



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**PRUEBAS DE IDENTIDAD, EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA ESPECIE MEDICINAL
Conyza filaginoides (Asteraceae)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. BERENICE OVALLE MAGALLANES



TUTORA: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG AÑO: 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Alfredo Ortega Hernández
Vocal: Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal: Dra. Araceli Peña Álvarez
Vocal: Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Secretario: Dr. Francisco Hernández Luis

Lugar donde se realizó la tesis:

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

Parte de los resultados obtenidos a partir de este proyecto se presentaron en la 7ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dr. Pedro Joseph Nathan” (México, 2011).

Q.F.B. Berenice Ovalle Magallanes
Sustentante

Dra. Rachel Mata Essayag
Tutora

Agradecimientos

Al Posgrado de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través de su Programa de Maestría me permitió incorporarme a esta gran casa de estudios para continuar mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al CONACyT y a DGAPA-UNAM por el financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT 99395 y DGAPA-UNAM (IN218110).

A los miembros del jurado, quienes con sus acertados comentarios sobre el escrito enriquecieron la versión final del mismo.

A la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz, por su invaluable apoyo para la realización de la parte analítica de este trabajo. A la Dra. Guadalupe Esther Ángeles López y al Dr. Fernando Gabriel Brindis Hernández, a quienes agradezco su tiempo y enseñanzas para el desarrollo de los estudios farmacológicos de esta tesis.

A la Q. Georgina Duarte Lisci de la Unidad de Servicios Analíticos para la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, por el apoyo y asesoría brindados en la realización de los estudios de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas.

Agradezco especialmente a mi tutora, la Dra. Rachel Mata Essayag por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de trabajo. Por su tiempo, paciencia y dedicación continuos, por transmitirme parte de sus conocimientos y guiarme en mi desarrollo personal y profesional, gracias Doctora.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
Lista de Cuadros	iii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tablas	v
Lista de Abreviaturas	vi
RESUMEN	1
Abstract	3
I. ANTECEDENTES	5
1.1 Generalidades sobre las monografías de plantas medicinales de la OMS	5
1.2 Generalidades sobre <i>Conyza filaginoides</i> (DC.) Hieron.....	9
1.2.1 Aspectos taxonómicos	9
1.2.2 Distribución geográfica.....	11
1.2.3 Aspectos etnobotánicos.....	12
1.2.4 Investigaciones farmacológicas.....	16
1.2.5 Constituyentes químicos	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	34
III. DESARROLLO EXPERIMENTAL	36
3.1 Adquisición del material vegetal	36
3.2 Preparación de los extractos (orgánico y acuoso) y aceite esencial a partir del material seco y molido de <i>Conyza filaginoides</i>	36
3.3 Parámetros de Identidad Química.....	37
3.3.1 Análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i> por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	37
3.3.2 Análisis de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> determinados por la técnica de microextracción en fase sólida	38
3.4 Parámetros de composición química	38
3.4.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de <i>C. filaginoides</i> por CCF	38

3.4.2	Establecimiento de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de <i>C. filaginoides</i> por CLAE	39
3.4.3	Desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación del flavonoide rutina (6) por CLAE	40
3.4.4	Cuantificación de rutina (6) presente en el extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i>	43
3.5	Eficacia preclínica: Ensayos Biológicos	43
3.5.1	Evaluación de la toxicidad aguda	44
3.5.2	Evaluación del potencial antinociceptivo	44
3.5.3	Evaluación de la actividad sobre la motilidad intestinal.....	46
3.5.4	Evaluación del potencial antidiabético de los extractos orgánico y acuoso ..	47
3.5.5	Análisis Estadístico.....	50
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
4.1	Ensayos de identidad.....	51
4.1.1	Perfiles cromatográficos del aceite esencial.....	51
4.1.2	Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles presentes en la planta completa	60
4.2	Ensayos de composición	68
4.2.1	Perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de <i>C. filaginoides</i> por CCF	68
4.2.2	Establecimiento de los perfiles cromatográficos mediante CLAE.....	70
4.2.3	Validación de un método analítico por CLAE	72
4.2.4	Cuantificación de rutina (6) en el extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i>	82
4.3	Eficacia preclínica. Estudios biológicos	82
4.3.1	Toxicidad aguda	83
4.3.2	Evaluación del potencial antinociceptivo	84
4.3.3	Evaluación sobre la motilidad intestinal	88
4.3.4	Evaluación del potencial antidiabético	90
V.	CONCLUSIONES	112
VI.	PERSPECTIVAS	115
VII.	BIBLIOGRAFÍA	116

Lista de Cuadros

Cuadro		Página
1	Preparados medicinales que contienen simonillo	15
2	Constituyentes químicos de <i>Conyza filaginoides</i>	23
3	Metabolitos representativos de especies selectas de <i>Conyza</i>	27
4	Constituyentes del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i>	53
5	Compuestos volátiles determinados por HS-MEFS-CG-EM	62

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Muestra de herbario de <i>Conyza filaginoides</i>	11
2	Distribución geográfica de <i>C. filaginoides</i>	12
3	Ilustración de <i>Conyza filaginoides</i>	13
4	Proceso de reparto del extracto CH ₂ Cl ₂ : MeOH (1:1) de <i>C. filaginoides</i>	39
5	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i> . Muestra diluida (0.005mg/mL)	58
6	Cromatograma del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i> . Muestra concentrada (0.05 mg/mL)	59
7	Cromatograma de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra PDMS	65
8	Cromatograma de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra CAR/PDMS	66
9	Cromatograma de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra DVB/CAR/PDMS	67
10	Perfil cromatográfico por CCF. A. Extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> . B. Partición del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> .	69
11	Perfil cromatográfico por CCF del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i>	69
12	Perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i>	73
13	Perfil cromatográfico por CLAE del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i>	74
14	Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la rutina	76
15	Gráfica de la evaluación de la linealidad del método	78
16	Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> . Placa caliente	85

Lista de Figuras (Continuación)

Figura		Página
17	Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i> . Placa caliente	86
18	Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> . Estiramiento abdominal	88
19	Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i>	89
20	Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales normoglucémicos. A. Dosis 100 mg/kg. B. Dosis 316 mg/kg	92
21	Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos	93
22	Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos. A. Dosis 100 mg/kg, B. Dosis 177 mg/kg y C. Dosis 316 mg/kg.	94
23	Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos. A. Dosis 177 mg/kg y B. Dosis 316 mg/kg.	96
24	Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales normales	98
25	Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos	98
26	Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos. A. Dosis 100 mg/kg y B. Dosis 316 mg/kg	99
27	Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos. A. Dosis 100 mg/kg, B. Dosis 177 mg/kg y C. Dosis 316 mg/kg	100
28	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos	103
29	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos	103
30	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos. A. Dosis 100 mg/kg. B. Dosis 316 mg/kg	104
31	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos. A. Dosis 100 mg/kg. B. 177 mg/kg y C. 316 mg/kg	105
32	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos.	106

Lista de Figuras (Continuación)

Figura		Página
33	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos	106
34	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de <i>C. filaginoides</i> en animales sanos. A. Dosis 177 mg/kg. B. Dosis 316 mg/kg	107
35	Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i> en animales diabéticos. A. Dosis 100 mg/kg. B. Dosis 177 mg/kg y C. Dosis 316 mg/kg	108

Lista de Tablas

Tabla		Página
1	Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLAE para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de <i>C. filaginoides</i>	40
2	Componentes del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i> . Muestra diluida (0.005 mg/mL)	56
3	Componentes del aceite esencial de <i>C. filaginoides</i> . Muestra concentrada (0.05 mg/mL)	57
4	Resultados del análisis de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra PDMS	63
5	Resultados del análisis de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra CAR/PDMS	63
6	Resultados del análisis de los compuestos volátiles de <i>C. filaginoides</i> . Fibra DVB/CAR/PDMS	63
7	Comparación de los resultados obtenidos con las distintas fibras empleadas	64
8	Resultados experimentales de la curva de calibración de rutina	76
9	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema	77
10	Resultados de la linealidad del método cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel	78
11	Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método	79
12	Resultados experimentales de repetibilidad	80
13	Determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	81
14	Rutina cuantificada en el extracto orgánico de <i>C. filaginoides</i>	82
15	Toxicidad aguda de los extractos íntegros de <i>C. filaginoides</i>	84

Lista de Abreviaturas

ABC	Área bajo la curva
ACA	Acarbosa
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ANADEVA	Análisis de varianza
b₀	Ordenada al origen
b₁	Pendiente
CAR	Carboxen
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CV	Coefficiente de variación
DIP	Dipirona
DL₅₀	Dosis letal media
DVB	Divinilbenceno
EEM	Error estándar de la media
ES COP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
GLI	Glibeclamida
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorhídrico
HS	Head space, fase de vapor
IC (β₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
IC (β₀)	Intervalo de confianza para la ordenada
ICDRA	Conferencia Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos
ICH	International Conference on Harmonisation
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
IR	Índice de Retención de Kováts
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección

LOP	Loperamida
MEFS	Microextracción en fase sólida
MeOH	Metanol
MOR	Morfina
MS-TOF	Espectrometría de Masas Tiempo de Vuelo
Na₂SO₄	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NIST	National Institute of Standards and Technology
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p.o.</i>	<i>per os</i> , vía oral
PDMS	Polidimetilsiloxano
R	Coeficiente de correlación
R²	Coeficiente de determinación
S_b	Varianza de la pendiente
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VEH	Vehículo
WHA	World Health Assembly
WHO	World Health Organization

RESUMEN

El presente trabajo describe las investigaciones realizadas sobre algunos preparados fitoquímicos de *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron (*Asteraceae*), planta endémica empleada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de afecciones del tracto gastrointestinal y la diabetes, con la finalidad de establecer algunos parámetros de calidad, eficacia y seguridad preclínicas, para generar su monografía científica de acuerdo a los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.

En primera instancia, se establecieron los perfiles cromatográficos del aceite esencial obtenido por hidrodestilación y de los compuestos volátiles determinados mediante microextracción en fase sólida (HS-MEFS), empleando Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). La identificación de los compuestos se realizó mediante el cálculo de los índices de retención y con la comparación de los espectros de masas resultantes con los reportados en la literatura científica. En el aceite esencial se identificaron 44 compuestos, de los cuales fueron mayoritarios el alcohol (*Z*)-3-hexen-1-ol (11.60%), los terpenoides *trans*-pinocarveol (11.52%), *cis*-sabinol (9.88%), óxido de cariofileno (8.72%), pulegona (7.13%), isoeugenol (6.82%) y *o*-cimeno (5.07%). Por otra parte, la aplicación de la técnica de HS-MEFS utilizando distintas fibras (PDMS, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS), permitió determinar que los compuestos volátiles presentes en la planta completa fueron los monoterpenoides *p*-cimeno, α -felandreno, *m*-cimeno, limoneno, β -felandreno, β -pineno, γ -terpineno, *o*-cimeneno, terpinoleno, 3-careno, α -terpineno y (\pm)- α -pineno.

Se desarrolló y validó un método analítico por CLAE que permitió cuantificar al flavonol rutina en el extracto orgánico. Las condiciones optimizadas fueron las siguientes: Columna Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m, 250x4.0 mm), fase móvil ternaria (MeOH-ACN-H₂O + H₃PO₄ 1%), elución gradiente lineal (5% MeOH, 15-40% ACN, 0-15 min) λ = 254 nm, velocidad de flujo 1.2 mL/min, volumen de inyección 20 μ l y detector UV-Vis. Este método resultó ser lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones evaluado y constituye una prueba de composición para la especie.

El estudio toxicológico en ratón aplicando el método de Lorke permitió comprobar que los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* no son tóxicos; la dosis letal media (DL₅₀) para ambos fue mayor a 5000 mg/kg. En lo que respecta a la eficacia preclínica, las propiedades antinociceptivas del extracto orgánico (31.6-316 mg/kg) se evaluaron en los modelos farmacológicos de placa caliente y estiramiento abdominal. En el primer caso se obtuvo un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis. De manera adicional, la actividad antiespasmódica del extracto acuoso se evaluó en un modelo de tránsito intestinal, obteniéndose un efecto importante a la dosis más alta ensayada (316 mg/kg).

Como parte de las evaluaciones preclínicas, se realizaron también experimentos para establecer el potencial hipoglucemiante y antihiper glucémico de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* en ratones normoglucémicos y diabéticos (estreptozotocina, 100 mg/kg). Los resultados obtenidos en un experimento hipoglucemiante agudo revelaron que los extractos orgánico y acuoso poseen un efecto hipoglucemiante significativo en ratones normales (100- 316 mg/kg), mientras que en animales diabéticos este efecto se observó sólo para el extracto acuoso (177 mg/kg y 316 mg/kg). Por otra parte, los resultados de un modelo de tolerancia a la glucosa demostraron que el extracto orgánico inhibe el aumento de glucemia ocasionado por la administración de la carga de este carbohidrato en animales sanos (177 mg/kg y 316 mg/kg) y diabéticos (100 mg/kg, 177 mg/kg y 316 mg/kg) de forma independiente de la dosis.

Los extractos acuoso y orgánico (100, 177 y 316 mg/kg) presentaron además un efecto antihiper glucémico en animales sanos y diabéticos en experimentos de tolerancia a la sacarosa. El mejor efecto se obtuvo con el extracto acuoso a la dosis de 100 mg/kg en animales diabéticos.

Abstract

The main goal of this work was to establish some quality control, efficacy and toxicological parameters to *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron (*Asteraceae*), a Mexican medicinal herb widely used in Mexican popular medicine to treat gastrointestinal disorders and diabetes.

First, chromatographic profiles of the essential oil obtained by hydrodistillation and volatile compounds extracted by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), were obtained using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). For identification purposes, retention indexes (RI) were calculated and the resulting mass spectra were compared with those of scientific literature. Analysis of the essential oil allowed identification of 44 compounds of which (*Z*)-3-hexen-1-ol (11.60%), *trans*-pinocarveol (11.52%), *cis*-sabinol (9.88%), caryophyllene oxide (8.72%), pulegone (7.13%), isoeugenol (6.82%) and *o*-cimene (5.07%) were the most abundant. When using different polarity fibers (PDMS, CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS) in HS-SPME technique, main volatile compounds identified in the whole plant were *p*-cimene, α -phellandrene, *m*-cimene, limonene, β -phellandrene, β -pinene, γ -terpinene, *o*-cimenene, terpinolene, 3-carene, α -terpinene and (\pm)- α -pinene.

