Acqua, Francesco; Marciani, Sebastiano; Caporale, Giuseppe; Ciavatta, M., Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins photoreactivity of various furocoumarins with native DNA, and with Ribosomal RNA, Biochim. --- Biphys. Acta 217 (1), 40-9 (1970).
- 37.- Musajo, Luigi; Rodighiero, G. Photo-C₄-Cycloaddition Reaction Between skin photosensitizing furocoumarins and Nucleic Acids. Photo -- chem. Photobiol. 11 (1), 27-35 (1970).
- 38.- L. Musajo, G. Rodighiero and G. Caporale, Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 1213 (1954).
- 39.- L. Musajo and G. Rodighiero, Experientia 18, 153 (1962).
- 40.- M. A. Pathak, J. H. Fellman and K. D. Kaufman, J. Invest. Derm. 35, 165 (1960).
- 41.- M. A. Pathak, L. R. Warder and K. D. Kaufman, J. Invest. Derm.-- 48. 103 (1967).
- 42.- G. Caporale, L. Musajo, G. Rodighiero and F. Baccichetti, Experientia, 23, 985 (1967).

- 43.- C. G. Hatchard and C. A. Parker, Proc. R. Soc. 235, 518 (1956).
- 44.- Palicska, Janos; Lengyel Bertalon. Photodynamically Active Furo-coumarin Derivatives from plants causing skin inflammation. Borgyosy. Venerol. Szemle, 45 (3), 118-24 (1969).
- 45.- Raouf E. Harim; Robert, G. Freeman; A. Clark Griffin, and John M.-Know. Experimental toxicologic studies on 8-Methoxypsoralen in animals exposed to long. Ultraviolet. J. Pharmacol. Exptl. Therap. - 131, 394-9 (1961)
- 46.- Elwi, M. A.: J. Roy, Egypt Med. Soc. 33:773 (1950)
- 47.- Dawwod El-Antaki: Tazkaret oil El-Albab, Egyptian Government - - Press. 3rd. Ed. 1:32. (1923).
- 48.- Karawya, M. S.; Khawwal, S. E.; Youssef, G. F. Estimation of Xanthotoxin, Imperatorin, and Bergapten in Ammi Majus fruit and formulations. Planta Med. 18 (3), 195-200 (1970).
- 49.- Beyrich, T.: Pharmazie 20 (1965).