An HPLC method was developed and validated to quantify the flavonol rutin in the organic extract of the plant. The analytical conditions were: Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m, 250 \times 4.0 mm) column, a ternary mobile phase (MeOH-ACN-H₂O + H₃PO₄ 1%), a lineal gradient elution (5% MeOH, 15-40% ACN, 0-15 min), a flow of 1.2 mL/min, injection volume 20 μ l. The detector was set at 254 nm. This method was linear, precise and accurate in the concentration range evaluated and can be regarded as a composition test for this plant.

According to Lorke's procedure both organic and aqueous extracts of *C. filaginoides* were not toxic to mice; their lethal medium doses were higher than 5000 mg/kg. Preclinical analgesic efficacy of the organic extract (31.6-316 mg/kg) was evaluated using the hot plate and writhing tests. In the former case, a dose-dependent response was observed. Furthermore, the antispasmodic activity of the aqueous extract was established using a gastrointestinal motility test; a significant effect was observed at the higher dose (316 mg/kg) evaluated.

Finally, the hypoglycemic and antihyperglycemic potential of the organic and aqueous extracts of *C. filaginoides* were evaluated in both normal and diabetic mice. In an acute hypoglycemic test, organic and aqueous extracts showed a significant hypoglycemic effect in healthy mice (100-316 mg/kg). In diabetic mice however, this effect was only observed for the aqueous extract (177 mg/kg and 316 mg/kg). The results for the organic extract in an oral glucose tolerance test showed an inhibition of the postprandial peak in normal (177 mg/kg and 316 mg/kg) and diabetic mice (100 mg/kg, 177 mg/kg and 316 mg/kg). The effect was not dose-dependent.

The organic and aqueous extracts (100, 177 and 316 mg/kg) showed an antihyperglycemic effect in an oral sucrose tolerance test in both normal and diabetic mice. Best antihyperglycemic effect was achieved when the aqueous extract was used in diabetic mice (100 mg/kg).

I. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre las monografías de plantas medicinales de la OMS

Las medicinas tradicional, complementaria y alternativa provocan una gama de reacciones que van del entusiasmo al escepticismo. Si bien la medicina tradicional está arraigada en las prácticas médicas de los países en vías de desarrollo y constituye uno de los recursos principales de atención a la salud, el número de personas que emplean medicinas alternativa y complementaria ha aumentado rápidamente en los países desarrollados (WHO, 2002; WHO, 2008).

La medicina tradicional ofrece diversidad, accesibilidad y bajos costos que la hacen popular entre los más diversos sectores poblacionales. Las plantas medicinales se emplean en todo el mundo en formas variadas; se usan como remedios caseros y como preparados fitoterapéuticos, se les vende como materias primas al menudeo o se comercializan a la industria farmacéutica.

A pesar de su relevancia socioeconómica y de su uso generalizado y ancestral, la medicina tradicional enfrenta problemáticas como la evidencia científica insuficiente que sustente su uso y la falta de reconocimiento oficial por parte de las autoridades de salud en muchos países del mundo. Además, su uso en conjunto o en sustitución de la medicina alopática ha generado debates entre profesionales de la salud, instituciones de políticas sanitarias y el público en general respecto a su seguridad, eficacia, calidad y disponibilidad (WHO, 2000).

En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) emitió a sus países miembros una serie de resoluciones (WHA31.33, 1978, WHA40.33, 1987 y WHA42.43, 1989) en las que enfatizaba la necesidad de asegurar la calidad de los productos medicinales a base de plantas empleando las técnicas modernas y con estándares adecuados. Ya desde 1986 la Cuarta Conferencia Internacional de Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA

por sus siglas en inglés) había recomendado a la OMS la elaboración de listas de plantas medicinales de mayor uso y las especificaciones que debían cumplir los preparados en venta (WHO, 1998).

Luego de un arduo trabajo de investigación en artículos de revisión y farmacopeas (Internacional, Africana, Británica, China, Alemana, Europea, Francesa, Alemana, Húngara, India y Japonesa), la OMS bosquejó monografías que sometió a revisión de expertos en diversos campos, como medicina tradicional, elaboración de farmacopeas y preparados farmacéuticos, evaluación de medicamentos y autoridades regulatorias en más de 40 países. En la octava conferencia de la ICDRA celebrada en 1996, 28 monografías modelo fueron presentadas, las cuales constituirían posteriormente el primer volumen publicado de monografías de plantas medicinales selectas en 1999. A esta publicación le seguirían el volumen 2 con 30 monografías en 2002, el volumen 3 con 31 monografías en 2007 y 28 monografías en el cuarto volumen de 2009, así como un volumen especial con 30 monografías de plantas empleadas en los estados europeos de independencia reciente, principalmente en Europa Oriental, y que fuera publicada en 2010 (WHO, 2011a). Diecisiete de las monografías incluidas en este último volumen constituyen una versión actualizada de monografías publicadas anteriormente, indicando el interés continuo de la OMS por uniformar a nivel global los criterios de calidad, eficacia e inocuidad de plantas medicinales de mayor consumo.

Una monografía tipo OMS consta esencialmente de dos partes. En la primera parte se hace un resumen farmacopeico cuyo objetivo es el aseguramiento de la calidad, con apartados como aspectos botánicos, pruebas de identidad, pureza, ensayos químicos y principales constituyentes químicos. Esta sección es de vital importancia ya que la buena calidad de las drogas y sus preparados es el pilar fundamental para la eficacia y seguridad de los mismos. La segunda parte está constituida por una revisión extensiva de la literatura científica, la descripción de estudios farmacológicos, toxicológicos y aplicaciones clínicas de la planta, así como información detallada sobre sus advertencias de uso, contraindicaciones, precauciones, reacciones adversas y dosificación. Además, se

incluyen índices acumulativos de todas monografías publicadas con los nombres científicos y comunes y los constituyentes químicos de las plantas (WHO, 2011a).

Las monografías de la OMS, además de proporcionar información científica en cuanto a la seguridad, eficacia, control y aseguramiento de la calidad de las plantas medicinales de mayor uso fomentando el empleo racional de éstas, pretenden ser la guía para que cada país desarrolle monografías propias y de ese modo se enriquezca el conocimiento sobre medicina tradicional a nivel regional, favoreciendo el intercambio de información entre todos los países miembros (WHO, 2011a).

A nivel mundial los avances en materia son variados. En países como India o China y a pesar de que la medicina tradicional constituye uno de los pilares fundamentales en los sistemas de salud, la publicación de monografías es reciente. La Farmacopea Herbolaria China de 2004 enlista 300 plantas de uso extendido, formulaciones y dosificaciones para padecimientos diversos (Committee of Chinese Medicine and Pharmacy, 2011). La Farmacopea Herbolaria India de 2002 comprende 52 monografías de plantas medicinales que sobresalen por sus procedimientos de aseguramiento de calidad, afianzando a este país como uno de los principales productores de extractos y productos fitoquímicos estandarizados (WHO, 2011a). Por su parte, la Farmacopea Herbolaria Africana de 2010 desarrollada por la Asociación de Estándares de Plantas Medicinales Africanas cuenta con 50 monografías de las plantas más importantes de ese continente; destacan los análisis micromorfológicos de las plantas, mapas de distribución, marcadores cromatográficos y sustancias adulterantes (WHO, 2011b).

En Europa la situación es un tanto diferente. El reconocimiento oficial y el desarrollo paralelo con la medicina alopática han permitido la publicación de farmacopeas herbolarias que establecen los estándares de calidad y seguridad de las plantas medicinales y preparados fitoterapéuticos disponibles. Sobresale el caso de Alemania, cuyo Ministerio de Salud estableció en 1978 la Comisión E, un órgano constituido por expertos encargados de la evaluación de la seguridad y eficacia de los preparados herbolarios disponibles en las farmacias. El análisis de más de 300 preparados condujo a la publicación de 380 monografías y 81 revisiones en 1983 y que a la fecha

constituyen una de las fuentes de información más confiables sobre fitomedicamentos del mundo (American Botanical Council, 2011).

Los trabajos de la Comisión E pusieron de manifiesto la amplia variedad de preparados disponibles en los mercados europeos. En respuesta a ello 15 países de Europa Occidental fundaron en 1989 la ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), que de 1997 a 2010 ha publicado 108 monografías divididas en volúmenes o fascículos de 10 monografías cada uno. Las monografías ESCOP tratan principalmente aspectos terapéuticos de los fitomedicamentos como los usos, efectos secundarios y contraindicaciones, así como información adicional destinada a profesionales de la salud (ESCOP, 2011).

En lo que respecta a las publicaciones farmacopeicas, la Farmacopea Europea contiene una monografía sobre la elaboración de extractos vegetales y un apartado de monografías de extractos de origen vegetal, donde se enfatiza la composición cuantitativa y cualitativa de extracto (European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2011). Por su parte, la Farmacopea Herbolaria Británica de 1996 contiene monografías que brindan estándares de calidad de 169 plantas y que indican técnicas de identificación cromatográfica y acciones farmacológicas (British Herbal Medicine Association, 2011). En nuestro continente, la Farmacopea Herbolaria Americana® ha publicado 29 monografías de tipo cualitativo y terapéutico en las que se incluyen algunas plantas representativas de la medicina china y ayurvédica de mayor uso en Estados Unidos (American Herbal Pharmacopoeia, 2011).

Respondiendo al llamado de la OMS las autoridades de salud de nuestro país publicaron en 2001 la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, pionera en su tipo en el continente. Sus contenidos abarcan seguridad, preparación y almacenamiento de plantas medicinales y derivados; está conformada por 20 monografías de análisis específicos, 41 monografías de plantas y 23 monografías de aceites esenciales, así como índices etnobotánicos de usos de numerosas plantas altamente valoradas en la medicina popular de México, incluyendo *Conyza filaginoides* (COFEPRIS, 2011). No obstante la vasta medicina tradicional existente debida a la diversidad geográfica,

botánica y cultural, la información presentada en esta primera edición de la Farmacopea Herbolaria es insuficiente y no cubre las plantas endémicas de mayor uso por la población mexicana actual. De ahí que sea necesario investigar científicamente estos recursos medicinales para garantizar su uso racional y establecer el marco legal apropiado para la regulación de estos productos.

1.2 Generalidades sobre *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron

1.2.1 Aspectos taxonómicos

La familia asterácea es la más grande de las dicotiledóneas y agrupa diferentes tipos de plantas, desde arbustos hasta árboles de tamaño medio (Cronquist, 1988). En México se reconocen 3,005 especies nativas distribuidas en 392 géneros (Villaseñor, 1993). Las asteráceas tienen una gran relevancia en las prácticas médicas populares, ya que diversos miembros de esta familia botánica como el estafiate (*Artemisia ludoviciana*), el zoapatle (*Montanoa tomentosa*), la manzanilla (*Matricaria recutita*) y el árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*), por mencionar algunos, son empleados con frecuencia (Heinrich *et al.*, 1998).

Los géneros que componen a las asteráceas poseen diferencias morfológicas y fitoquímicas que permiten subdividirlos en tribus o subgrupos. Una de las tribus presentes en América es la Astereae que comprende aproximadamente 170 géneros; *Erigeron*, *Aster* y *Conyza* son representativos (Heinrich *et al.*, 1998). La tribu Astereae ha sido objeto de estudios filogenéticos y quimiotaxonómicos, puesto que las transiciones entre varios géneros, como *Erigeron* y *Aster*, *Erigeron* y *Conyza* o *Laennecia* y *Conyza* no son fáciles de identificar (Cronquist, 1988; Christensen y Lam, 1991).

La diferenciación entre especies de *Conyza*, *Laennecia* y *Erigeron* ha sido asentada en diversos estudios taxonómicos (Nesom, 1990a). En este sentido, algunas especies de *Conyza* han sido clasificadas varias veces bajo el género *Laennecia* (Nesom, 1990b).

Las plantas del género *Conyza* son de tipo perenne, con tallos rectos que se ramifican en forma distal y que pueden ser glabros o hispídos. Se diferencian de otros géneros de Asteraceae por sus capítulos, que presentan flores amarillentas o blanquecinas de dos tipos: las interiores son hermafroditas y tubulares y las exteriores son femeninas, filiformes o cortamente liguladas. Se conocen aproximadamente 50 especies en el género, distribuidas en zonas subtropicales y templadas (The Bay Science Foundation, 2010).

En nuestro país algunas especies representativas del género son *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist, *Conyza coronopifolia* Kunth y *Conyza gnaphalioides* Kunth (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Conyza filaginoides es una planta anual de 30 a 60 cm de altura, con abundantes pelos y aspecto lanoso (**Figura 1**). Tiene hojas elípticas, de 1 a 3 cm de largo, con uno a cinco dientes en cada lado de la hoja. Las flores son terminales, agrupadas en cabezuelas de color blanco verdosas (Martínez, 1979; Argueta Villamar, 1994). *Conyza filaginoides* fue clasificada anteriormente como *Laennecia filaginoides*, siendo estos nombres aceptados como sinónimos (The International Plant Name Index, 2010).



Figura 1. Muestra de herbario de *Conyza filaginoides* (Tomado de Muestras Neotropicales de Herbario. The Field Museum.)

1.2.2 Distribución Geográfica

Las especies del género *Conyza* están ampliamente distribuidas en zonas de climas subtropicales y templados. *Conyza filaginoides* habita entre los 1900-2240 y 2700-3100 m sobre el nivel del mar, en clima semicálido y templado. Está asociada a matorral xerófilo, pastizal y bosques de encino, pino y juníferos, con abundancia desde el norte de México, Hidalgo, Estado de México, Oaxaca, Morelos, Michoacán, Guanajuato y hasta Guatemala (Martínez, 1989). Se le encuentra entre julio y octubre y florece en septiembre (Zolla, 1994). En la **Figura 2** se muestra un mapa con su distribución geográfica en nuestro país.

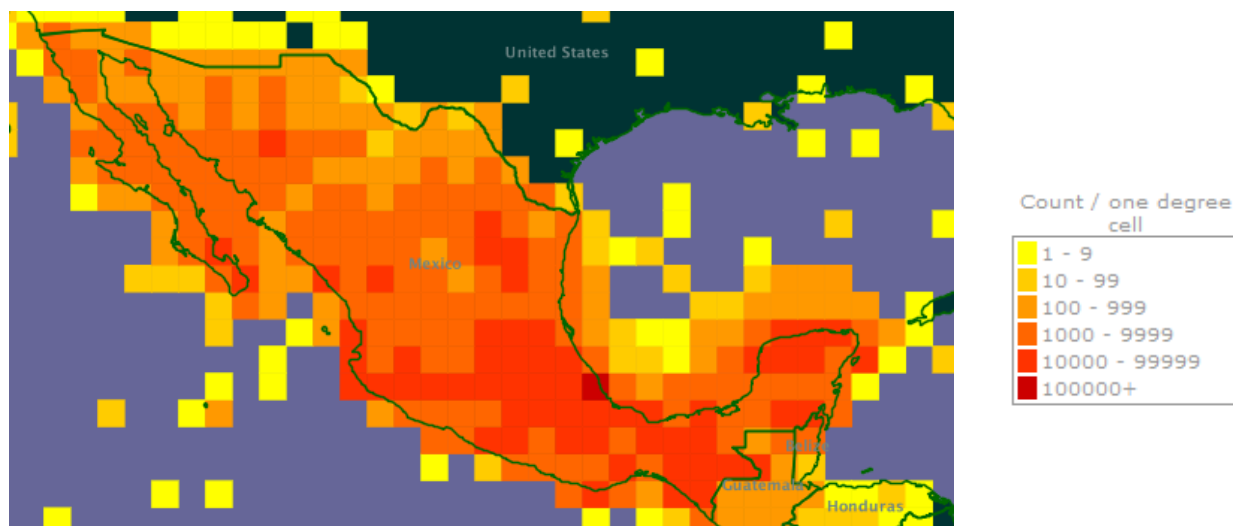


Figura 2. Distribución geográfica de *C. filaginoides* (Tomado de Global Biodiversity Information Facility.)

1.2.3 Aspectos etnobotánicos

Conyza filaginoides es conocida como simonillo, falso zacatechichi, gordolobo, hierba de las ánimas, rosilla, simonío y zacachichíc. Cabe destacar que otras especies del género *Conyza* se designan también como simonillo, tal es el caso de *Conyza coronopifolia* Kunth. (Martínez, 1979; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La documentación del uso tradicional indígena de *Conyza filaginoides* se remonta a la época colonial, cuando Francisco Hernández la incluye en su obra del siglo XVI, *Historia Natural de Nueva España*, donde la describe como *tzonpopoto* o *cabellos fétidos*: “tiene el tzonpopoto raíz transversal, provoca la orina y mitiga su acidez mezclado con *atolli*; consume las excrecencias de las úlceras. El jugo exprimido de esta hierba, purga por el conducto superior todos los humores, pero principalmente la bilis y las flemas. Además, cura el empacho, excita el apetito, favorece a los que sufren acedías, cura el prurito de los ojos, es eficaz para calmar la tos, quitar la flatulencia y apaciguar el vientre” (Hernández, 1959).

Posteriormente en 1801, Fray Juan Navarro, en *Historia Natural o Jardín Americano* la describe como “tzonpotón o tlacochichi, *id est*, vara amarga. Son dos especies, ésta y otra de hojas más delgadas que nace en Huexotzingo. Las raíces de ambas son olorosas, resinosas, calientes y secas en tercer grado, de virtud astringente y sabor amargo; curan la repleción, provocan el mes, abren la gana de comer, dicen que su cocimiento cura el pecho, ronchas y comezón (Navarro, 1992)”. Probablemente, la otra especie a la que se refiere sea el zacatechichi (*Calea zacatechichi*), que se describe e ilustra en esta misma obra; a la postre está última ha sido interpretada como *Conyza filaginoides* (**Figura 3**). Es necesario destacar esta confusión debido a que ambas plantas han sido empleadas popularmente para los mismos padecimientos y a veces se han utilizado indistintamente con el nombre común de simonillo (Martínez, 1989).



Figura 3. Ilustración de *Conyza filaginoides*
(Tomado de *Historia Natural o Jardín Americano*. Navarro, 1992).

A fines del siglo XIX e inicios del siglo XX el Instituto Médico Nacional emprende el estudio químico, histoquímico y medicinal de diversas especies de plantas,

animales y compuestos minerales de uso popular medicinal; *Conyza filaginoides* figura dentro de tales investigaciones. Por una década se describen sistemáticamente los estudios químicos y clínicos realizados con la especie (Instituto Médico Nacional, 1894).

En la obra de Fernando Altamirano, *Materia Médica Mexicana: A Manual of Mexican Medicinal Herbs* fechado en 1904 se encuentra una nota informativa acerca del simonillo. Éste es uno de los compendios más importantes respecto a los trabajos realizados por el Instituto Médico Nacional; allí se plasman en el idioma Inglés los conocimientos más relevantes generados sobre las plantas medicinales, drogas y sustancias minerales más extensamente usados en México por sus aplicaciones médicas y farmacéuticas (Altamirano, 1904).

Las dosis y formas de preparación del simonillo fueron asentadas en las investigaciones clínicas realizadas por el Instituto Médico Nacional. La infusión preparada con 5 gramos de planta seca y troceada en 200 gramos de agua hirviendo probó ser una de las más útiles en el tratamiento de afecciones digestivas (Farmacopea Nacional, 1936). En casos de constipación y flatulencia se empleaba una fórmula preparada mediante decocción de 20 gramos de planta y 500 gramos de agua hirviendo y administrada vía enema (Altamirano, 1904). En la Nueva Farmacopea de la Sociedad Farmacéutica de México se señala que el extracto hidroalcohólico se usaba en dosis de 2 a 5 gramos y que la tintura contenía 20 centigramos por gramo de principios activos de la planta (Sociedad Farmacéutica, 1896).

Ahora bien, los usos y formas de preparación tradicionales del simonillo se han conservado desde sus primeras descripciones en la literatura; las partes aéreas se emplean en problemas del aparato digestivo, principalmente en casos de cólicos, flatulencia y dolor epigástrico, además de servir como colagogo y aperitivo (Mendoza, 1997; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Otros usos descritos son como emético, para infecciones oculares, para el alivio de tos y expulsión de flemas, dolor hepático y náuseas (Farmacopea Nacional, 1936; Martínez, 1989), y más recientemente para el tratamiento de la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

La droga cruda comercializada consiste en la planta completa (ocasionalmente sólo las partes aéreas) desecada de *Conyza filaginoides* (Hersch-Martínez, 1997). El simonillo se emplea en infusión, 10 gramos de droga en un litro de agua, y se consume una taza en la mañana en ayunas (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). De manera adicional, Monroy-Ortiz y Castillo-España en su libro Plantas Medicinales Utilizadas en el estado de Morelos (2007) señalan su uso en combinación con *Calea zacatechichi*. Para ello tres ramas de simonillo y 4 hojas de *C. zacatechichi* se colocan en un litro de agua, la mezcla se hierve y se deja reposar. La infusión se utiliza ingiriendo una taza antes de cada comida. La planta se comercializa en los principales mercados del centro del país y en varias empresas de plantas medicinales, como son Extractos Nahualpatli y Proquinat. En el **Cuadro 1** se enlistan algunos preparados de la planta y las empresas que los expenden.

Cuadro 1. Preparados medicinales que contienen simonillo.

Preparado	Ingredientes	Comercializador
 <p>Hepacure®</p> <p>Tabletas, extracto vegetal y preparado a base de planta trozada</p>	<p>Boldo (<i>Peumus boldo</i>) Cuasia (<i>Quassia amara</i>) Prodigiosa (<i>Brickellia cavanillesi</i>) Marrubio (<i>Marrubium vulgare</i>) Simonillo (<i>Conyza filaginoides</i>) Cáscara amarga (<i>Picramnia antidesma</i>) Manzanita (<i>Arctostaphylos glauca</i>)</p>	<p>Tecnobotánica de México S.A. de C.V.</p>
 <p>Soy Lax</p> <p>Cápsulas</p>	<p>Hojas de Sen (<i>Cassia senna</i>) Zábila (<i>Aloe barbadensis</i>) Cáscara Sagrada (<i>Rhamnus prusiana</i>) Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>) Espinosilla (<i>Loeselia mexicana</i>) Perejil (<i>Petroselinum crispum</i>) Rosa Silvestre (<i>Rosa canina</i>) Simonillo (<i>Conyza filaginoides</i>) Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)</p>	<p>Naturiee</p>

Cuadro 1. Preparados medicinales que contienen simonillo (Continuación).

Preparado	Ingredientes	Comercializador
<p>IG2 Hepático Biliar</p>  <p>Cápsulas Vesychol</p>	<p>Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>) Tepozán (<i>Buddleja cordata</i>) Boldo (<i>Peumus boldo</i>) Cenizo (<i>Leucophyllum texanum</i>) Marrubio (<i>Marrubium vulgare</i>) Simonillo (<i>Conyza filaginoides</i>)</p>	<p>Malabar productos naturales</p>
 <p>Comprimidos</p>	<p>Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>) Boldo (<i>Peumus boldus</i>) Simonillo (<i>Conyza filaginoides</i>) Cuasia (<i>Quassia amara</i>)</p>	<p>Pronamed</p>

1.2.4 Investigaciones Farmacológicas

En los Anales del Instituto Médico Nacional del año de 1894 se reportó la actividad de los extractos de simonillo administrados a conejo: “el simonillo produjo la muerte inmediata por embolias pulmonares cuando fue aplicado en el torrente circulatorio. En los casos en los que fue aplicado bajo la piel produjo inflamaciones muy intensas seguidas de fenómenos de septicemia y muerte. Confrontando estos resultados con los obtenidos en las veces anteriores, hemos adquirido la creencia de que la acción más notable de la planta es destruir algún principio de la sangre, de los que en ella desempeñan el poder de oponerse al desarrollo de las bacterias” (Instituto Médico Nacional, 1894; Altamirano, 1904). Cabe mencionar que esta información se obtuvo del volumen I de los Anales del Instituto Médico Nacional y que no existen otros reportes

previos. Posiblemente los investigadores realizaron experimentos que no fueron descritos a la luz pública, y eso se refiere el comentario “las veces anteriores”.

Debido a la regularidad con que el zacatechichi era confundido y usado como simonillo, en 1895 se condujeron estudios clínicos encaminados a discernir cuál de las plantas ocasionaba los efectos adversos observados en pacientes administrados con tinturas elaboradas presuntamente con simonillo. Así, se señala en los Anales correspondientes a ese año que “se debe indagar: 1° Si el efecto aperitivo pertenece a las dos plantas o a una sola. 2° Si una de ellas es realmente responsable de los trastornos, especialmente digestivos que se presentaron a veces. 3° Si alguna posee realmente la acción antipalúdica que vulgarmente se les atribuye, confundiéndolas” (Instituto Médico Nacional, 1895).

A fin de esclarecer tales puntos, se describe en primera instancia la acción aperitiva de la tintura de simonillo empleada en dosis de 30 a 40 gotas antes de cada alimento y en infusión de 5 y 10 gramos en 200 gramos de agua en pacientes con afecciones hepático-biliares, mostrándose mejora en el apetito en todos los casos. Por otra parte, se administró zacatechichi a un paciente, 4 gramos dos veces al día durante seis días y luego 8 gramos por nueve días, presentando el paciente resequead de garganta y tos improductiva. En cuanto a la evaluación de la actividad antipalúdica, se administró extracto (1:5) de simonillo en cuatro casos, con dosis que variaban entre 0.6 y 6 gramos al día, mostrándose mejoría sólo en un caso y diarrea en dos casos. Se concluyó entonces que las reacciones digestivas podían atribuirse al simonillo empleado en dosis mayores a 5 gramos al día (Instituto Médico Nacional, 1895).

Estudios posteriores, como el reportado en los Anales del año 1903, refieren a *Conyza filaginoides* como un medicamento amargo, con la propiedad de aumentar la secreción gástrica y la cantidad de ácido clorhídrico. En este estudio el simonillo se empleó como infusión al 10% que se administró a perros mediante fístula gástrica; luego de media hora de permanencia en el estómago del perro, la infusión se extraía y se medía el jugo gástrico secretado. Se describió a los líquidos extraídos, sin encontrar en él presencia de bilis, como se había esperado, pero sí comprobando el carácter ácido del

jugo gástrico. De esta forma, se recomendaba el uso del simonillo en sustitución de otros amargos exóticos, aclarando que aunque era conocida la reputación de colagogo de la planta, el estudio llevado a cabo no demostraba la presencia de pigmentos biliares en las secreciones gástricas (Instituto Médico Nacional, 1904; Altamirano 1904).

Hacia 1907 se inicia el estudio del simonillo y de otras plantas por semejanza de algunos de sus principios activos, entre ellas *Brickellia cavanillesii* A. Gray (atanasia amarga), *Artemisia mexicana* Willd (estafiate), *Calea zacatechichi* y *Tecoma stans* Juss (tronadora).

El Dr. Villaseñor reportó sobre el simonillo en los Anales correspondientes a ese año que: “varios médicos lo han prescrito como amargo tónico en los catarros gástricos acompañados de dispepsia y falta de apetito. Pero el principal uso que le dan es para curar los cólicos hepáticos por medio de la infusión de la planta, tomándolo diariamente en ayunas por largo tiempo” (Instituto Médico Nacional, 1907). Bajo el mismo curso de investigaciones, el Dr. Eduardo Liceaga empleó esta hierba con resultados muy satisfactorios en numerosos casos de catarro de las vías biliares: “se calmó el dolor, disminuyó la ictericia y se observaron efectos colagogos muy notables.” Usó el cocimiento a la dosis de 50 gramos en la mañana y otra dosis igual después de la comida; lo recomendó también para cólicos biliares en dosis de 5 gramos de polvo de planta entera en infusión durante media hora, con 200 gramos de agua, tomándose por la mañana en ayunas. Por último, el galeno recomendó el uso del extracto hidroalcohólico en píldoras de 5 centigramos, tomando dos diarias en ayunas en el tratamiento de problemas biliares, y como lavativa en casos de meteorismo (acumulación de gases) y constipación, 10 gramos de simonillo por 500 gramos de agua (Altamirano, 1904; Instituto Médico Nacional, 1907).

El Instituto Médico Nacional también realizó a la par pruebas preclínicas y clínicas. Los trabajos preclínicos sobre el simonillo estaban encaminados a mostrar la acción tóxica que había sido descrita en los Anales del año 1894. Los ensayos practicados por la Sección 3ª del Instituto Médico Nacional demostraron que “... teniendo cuidado de filtrar muy bien el cocimiento y esterilizarlo, se puede introducir en el torrente

circulatorio venoso de los conejos en dosis de 5 cm³ (al 20%) sin producir trastorno alguno. Mayores cantidades, como por ejemplo una solución acuosa del extracto en cantidad de 1 X 10, produce rápidamente la muerte por asfixia, notándose al examinar la sangre, una disminución de la hemoglobina, deformación de los glóbulos rojos, y además, trastornos circulatorios. Creo que estos accidentes pueden atribuirse al principio amargo que lleva la preparación y que no se debe tener en cuenta para el uso terapéutico del simonillo, porque no tendremos que recurrir a este medio de introducción para usarlo como eupéptico, y está demostrado que usando el simonillo por la vía gástrica no es tóxico y produce sus efectos. De todos los datos adquiridos por la experimentación farmacodinámica del simonillo, se infiere que esta planta es muy interesante para su aplicación terapéutica, pues además de tener las propiedades comunes a todos los amargos, produce mayor aflujo de bilis y excita los movimientos peristálticos del estómago e intestino” (Instituto Médico Nacional, 1907).

Las observaciones clínicas se realizaron en diversos hospitales de la capital mexicana; destacan los casos registrados en los pabellones números 5 y 10 del Hospital General, donde se empleó a *Conyza filaginoides* en forma de extracto fluido antes de los alimentos para condiciones de gastroenteritis crónica, angiocolitis, ictericia, urobilinuria, nefritis crónica, edema y falta de apetito asociada a diversos padecimientos; los pacientes mostraron mejoras significativas a los pocos días de administración del simonillo (Instituto Médico Nacional, 1907).

La dosificación del extracto de simonillo fue entonces estandarizada para las condiciones gastrointestinales; en dosis de 10 a 20 gotas antes de cada alimento y con tratamientos cuya duración variaba de 3 a 8 días, los pacientes tratados mostraron resultados satisfactorios como aperitivo y como digestivo (Instituto Médico Nacional, 1908).

Ya a mediados del siglo XX, el Laboratorio Químico Central, fabricante de los medicamentos “Garcol”, comercializaba un producto denominado “Eupéptico”, una mezcla de *Tecoma stans* (tronadora), *Coutarea latiflora* (copalchi) y *Conyza filaginoides*

(simonillo), y exaltaba sus virtudes en el tratamiento de la falta de apetito tomado antes de los alimentos (Hersch-Martínez, 2000).

A pesar de su amplia comercialización durante todo el siglo XX, la siguiente descripción sobre las propiedades farmacológicas de extractos orgánicos del simonillo aparece hasta 1995. Los extractos metanólico y clorofórmico-metanólico (1:1) mostraron efectos significativos de relajación de músculo liso en el modelo de íleon aislado de rata (Rojas *et al.*, 1995; Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1996), y el clorofórmico actividad antimicrobiana importante contra *Staphylococcus aureus* (Calzada *et al.*, 1998). De manera adicional, el extracto metanólico presentó actividad antiprotozoaria moderada contra *Giardia lamblia*. En todos los casos los constituyentes químicos responsables de las actividades biológicas demostradas fueron determinados (Calzada *et al.*, 1998, 2001). Por otra parte, investigadores japoneses comprobaron la actividad inhibitoria de tirosinasa de extractos acuosos de la planta en un modelo de cobayo por su interés cosmético en procesos antioxidantes y de aclaramiento de la piel (Tada *et al.*, 2001, 2002). Por último, Andrade-Cetto y Heinrich (2005) señalaron que las infusiones de la planta son reconocidas popularmente en la medicina tradicional como hipoglucemiantes.

Otras especies del género cuyas propiedades farmacológicas han sido estudiadas incluyen a *Conyza dioscoridis*, cuyos extractos metanólicos presentan actividad antinociceptiva en el modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético (Asongalem *et al.*, 2004); los extractos metanólicos de *Conyza bonariensis* poseen actividad inhibitoria de la xantina oxidasa (involucrada en procesos de hiperuricemia y gota) (Kong *et al.*, 2001) y propiedades antifúngicas (Svetaz *et al.*, 2010); los extractos acuosos de *Conyza sumatrensis* poseen actividad antiinflamatoria y analgésica (Asongalem *et al.*, 2004; Atta y Mouneir, 2004); por último, los extractos metanólicos de varias especies africanas de *Conyza* presentaron actividad antidiarreica en conejo (Atta y EL-Sooud, 2004).

1.2.5 Constituyentes químicos

En los Anales del Instituto Médico Nacional del año 1894, se describe la realización de un estudio químico del polvo de la planta, que consistió en la preparación de cuatro extractos vegetales (total, de éter sulfúrico, alcohólico y acuoso) y la comprobación de la presencia de clorofila, materias gomosas, glucosa, azúcar, principios pépticos y una sustancia amarga en los mismos; se incluye además la identificación histoquímica hecha por el Dr. Cano y Aleacio, quien manifiesta que "... las celdillas contienen en su interior unos cuerpos brillantes muy grandes para ser núcleos y una sustancia granulosa muy abundante, ambos de color amarillo pálido y tratados por ácido sulfúrico concentrado y luego por una solución de yodo, toma la sustancia amiloide que forman las celdillas un color azul puro que la caracteriza y el contenido toma un color amarillo brillante y no el color pardo que dan la clorofila y el protoplasma. Por esta razón, creo que dicha sustancia es el principio amargo que no existe más que en la corteza..." (Instituto Médico Nacional, 1894).

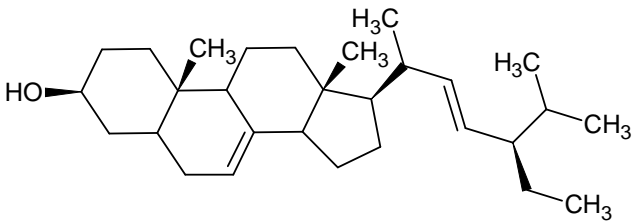
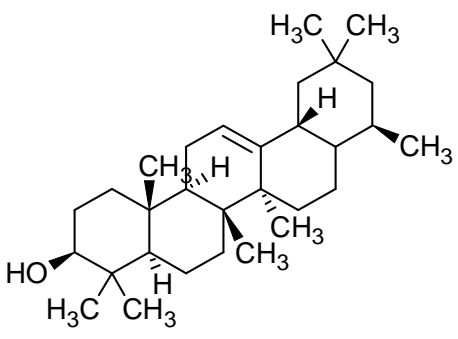
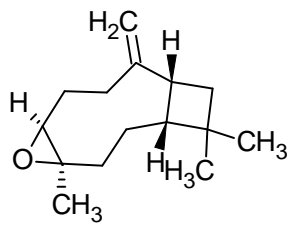
Los trabajos realizados hacia 1907 fueron encaminados a continuar con el análisis del principio amargo, por ello "... el señor Cordero comienza con el extracto acuoso de la planta, que se trata por alcohol a 96°, para deshacerse de los principios gomosos; se filtra y se destila para utilizar el alcohol; se concentra y se trata por éter sulfúrico que precipita el azúcar; el tanino se precipita por la gelatina y el exceso de ésta por el alcohol. El líquido resultante se evaporó a baño María y queda el principio amargo con los caracteres siguientes: sólido amorfo de olor semejante al del capsicum, exaltándose por el calor, sabor intensamente amargo y color anaranjado oscuro. Además, partiendo del extracto fluido, al que se adiciona agua para precipitar la parte resinosa, practicado la separación del azúcar y del tanino, del mismo modo que se hizo con el extracto acuoso; evapora el residuo de estos tratamientos en presencia de ácido sulfúrico puro y diluido al 1% en una corriente de aire y a temperatura de 25 a 30° obteniendo así agujas de tamaño visible a la simple vista, a este cuerpo que es un alcaloide, presenta las siguientes reacciones: tratado con potasa, sosa y amoniaco, da un precipitado amarillo, insoluble en exceso de potasa o sosa; reactivo de Bouchardat, precipitado canela oscuro; ácido pícrico, precipitado

amarillo cristalino a las 24 horas; bicarbonato de sodio, precipitado blanco soluble en exceso de reactivo; reactivo de Millon, precipitado amarillo abundante, insoluble en exceso de reactivo.; reactivo de Mayer, precipitado amarillo abundante que pasa al rojo a las 24 horas; permanganato de potasio, decoloración y precipitado ligero” (Instituto Médico Nacional, 1907). El principio activo del extracto fue denominado lenesina, el cual fue luego caracterizado como un glucósido al que se atribuyó la actividad biológica del simonillo (Altamirano, 1904).

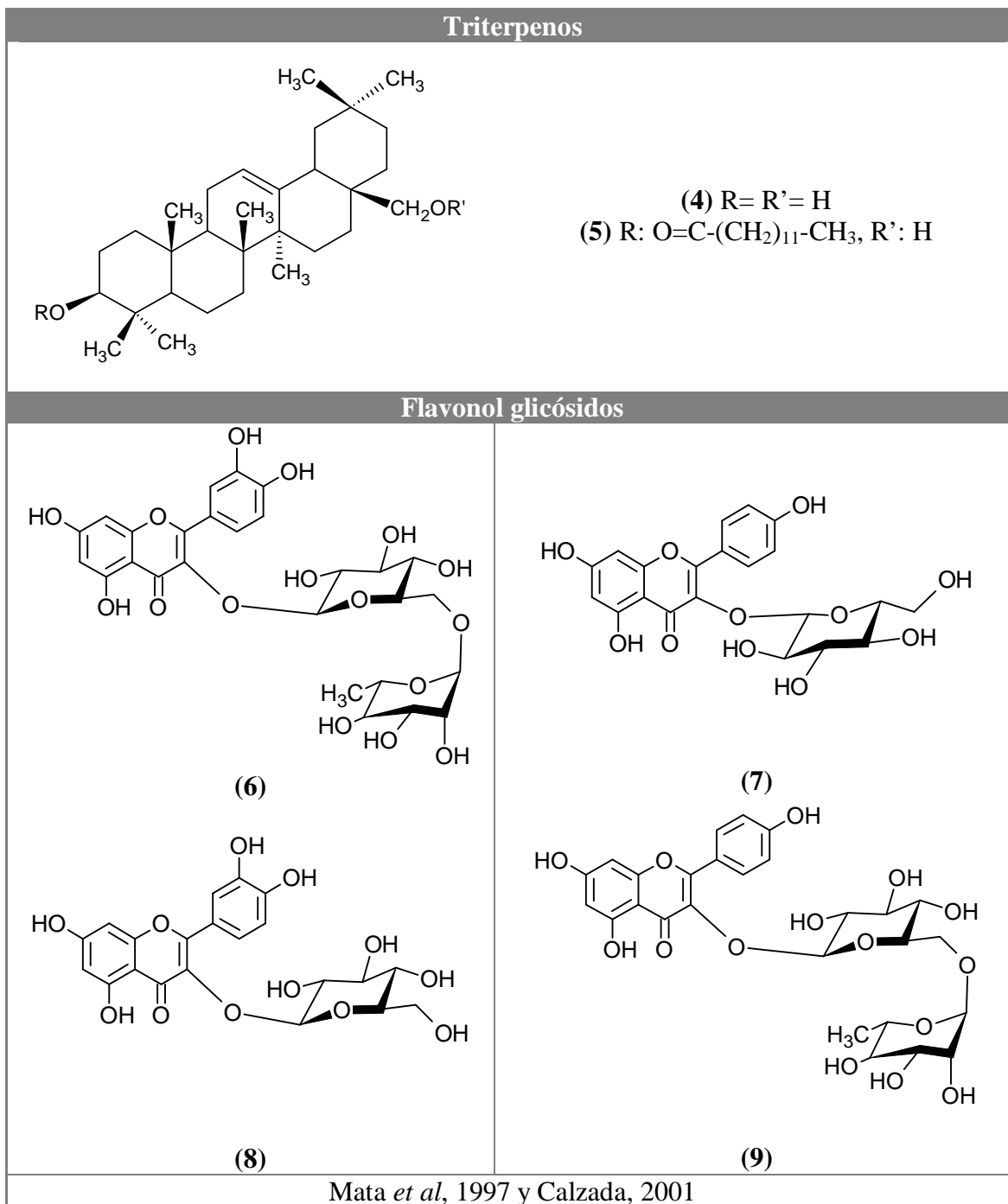
No fue sino hasta avanzado el siglo XX que los primeros constituyentes químicos del simonillo fueron establecidos formalmente. Los principales componentes de las partes aéreas descritos a la fecha son el α -espinasterol (**1**) y la β -amirina (**2**) (Domínguez *et al.*, 1972), sesquiterpenoides (4,5- α -óxido β -cariofileno) (**3**), triterpenoides [eritrodiol (**4**) y 3- β -tridecanoiloxi-28-hidroxi-olean-12-eno (**5**)], flavonol glicósidos [rutina (**6**), astragalina (**7**), isoquercitrina (**8**), nicotiflorina (**9**) y narcisina (**10**)] (Mata *et al.*, 1997 y Calzada *et al.*, 2001), la flavanona pinostrobina (**11**) y la aglicona quercetina (**12**) (Mata *et al.*, 1997), así como flavonol-cafeoil glicósidos [campferol 3-*O*-(6''-*O-E*-cafeil)- β -D-galactopiranosido (**13**), isoramnetina-3-*O*-(6''-*O-E*-cafeil)- β -D-galactopiranosido (**14**) y quercetina 3-*O*-(6''-*O-E*-cafeoil)- β -D-glucopiranosido (**15**)] (Calzada *et al.*, 2001).

Por otra parte, Tada y colaboradores (2001) reportaron ácido cafeico (**16**), dihidrosiringina (**17**), ácido 3,4-di-*O*-cafeilquínico (**18**), ácido 4-*O*-cafeilquínico (**19**), ácido clorogénico (**20**), adenosina (**21**), 2'-desoxiadenosina (**23**), icarisida F₂ (**23**) e icarisida D₁ (**24**). En el **Cuadro 2** se muestran las estructuras químicas de estos compuestos.

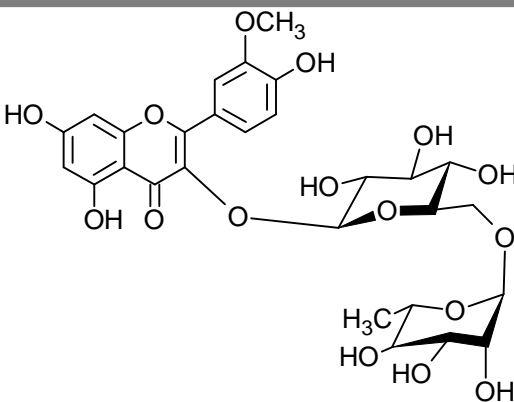
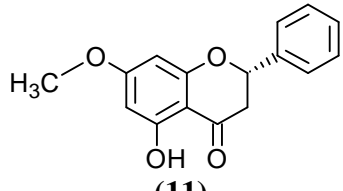
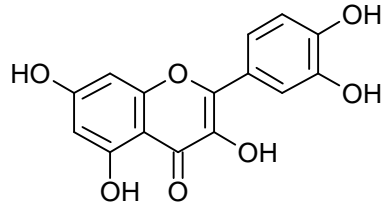
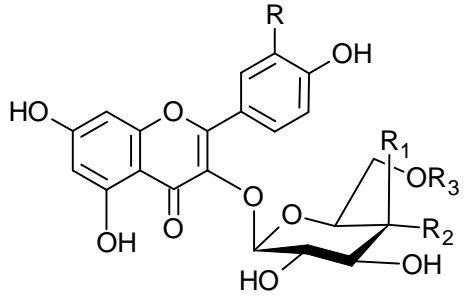
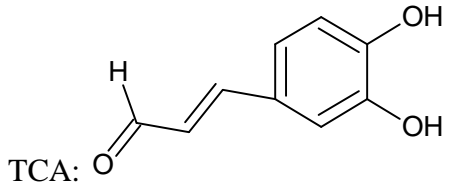
Cuadro 2. Constituyentes químicos de *Conyza filaginoides*

Esteroles
 <p>(1)</p> <p>Domínguez <i>et al.</i>, 1972</p>
Triterpenos
 <p>(2)</p> <p>Domínguez <i>et al.</i>, 1972</p>
Sesquiterpenoides
 <p>(3)</p> <p>Mata <i>et al.</i>, 1997 y Calzada, 2001</p>

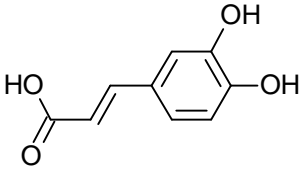
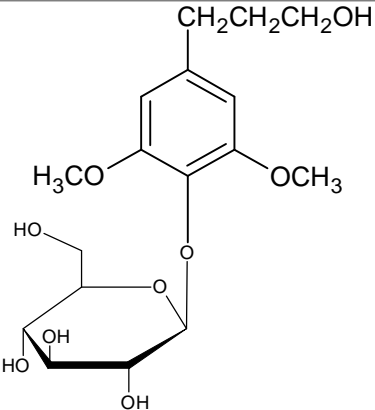
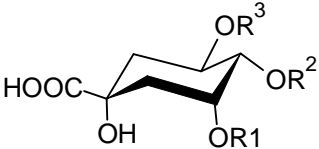
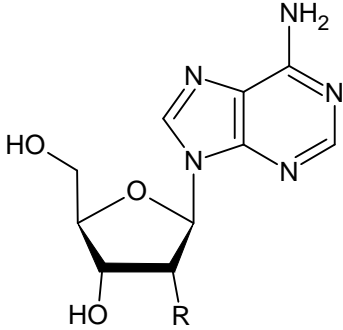
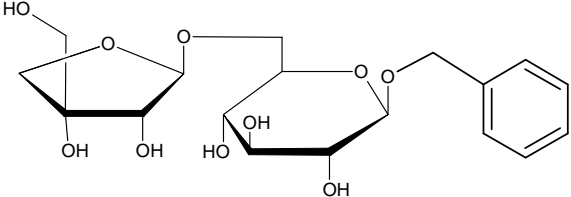
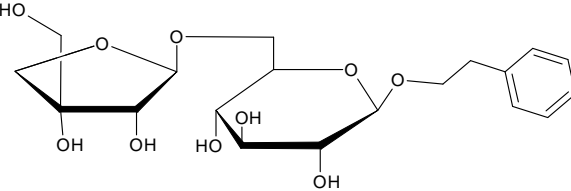
Cuadro 2. Constituyentes químicos de *Conyza filaginoides* (Continuación)



Cuadro 2. Constituyentes químicos de *Conyza filaginoides* (Continuación)

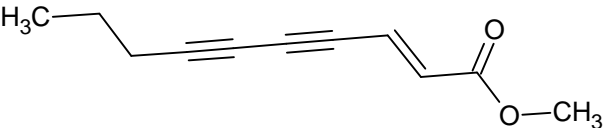
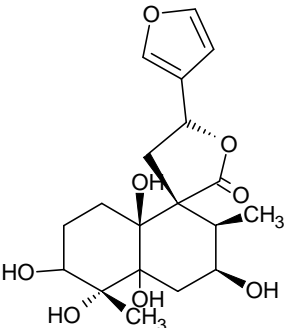
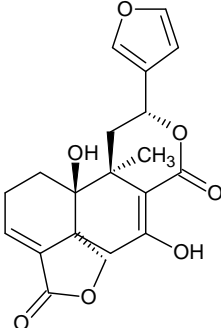
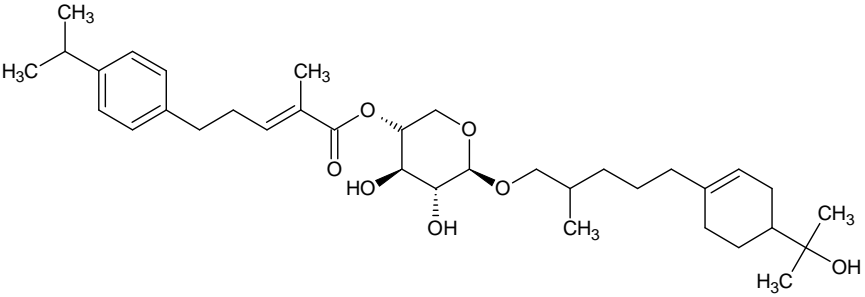
Flavonol glicósidos	
	
<p>(10) Mata <i>et al.</i>, 1997 y Calzada, 2001</p>	
Agliconas	
	
<p>(11)</p>	<p>(12)</p>
Mata <i>et al.</i> , 1997	
Flavonol-cafeoil glicósidos	
	<p>(13): R=R₂=H, R₁=OH, R₃=TCA (14): R=OMe, R₁=OH, R₂=H, R₃=TCA (15): R=R₂=OH, R₁=OH, R₃=TCA</p>
	
Calzada <i>et al.</i> , 2001	

Cuadro 2. Constituyentes químicos de *Conyza filaginoides* (Continuación)

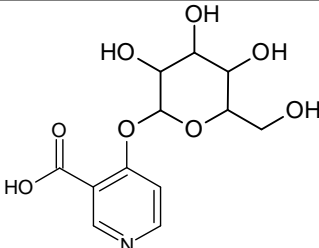
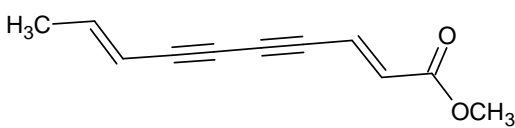
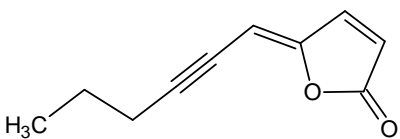
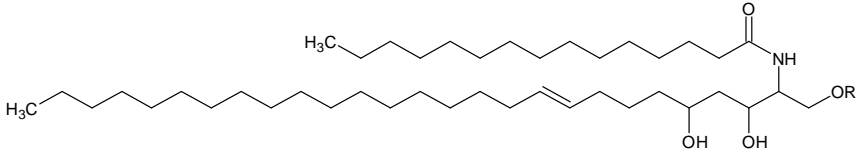
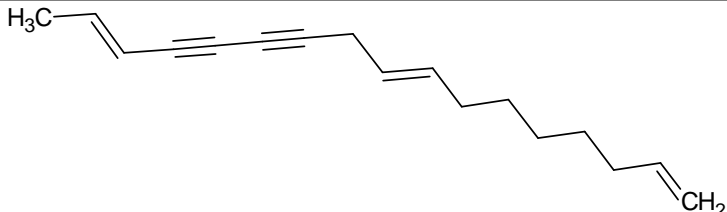
Otros	
 (16)	 (17)
 (18): $R^1=R^2=$ cafeoil, $R^3=H$ (19): $R^1=R^3= H$, $R^2=$ cafeoil (20): $R^1=R^2= H$, $R^3=$ cafeoil	 (21): $R= OH$ (22): $R= H$
 (23)	
 (24)	
<p>Tada <i>et al.</i>, 2001</p>	

Ahora bien, los estudios fitoquímicos de especies selectas del género *Conyza* a nivel mundial describen flavonoides, terpenoides y algunos de sus derivados glicosilados, así como compuestos alicíclicos, cumarinas, saponinas y esfingolípidos. El **Cuadro 3** contiene algunos metabolitos representativos.

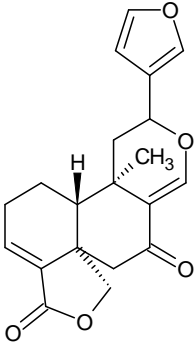
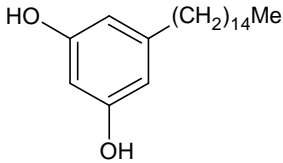
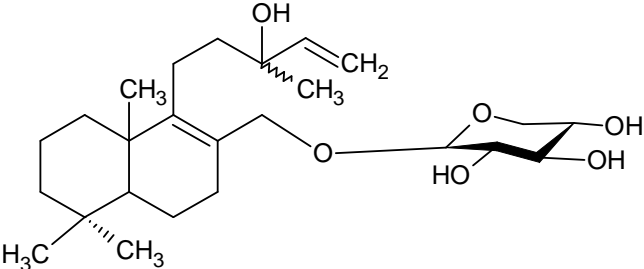
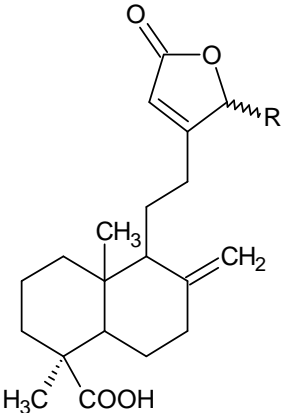
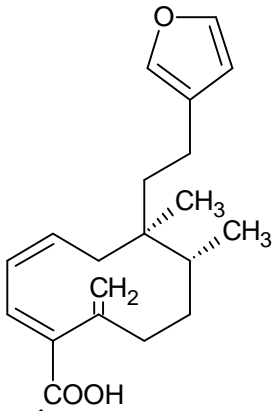
Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza*

Especie	Metabolitos	
<p><i>Conyza aegyptiaca</i> L.</p>	 <p>Derivado de acetileno C₁₀ (Lachnophyllum éster) Christensen y Lam, 1991</p>	
	 <p>Diterpeno tipo clerodano</p>	 <p>Diterpeno dilactona</p>
	 <p>Triterpeno xilósido</p> <p>Zdero <i>et al.</i>, 1990</p>	

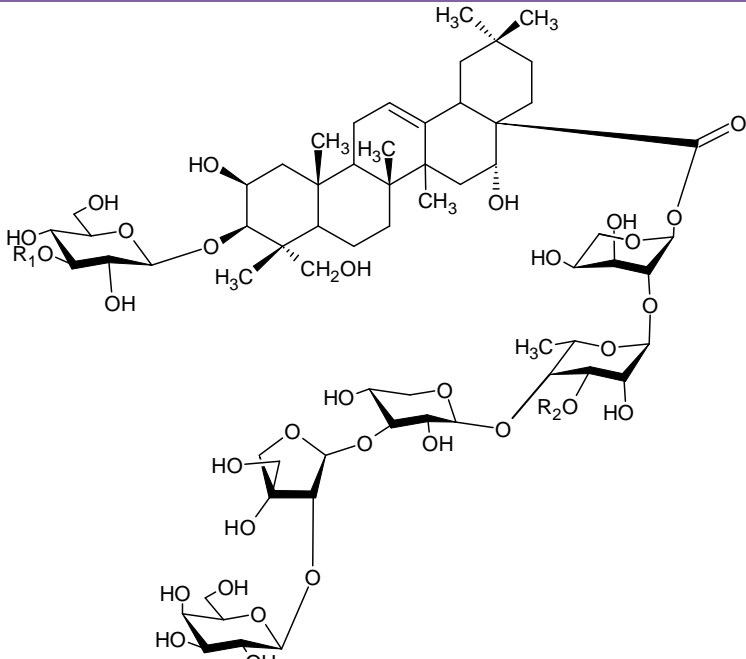
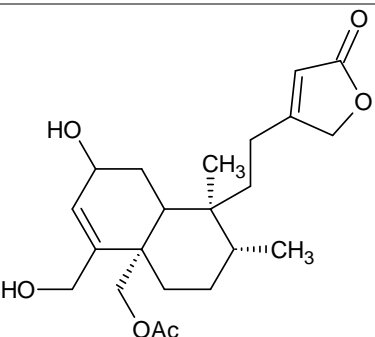
Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos
<p><i>C. bonariensis</i> (L.) Cronq.</p>	 <p>Glicósido Kong <i>et al.</i>, 2001</p>
<p><i>C. canadensis</i> (L.) Cronq.</p>	 <p>Éster de matricaria</p>  <p>Derivado de acetileno C₁₀ (Lachnophyllum lactona)</p> <p>Christensen y Lam, 1991</p>  <p>Esfingolípidos 1: R=H 2: R=β-D-glucopiranosil</p> <p>Malik <i>et al.</i>, 2002</p>
<p><i>C. sumatrensis</i> (Retz) E. H. Walker</p>	 <p>Acetileno C₁₇ Christensen y Lam, 1991</p>

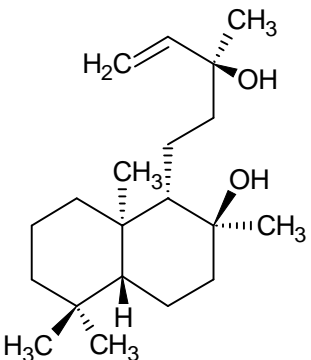
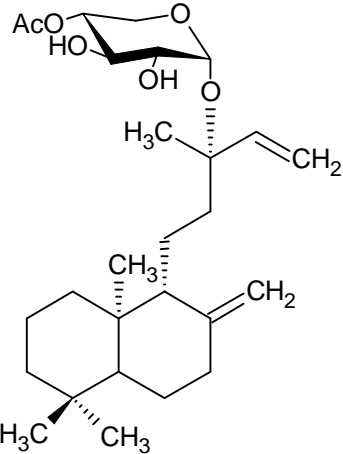
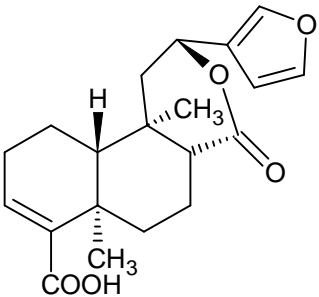
Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos	
<p><i>C. podocephala</i></p>	 <p>Diterpeno</p>	 <p>Derivado del resorcinol</p>
	<p>Bohlmann y Wegner, 1981</p>	
<p><i>C. steudellii</i></p>	 <p>Diterpeno xilopiranósido</p> <p>Ahmed, 1991</p>	
<p><i>C. stricta</i></p>	 <p>Ácidos terpenoicos</p> <p>R= H R= OH R= OMe</p>	 <p>Ácido estrictico</p>
	<p>Ahmed y Ahmed, 1990</p>	<p>Pandey <i>et al.</i>, 1984</p>

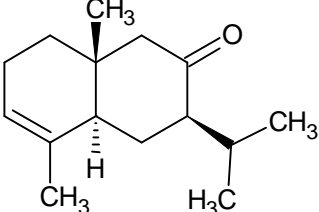
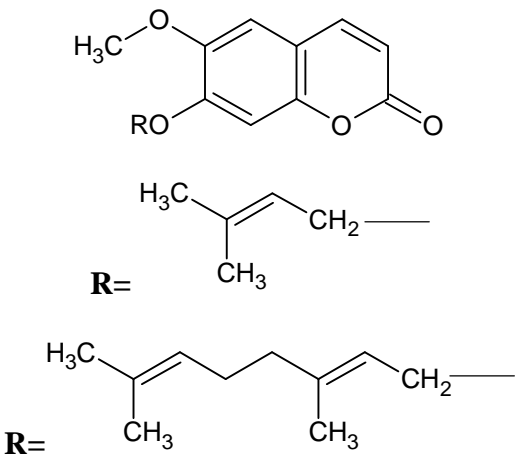
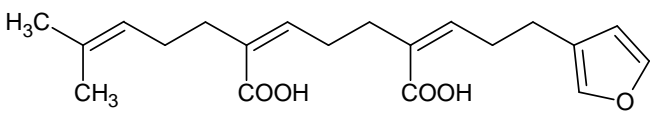
Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos
<p><i>C. blinii</i></p>	 <p> Conyzasaponina D: R₁= Xyl R₂= Api (f) Conyzasaponina E: R₁= Xyl R₂= Ara Conyzasaponina F: R₁= H R₂= Api (f) Conyzasaponina H: R₁= Xyl R₂= H </p> <p>Su <i>et al.</i>, 2001</p>
	 <p> Lactona diterpénica (blinina) Yang <i>et al.</i>, 1989 </p>

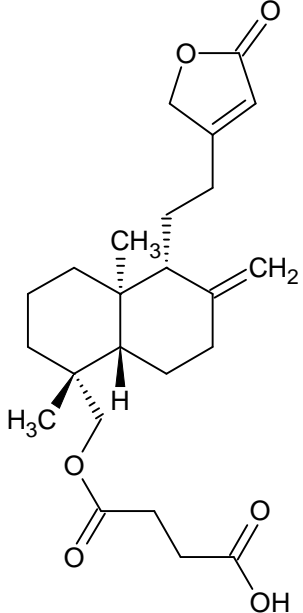
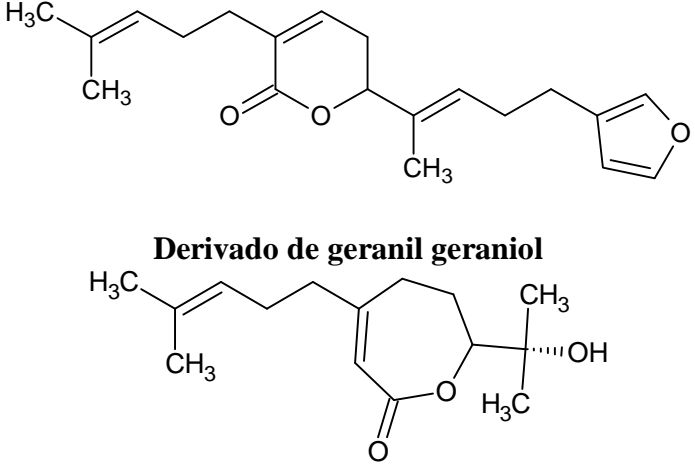
Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos
<i>C. trihecatactis</i>	 <p style="text-align: center;"> (-)- Esclareol Torrenegra <i>et al.</i>, 1993 </p>
<i>C. linearis</i>	 <p style="text-align: center;"> <i>ent</i>-manool-13-<i>O</i>-β-D-4'-acetilxilopiranosido Urzua y Mendoza, 1995 </p>
<i>C. welwitschii</i>	 <p style="text-align: center;"> Diterpeno tipo clerodano Zdero <i>et al.</i>, 1990 </p>

Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos
<i>C. ulmifolia</i>	 <p>Cetona sesquiterpénica Bohlmann y Jakupovic, 1978</p>
<i>C. obscura</i>	 <p>Derivados de escopoletina Bohlmann y Jakupovic, 1978</p>
<i>C. incana</i>	 <p>Ácido furano alicíclico Galal <i>et al.</i>, 1998</p>

Cuadro 3: Metabolitos representativos de especies selectas de *Conyza* (Continuación)

Especie	Metabolitos
<p><i>C. incana</i></p>	 <p><i>ent</i>-labdan-succinil-éster Abdel-Sattar <i>et al.</i>, 1998</p>
<p><i>C. hypoleuca</i></p>	 <p>Derivado de geranil geraniol</p> <p>Lactona sesquiterpénica Zdero <i>et al.</i>, 1991</p>

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Si bien el uso de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades se remonta a tiempos ancestrales, el papel que juegan en la medicina moderna es más vigente que nunca. La diversidad química y farmacológica que ofrecen las plantas medicinales ha contribuido al hecho de que cerca del 25% de los medicamentos alopáticos provengan de forma directa o indirecta de plantas superiores, destacando grupos de medicamentos como los antimicrobianos y antitumorales, donde aproximadamente 60% de los preparados disponibles en el mercado derivan de productos naturales (Calixto, 2000).

El incremento global en el uso de plantas medicinales y sus derivados ha conducido a la renovación en el interés de las autoridades de salud en establecer parámetros de eficacia y seguridad de los mismos. Prueba de ello es la generación de información científica que sustenta sus usos tradicionales y la estandarización de técnicas que permiten su regularización y comercialización (WHO, 2011a).

Sin duda, la investigación actual sobre plantas medicinales no sólo se enfoca a la obtención de estructuras novedosas que sirvan como cabezas de serie, sino también al desarrollo de agentes fitoterapéuticos estandarizados cuya eficacia, seguridad y calidad estén demostradas (Calixto, 2000). Además, este conocimiento sirve para integrar sus monografías tipo OMS que representan una fuente de información confiable para investigadores, profesionales de la salud y practicantes de la medicina tradicional.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo principal generar la información científica requerida para contribuir al establecimiento de los parámetros de identidad, seguridad y eficacia de la especie medicinal *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron (*Asteraceae*) necesarios para la elaboración de su monografía de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Organización Mundial de la Salud.

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

1. Determinar los parámetros de identidad química de utilidad para el control de calidad de *Conyza filaginoides* mediante el establecimiento de perfiles cromatográficos de extractos y esencias de la planta, así como de los compuestos marcadores y volátiles presentes en ella. Estos últimos se determinarán mediante la técnica de microextracción en fase sólida empleando diferentes fases y el análisis cromatográfico del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la planta completa. En ambos casos la identidad de los componentes volátiles se establecerá por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
2. Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para cuantificar al menos un compuesto marcador y/o principio activo en el extracto de *C. filaginoides*. El método será de utilidad como prueba de composición en el proceso de control de calidad de la droga cruda de *Conyza filaginoides*.
3. Determinar la toxicidad aguda de los extractos de la planta de acuerdo en ratones al método de Lorke como parte de los estudios de toxicidad potencial preclínica.
4. Establecer la eficacia preclínica de la droga cruda de *C. filaginoides* mediante el estudio de sus propiedades analgésicas en ratones empleando los ensayos de la placa caliente y estiramiento abdominal, espasmolíticas mediante el ensayo de tránsito intestinal, y antidiabéticas mediante la realización de estudios agudos y de tolerancia a glucosa y sacarosa.

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Adquisición del material vegetal

El material vegetal (planta completa) de *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron se compró en “La Flor Azteca” en el Mercado de Sonora en junio de 2010. Una muestra de referencia (registro 130770) se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM.

3.2 Preparación de los extractos (orgánico y acuoso) y aceite esencial a partir del material seco y molido de *Conyza filaginoides*

La planta completa de *Conyza filaginoides* seca se fragmentó en un molino de cuchillas Thomas Wiley Model 4 (Laboratory Mill, Thomas Scientific, USA).

Para la obtención del extracto orgánico a partir del material vegetal fragmentado, se evaluaron diferentes condiciones de extracción considerando parámetros como el procedimiento de extracción, la polaridad de los disolventes y el tiempo. Se eligió al proceso de maceración como método de extracción y se ensayaron como disolventes hexano, diclorometano, metanol y diclorometano-metanol (1:1). Los tiempos de extracción se variaron de 24 h a 7 y 14 días de maceración exhaustiva, empleando muestras de 2.5 g de material vegetal en 50 mL de disolvente, realizando la extracción por triplicado en cada muestra.

De estos ensayos, se obtuvo como mejor disolvente para la extracción la mezcla diclorometano- metanol (1:1) [CH_2Cl_2 -MeOH (1:1)]. De esta manera, el extracto orgánico se preparó vía maceración exhaustiva, para lo cual se tomaron 1.5 kg de simonillo seco y se trataron con 11.5 L de la mezcla seleccionada. Al cabo de una semana, la mezcla se filtró y concentró *in vacuo*. El proceso se repitió tres veces para obtener 137 g de un extracto seco verde oscuro.

El extracto acuoso se preparó mediante el método de infusión. Cada 10 g de material vegetal seco se trataron con 250 mL de agua destilada hirviendo; la mezcla

resultante se dejó reposar durante 20 minutos y se filtró a través de un filtro de papel por gravedad. El extracto se concentró a sequedad en un rotaevaporador adaptado a una bomba de vacío, obteniéndose 0.3 g de un extracto seco verde oscuro. El proceso se repitió 10 veces para generar 3 gramos de infusión.

El aceite esencial se elaboró a partir de 50 g del material seco colocado en un matraz bola al cual se adicionaron 2 litros de agua destilada. Empleando un aparato tipo Clevenger se obtuvo al aceite esencial mediante hidrodestilación, calentando el matraz a 40°C durante 8 horas. El aceite se separó del producto de destilación mediante un proceso de reparto en CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró en un rotaevaporador para generar 0.050 g de un aceite transparente.

3.3 Parámetros de Identidad Química

3.3.1 Análisis de los compuestos volátiles del aceite esencial de *C. filaginoides* por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

Los constituyentes presentes en la esencia se identificaron empleando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas LECO tiempo de vuelo (MS-TOF; Agilent Technology, Palo Alto, Calif., USA). La columna utilizada fue de tipo capilar DB-5 de 10 m de longitud y 0.18 mm de diámetro. La temperatura de la columna se estableció en rampa de 40 a 260 °C con una velocidad de calentamiento de 4 °C/min. La temperatura del inyector splitless se estableció en 300 °C. Como gas acarreador se empleó helio con una velocidad de 1 mL/min. Los componentes presentes en la esencia fueron identificados mediante el cálculo computacional (software ChromaTOF®) de sus índices de retención aplicando la metodología descrita por Kováts (Van Den Dool, 1963), utilizando una serie homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₂₀) y por la comparación de sus espectros de masas con los reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo del National Institute of Standards and Technology (NIST). El voltaje de registro de los espectros de masas fue de 70 eV. En todos los casos, el porcentaje de correlación fue mayor al 85%.

3.3.2 Análisis de los compuestos volátiles de *C. filaginoides* determinados por la técnica de microextracción en fase sólida

Los compuestos volátiles de *C. filaginoides* fueron determinados mediante la técnica de microextracción en fase sólida (Hinshaw, 2003). Se emplearon tres tipos de fibras, polidimetilsiloxano (PDMS 100 μm), carboxen-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS 75 μm) y divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS 50/30 μm) de un centímetro de longitud que fueron acondicionadas durante 2 h previas al experimento en un inyector split/splitless de CG a 250°C en todos los casos.

La extracción se realizó colocando 30 mg de la planta seca y fragmentada en un vial que contenía 75 mg de NaCl y 5 mL de agua grado HPLC. Se colocó una barra de agitación al vial y se montó sobre un agitador magnético a 800 rpm. Las fibras fueron introducidas a través del septum de los viales y expuestas a la fase de vapor. Se evaluó el efecto de la temperatura y el tiempo de exposición; variando la temperatura (ambiente y 45°C) se obtuvieron perfiles cromatográficos a los 1.5, 10 y 30 minutos. Luego del tiempo establecido, las fibras fueron retiradas y colocadas en el inyector del cromatógrafo de gases, el cual se encontraba acoplado al espectrómetro de masas; los componentes se identificaron como se describió en el inciso anterior.

3.4 Parámetros de composición química

3.4.1 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* por CCF

Los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* se obtuvieron en primera instancia mediante cromatografía en capa fina (CCF) siguiendo técnicas convencionales, empleando placas de aluminio de 0.25 mm de grosor recubiertas de gel de sílice (60 F254 Merck, malla de 3.5-7.0 mm ASTM) de diferentes dimensiones, utilizando diversos sistemas de elución. Como agente cromógeno se empleó solución de sulfato cérico amoniacal. En el caso del extracto orgánico, se realizó previamente un

proceso de reparto modificado del descrito por Calzada (2001) y esquematizado en la **Figura 4**. En ambos extractos se seleccionó a la rutina (**6**) como compuesto marcador.

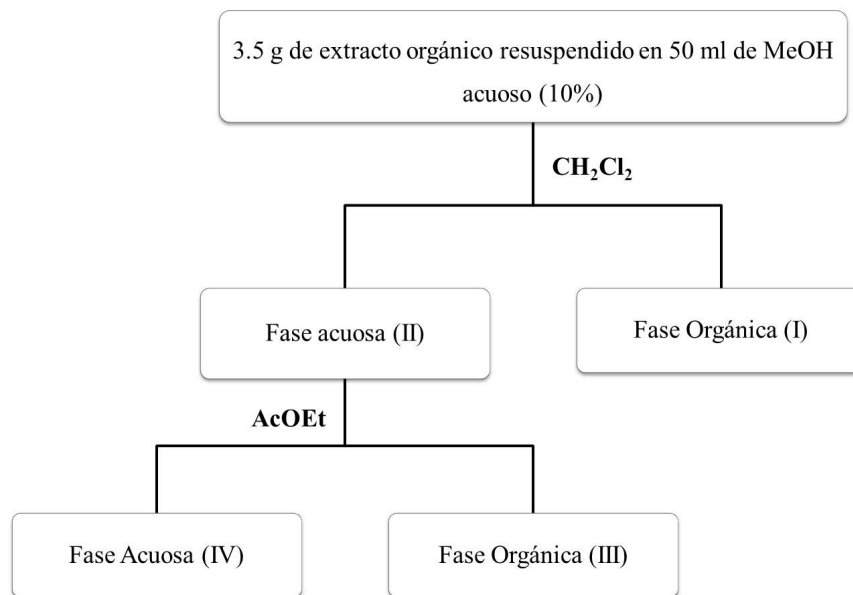


Figura 4. Proceso de reparto del extracto CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) de *C. filaginoides*

3.4.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* por CLAE

Los análisis cromatográficos cualitativos por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* se realizaron empleando un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters 600 (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un detector de UV Dual 2487 y bomba Waters 600 de inyección manual. El software Empower v. 2.0 (Waters) fue empleado para el control del equipo, adquisición de los datos, procesamiento y manipulación de la información.

Se utilizó una columna Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (Merck, tamaño de partícula de 5 μm), de 4.0 mm de diámetro interno y 250 mm de longitud equipada con un guarda columna compatible (Hibar® LichroCART® 4-4).

La elución se realizó empleando un gradiente lineal de una mezcla ternaria constituida por MeOH-ACN-H₂O (con 1% ácido fosfórico H₃PO₄) (**Tabla 1**). La velocidad de flujo fue de 1.2 mL/min. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los compuestos fueron de 254 y 280 nm. Todas las muestras se prepararon disolviendo 10 mg de los extractos orgánico o acuoso en 1 mL de una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (2:8), se filtraron a través de una membrana de nylon Acrodisc® de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de espesor antes de ser inyectadas al cromatógrafo.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado en el análisis cromatográfico por CLAE para el establecimiento de los perfiles cromatográficos de *C. filaginoides*

TIEMPO (min)	% MeOH	%ACN	%H ₂ O + 1% H ₃ PO ₄
0	5	15	80
15	5	40	55

3.4.3 Desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación del flavonoide rutina (6) por CLAE

El desarrollo de un método analítico por CLAE para cuantificar uno de los constituyentes mayoritarios presente en el extracto orgánico de *C. filaginoides* se realizó en el mismo equipo, columna y sistema de elución descrito en el inciso anterior.

La longitud de onda utilizada para la detección fue de 254 nm y se trabajó a temperatura ambiente. El tiempo de retención (t_R) de (6) bajo estas condiciones, fue de aproximadamente 9.0 minutos.

Los criterios establecidos por las normas de Armonización Tripartita referentes a la Validación de Métodos Analíticos [ICH Q2 (R1), 2002] y por la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. (2002), sirvieron como base para la validación del método analítico.

Los parámetros de calidad evaluados para el método analítico desarrollado se describen a continuación.

3.4.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó construyendo una curva de calibración de acuerdo al siguiente procedimiento: 6 mg de estándar [rutina (6)] se disolvieron en 8 mL de MeOH (750 $\mu\text{g/mL}$). A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias para que soluciones de 1 mL de volumen contuvieran entre 50 y 625 μg del estándar a cuantificar. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico del estándar a cuantificar de seis réplicas, se graficó con respecto a la concentración de referencia en cada solución. El cálculo de los parámetros estadísticos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $b_0 = 0$; $b_1 \neq 0$; $R \geq 0.99$; $R^2 \geq 0.98$ e IC (β_1) no incluye el cero.

3.4.3.2 Linealidad del método y exactitud

La linealidad y exactitud del método se determinaron mediante la adición de diferentes concentraciones del estándar comprendidas en un rango entre 50 y 750 $\mu\text{g/mL}$ a la matriz de trabajo. Se evaluaron nueve réplicas por concentración obteniéndose así los valores correspondientes del ABC que se interpolaron en la curva de calibración desarrollada para evaluar la linealidad del sistema; los resultados obtenidos (concentración adicionada vs. concentración recuperada) fueron analizados para determinar sus parámetros estadísticos ($b_0 = 0$, $b_1 \neq 0$, $R \geq 0.99$, $R^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2\%$) mediante un análisis de regresión lineal simple. La exactitud del método se evaluó mediante los siguientes parámetros estadísticos: promedio aritmético (\bar{y}), desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional [IC (β_1)] del porcentaje de recobro.

3.4.3.3 Precisión del método (repetibilidad)

La repetibilidad se estableció mediante el análisis de siete réplicas de una solución de estándar de rutina (6) a una concentración de 750 µg/mL. Los resultados obtenidos se expresan en términos del coeficiente de variación (CV).

3.4.3.4 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración basada en la desviación estándar de los blancos. Se prepararon muestras que contenían 1 mg/mL de extracto de *C. filaginoides* (matriz de trabajo) diluidas con mezcla CH₂Cl₂-MeOH en una proporción 1:1. Se evaluaron diez réplicas y el área bajo la curva del pico (ABC) que corresponde a la rutina (6) de cada réplica sirvió para el cálculo de los límites. De esta manera, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las ecuaciones siguientes:

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_b}{b_1}$$

3.4.3.5 Estabilidad

La estabilidad del estándar se evaluó mediante el análisis del contenido de rutina (6) en muestras preparadas a una concentración de 500 µg/mL sometidas a condiciones de refrigeración (-4°C), ambientales (25°C), exposición a radiación UV, hidrólisis ácida e hidrólisis básica.

Las muestras se analizaron por triplicado para todas las condiciones. En lo que respecta a las condiciones de refrigeración y temperatura ambiente, las mediciones se obtuvieron el primer día y a las 48 horas. Por otra parte, la solución del estándar de rutina (6) fue expuesta durante una hora a radiación ultravioleta a dos longitudes de onda ($\lambda = 254$ y 356 nm) e inyectada inmediatamente al cromatógrafo por triplicado.

En lo que respecta a la hidrólisis ácida, el procedimiento realizado fue el siguiente: se adicionaron 500 µl de HCl 1 N a 5 mL de una solución de rutina de concentración 500

$\mu\text{g/mL}$, que fueron puestos en reflujo a 60°C por una hora. La muestra se dejó enfriar y se neutralizó empleando $60\ \mu\text{l}$ de $\text{NaOH}\ 1\ \text{N}$. Posteriormente se inyectó la muestra al cromatógrafo por triplicado.

Para la hidrólisis básica, $500\ \mu\text{l}$ de $\text{NaOH}\ 0.1\ \text{N}$ se agregaron a $5\ \text{mL}$ de la solución estándar de rutina (**6**). Tras una hora de reflujo a 60°C , la muestra se dejó enfriar y se inyectó por triplicado al cromatógrafo.

3.4.4 Cuantificación de rutina (6**) presente en el extracto orgánico de *C. filaginoides***

Para la cuantificación del flavonoide rutina (**6**) en el extracto orgánico de *C. filaginoides*, se disolvieron $10\ \text{miligramos}$ de la muestra en $1\ \text{mL}$ de una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}\ (2:8)$. La rutina (**6**) presente se cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones cromatográficas indicadas en la **Tabla 1**.

La determinación del área bajo la curva se realizó con el software del equipo y la cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración diseñada en la evaluación de la linealidad del sistema.

3.5 Eficacia preclínica: Ensayos Biológicos

Para los ensayos biológicos se utilizaron ratones machos de la cepa ICR de un peso aproximado de $20\text{-}30\ \text{g}$, adquiridos comercialmente de Harlan México S. A. de C. V. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales: temperatura $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, alimento y agua *ad libitum*, $70\text{-}80\%$ de humedad relativa y un ciclo de $12\ \text{h}$ luz/oscuridad, observando además los lineamientos establecidos en la NOM-062-ZOO-1999.

Dependiendo del ensayo, los animales fueron privados de alimento entre ocho y doce horas antes de la evaluación pero con acceso libre al agua. Los extractos orgánico y

acuoso se suspendieron en una solución salina isotónica (NaCl 0.9%) empleando 0.05% de Tween 80® como agente emulsificante y se administraron por vía oral a razón de 0.2 mL/10 g de peso. En las pruebas biológicas se utilizaron dos tipos de controles, uno positivo y un blanco conteniendo solamente vehículo.

3.5.1 Evaluación de la toxicidad aguda

Para determinar la toxicidad aguda de los extractos orgánico y acuoso de *Conyza filaginoides* se utilizó el método experimental descrito por Lorke (1983).

Este ensayo se realizó en dos fases independientes en las que se utilizaron doce animales (20-25 g) divididos en cuatro grupos ($n=3$). Tres de los grupos fueron administrados con una dosis única del extracto a evaluar y otro grupo sirvió como control blanco (solución salina isotónica 0.9% con Tween 80® al 0.05%).

En la primera fase las dosis evaluadas fueron de 10, 100 y 1000 mg/kg. En la segunda fase las dosis administradas fueron de 1600, 2900 y 5000 mg/kg. En ambas fases, los animales fueron observados durante la hora posterior al tratamiento, anotando cambios conductuales o muertes en el transcurso del experimento. Durante catorce días, el peso y/o muertes de los animales se registraron diariamente. Transcurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó un análisis macroscópico de corazón, hígado, estómago, pulmones y riñones en busca de lesiones.

El protocolo de Lorke establece el cálculo de la DL_{50} mediante una media geométrica entre la dosis donde se presente el deceso de algún animal y la dosis donde no haya muerte alguna de roedores. En caso de no existir decesos se considera que la DL_{50} es mayor a 5000 mg/kg de peso.

3.5.2 Evaluación del potencial antinociceptivo

El potencial antinociceptivo del extracto orgánico de *C. filaginoides* se determinó empleando los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal descritos con antelación en la literatura (Déciga-Campos *et al.*, 2006; Ángeles-López *et al.*, 2010).

3.5.2.1 Modelo de placa caliente

Se realizaron dos ensayos para evaluar de forma independiente a los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides*. Para cada ensayo se emplearon cuarenta ratones machos (20-25 g) divididos en cinco grupos ($n=8$) y se utilizó un aparato de placa caliente convencional (Ugo Basile, Italia). Los animales fueron colocados dentro de un cilindro acrílico sobre la superficie metálica caliente ($55\pm 2^\circ\text{C}$). El tiempo que tomó al animal en presentar una respuesta al estímulo nociceptivo (lamer o sacudir las extremidades, miccionar o saltar) se registró como tiempo de latencia, estableciendo el tiempo de corte en 30 segundos.

En ambos ensayos las dosis de extracto evaluadas fueron 31.6, 100 y 316 mg/kg *p.o.*, empleando como vehículo solución salina isotónica (0.9%) con Tween 80® al 0.05% y morfina 5 mg/kg *i.p.* como controles blanco y positivo, respectivamente. Todos los tratamientos fueron administrados treinta minutos antes de la estimulación térmica y los tiempos de latencia se registraron antes de la administración y a los 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a ella.

El efecto antinociceptivo acumulativo se determinó midiendo el área bajo la curva (ABC) de un análisis de curso temporal, realizando un ANADEVIA de una vía seguido de la prueba estadística t-Dunnett para encontrar diferencias significativas entre el control blanco y los grupos evaluados ($p<0.05$).

3.5.2.2 Modelo de estiramiento abdominal

El extracto orgánico de *C. filaginoides* en dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg *p.o.* fue evaluado en un modelo de estiramiento abdominal inducido por ácido acético en cuarenta ratones machos (20-25 g) divididos en cinco grupos ($n=8$). Se empleó solución salina isotónica (0.9%) con Tween 80® al 0.05% como control blanco y dipirona 100 mg/kg *i.p.* como control positivo. Tanto los controles como los tratamientos fueron administrados treinta minutos antes de la administración intraperitoneal de ácido acético 0.6% a razón de 0.1 mL/10 g de peso.

Los animales fueron colocados en cajas de acrílico y observados durante treinta minutos; en ese lapso de tiempo se presentaron contracciones abdominales, flexiones de las patas traseras y estiramientos que fueron contados de forma acumulativa cada cinco minutos. El potencial antinociceptivo acumulativo se expresó como la reducción en el número de contracciones abdominales, realizando un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba t-Dunnett para determinar diferencias significativas entre el control blanco y los grupos tratados ($p < 0.05$).

3.5.3 Evaluación de la actividad sobre la motilidad intestinal

Para la determinación de la actividad de *C. filaginoïdes* sobre la motilidad intestinal se realizó el protocolo descrito por Palacios-Espinosa *et al.* (2008). Se emplearon cuarenta ratones machos con 18 horas de ayuno y libre acceso a agua (20-25 g), divididos en cinco grupos ($n=8$). El extracto acuoso se evaluó a las dosis de 31.6, 100 y 316 mg/kg, empleando solución salina isotónica (0.9%) con Tween 80® al 0.05% y loperamida 8 mg/kg *p.o.* como controles blanco y positivo, respectivamente.

Después de 15 minutos de recibir los tratamientos, los animales fueron administrados con 0.5 mL *p.o.* de una suspensión de carbón activado al 10% con goma acacia al 5%. Transcurridos veinte minutos de esta administración, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó la disección del intestino delgado del píloro al ciego.

Los resultados se expresan como porcentaje de avance que se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de avance} = (A/B) \times 100$$

Donde

A= recorrido del marcador (carbón activado) en el intestino

B= longitud total del intestino

Posteriormente, se realizó un ANADEVIA de una vía seguido de una prueba t-Dunnett para encontrar diferencias estadísticas significativas entre el control blanco y las dosis de extracto acuoso evaluadas ($p < 0.05$).

3.5.4 Evaluación del potencial antidiabético de los extractos orgánico y acuoso

La actividad antidiabética de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* fueron evaluados en modelos de tipo agudo diseñados a partir de los protocolos ya descritos en la literatura, tanto en ratones normoglucémicos como en diabéticos (Verspohl, 2002; Guerrero-Analco, 2007).

Para cada ensayo se emplearon cuarenta ratones machos de la cepa ICR (20-25 g) divididos en cinco grupos ($n=8$) que fueron privados de alimento 12 horas antes de cada evaluación, pero con libre acceso a agua.

3.5.4.1 Determinación de los niveles de glucemia

Se realizó una pequeña incisión en la cola de los animales para la recolección de las muestras sanguíneas de la vena caudal. La glucemia se obtuvo por el método enzimático de la glucosa oxidasa empleando un glucómetro comercial (One Touch Ultra 2TM, Johnson-Johnson, Denville, MA, USA).

3.5.4.2 Inducción experimental de diabetes mellitus

Se administró por vía intraperitoneal una dosis de 30 mg/kg de β -Nicotinamida Adenina Dinucleótido (β -NAD Sigma Co., St Louis, MO) a animales normoglucémicos. Quince minutos después les fue administrada una dosis única de 100 mg/kg de estreptozotocina disuelta en una solución amortiguadora de citratos 0.1 M (pH = 4.5). Ambas soluciones fueron administradas a razón de 0.1 mL/10 g de peso.

La glucemia fue medida siete días después de la administración de la estreptozotocina, siendo los valores mayores a 140 mg/dL criterio de inclusión para considerar a un animal como diabético.

3.5.4.3 Efecto hipoglucemiante agudo de los extractos orgánico y acuoso

3.5.4.3.1 Animales normoglucémicos

El extracto orgánico fue evaluado en tres grupos de animales sanos ($n=8$) que fueron tratados con dosis únicas de 31.6, 100 y 316 mg/kg. En el caso del extracto acuoso los animales recibieron dosis de 100, 177 y 316 mg/kg. En cada caso, dos grupos de animales normoglucémicos ($n=8$) tomados como controles blanco y positivo fueron administrados con solución salina isotónica (0.9%) con Tween 80® al 0.05% y glibenclamida 10 mg/kg *p.o.*, respectivamente. Luego, los niveles de glucosa sanguínea (mg/dL) fueron determinados a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración de los tratamientos.

Con los valores así obtenidos se calculó la variación porcentual de glucemia de acuerdo a la expresión siguiente:

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

Donde G_i es la glucemia basal (0 horas) y G_t es cada uno de los valores de glucemia a los tiempos de muestreo (1.5, 3, 5, 7 y 9 horas).

3.5.4.3.2 Animales diabéticos

Se emplearon ochenta animales diabéticos que fueron divididos en diez grupos ($n=8$); tres de estos grupos fueron administrados con dosis únicas de 31.6, 100 y 316 mg/kg de extracto orgánico y otros tres grupos se trataron con 100, 177 y 316 mg/kg de extracto acuoso. Los otros cuatro grupos fungieron como controles (blanco: solución salina isotónica 0.9% con Tween 80® al 0.05%, y positivo, glibenclamida 10 mg/kg *p.o.*).

La glucemia fue determinada a las 0, 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración de los tratamientos y se calculó el porcentaje de variación glucémico con la expresión antes indicada.

3.5.4.4 Efecto del extracto orgánico de *C. filaginoides* sobre la tolerancia a la glucosa

Cuarenta animales normoglucémicos con ocho horas de ayuno y libre acceso a agua fueron divididos en cinco grupos ($n=8$). Los dos primeros grupos fueron empleados como controles: solución salina 0.9% con Tween 80® al 0.05% (control blanco) y glibenclamida 10 mg/kg (control positivo). Los tres grupos restantes fueron administrados con dosis únicas de 100, 177 y 316 mg/kg de extracto orgánico de *C. filaginoides*. Todos los tratamientos se administraron *p.o.*, 0.2 mL/10 g de peso.

Treinta minutos luego de los tratamientos, se administró a todos los animales 1 g/kg de una solución de glucosa (Sigma Co., St Louis, MO) *p.o.* a razón de 0.2 mL/10g de peso. Los niveles de glucosa sanguínea se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la administración de la carga de glucosa y se obtuvo el porcentaje de variación de éstos como se describió en el inciso **3.5.4.3.1**.

Esta metodología se repitió empleando el mismo número de animales diabéticos y obteniendo las variaciones en la glucemia como establecido.

3.5.4.5 Efecto de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* sobre la tolerancia a la sacarosa

En ensayos independientes, se evaluaron los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* en dosis de 100, 177 y 316 mg/kg. Para cada experimento, se emplearon cuarenta animales con ocho horas de ayuno y libre acceso a agua divididos en cinco grupos ($n=8$). El control blanco consistió de solución salina (0.9%) con Tween 80® al 0.05% y el control positivo fue acarbosa 3 mg/kg. Todos los tratamientos se administraron *p.o.* a razón de 0.2 mL/10 g de peso.

Treinta minutos luego de los tratamientos, se administró a todos los animales 3 g/kg de una solución de sacarosa (Sigma Co., St Louis, MO) *p.o.* a razón de 0.2 mL/10g de peso. Los niveles de glucemia se midieron a los 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la

administración de la carga de sacarosa y se obtuvo el porcentaje de variación como se mencionó en el inciso **3.5.4.3.1**. Esta evaluación se realizó en animales normoglucémicos y en animales diabéticos.

3.5.5 Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos de la evaluación del potencial antidiabético de los extractos de *C. filaginoides* están expresados como el promedio \pm el error estándar (EEM). Para determinar diferencias estadísticas significativas entre el control blanco y los tratamientos ($p < 0.05$), se realizó un ANADEVIA de dos vías seguido de las pruebas estadísticas Bonferroni.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron (*Asteraceae*) fue seleccionada para establecer sus parámetros de identidad, composición y eficacia, teniendo en consideración su uso y comercialización extendidos como planta medicinal. Así, la presente investigación está dividida en dos partes; la primera que describe algunos ensayos de identidad y composición considerando los lineamientos establecidos por la OMS y la segunda que se refiere a estudios selectos encaminados a determinar la eficacia preclínica de la droga cruda.

4.1 Ensayos de identidad

El establecimiento de perfiles cromatográficos de preparados de plantas medicinales mediante técnicas adecuadas representa uno de los avances más importantes en cuanto al aseguramiento de su calidad. El análisis de los aceites esenciales y de los compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha conducido a una identificación más eficaz de sus componentes. Por otra parte, la obtención de “huellas digitales” mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia permite establecer patrones de los metabolitos presentes en la plantas y la estabilidad de éstos (Liang *et. al.*, 2009).

4.1.1 Perfiles cromatográficos del aceite esencial

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es una de las técnicas más usadas para el control de calidad de aceites esenciales obtenidos a partir de plantas medicinales. En el análisis realizado se consideraron como criterios de identificación de los compuestos detectados en los cromatogramas a los índices de retención de Kováts y los espectros de masas generados, los cuales se compararon con los de las bases de datos de referencia y los descritos en la literatura especializada.

El análisis por CG-EM permitió establecer que los constituyentes mayoritarios del aceite esencial son el alcohol (Z)-3-hexen-1-ol (**25**) (11.60%) y los terpenoides *trans*-pinocarveol (**32**) (11.52%), *cis*-sabinol (**39**) (9.88%), óxido de cariofileno (**3**) (8.72%), pulegona (**42**) (7.13%), isoeugenol (**65**) (6.82%), *o*-cimeno (**28**) (5.07%), aldehído perilla (**45**) (2.96%), linalool (**30**) (2.72%), α -terpineol (**37**) (2.56%), *cis-p*-ment-2-en-1-ol (**31**) (2.51%) y carvona (**43**) (2.06%), además de aldehído benzoico (**26**) (3.65%). A la fecha, este es el primer reporte de los componentes volátiles presentes en la esencia de *C. filaginoides*.

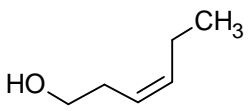
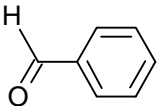
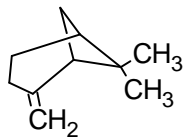
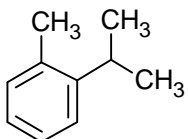
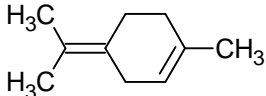
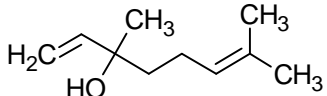
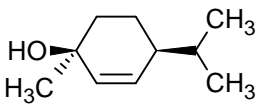
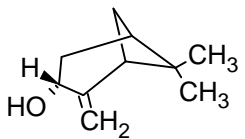
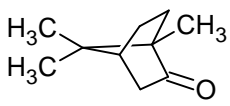
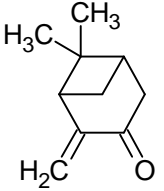
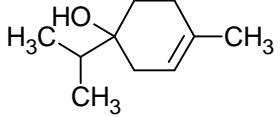
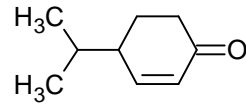
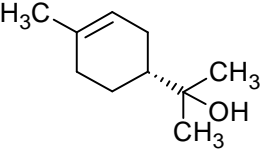
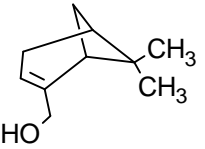
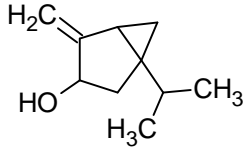
Con los resultados obtenidos de este análisis se puede realizar una comparación respecto a lo reportado para aceites esenciales de otras especies del género *Conyza*. Así, Barbosa y colaboradores (2005) identificaron como compuestos mayoritarios del aceite esencial de *C. bonarensis* al éster metílico de matricaria, limoneno, manool y carvona, y en menor proporción, γ -terpineno, linalool, *p*-menta-1,3,8-trieno, terpinen-4-ol y α -terpineol. Por otra parte, Lis y colaboradores (2002) reportaron como compuesto mayoritario del aceite esencial de *C. canadensis* al *R*-(+)-limoneno en concordancia por lo descrito por Hrutfiord y colaboradores (1988); ambas investigaciones refieren también la presencia del *trans*- α -bergamoteno, *cis*- α -bergamoteno, β -pineno, mirceno y (Z)- β -farneseno en menor abundancia. En otro estudio, Ndiege y colaboradores (2005) reportaron como componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. newii* al aldehído perilla, limoneno, 2-metil-5-(metiletil)-2-ciclohexen-1-ol, alcohol perilla y 1,8-cineol.

Las diferencias encontradas en la naturaleza de los componentes, así como las variaciones en abundancia de los compuestos comunes en todos los aceites analizados podrían ser de utilidad a la hora de establecer los criterios de identidad encaminados al aseguramiento de la calidad de la droga cruda y sus preparados, enfocándose en primera instancia a la diferenciación entre especies del género *Conyza* y entre aceites obtenidos de la misma especie sometida a diferentes condiciones ambientales, de cultivo o recolección.

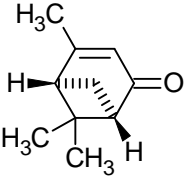
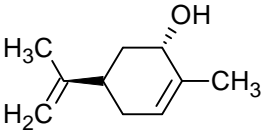
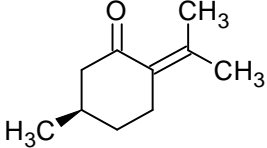
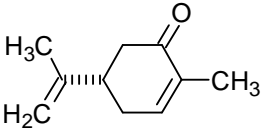
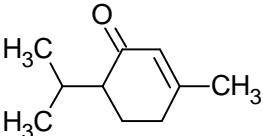
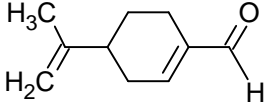
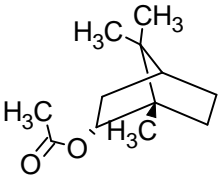
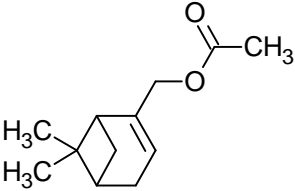
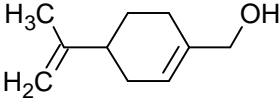
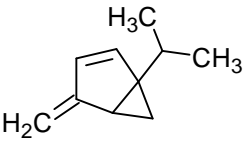
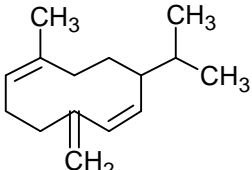
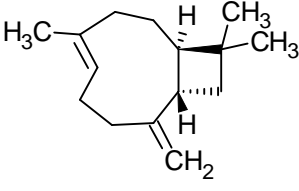
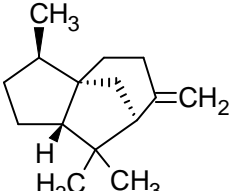
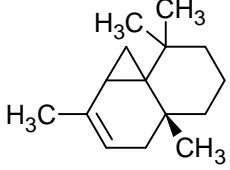
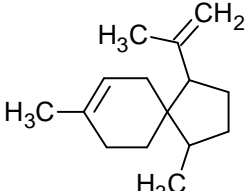
En el **Cuadro 4** se muestran las estructuras de los compuestos identificados en el aceite esencial de *C. filaginoides*; las **Tablas 2 y 3** presentan los resultados del análisis y

en las **Figuras 5** y **6** se realiza la asignación de los picos cromatográficos de los compuestos mayoritarios.

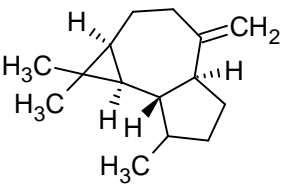
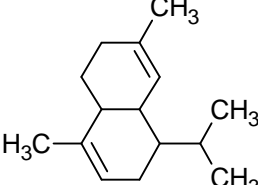
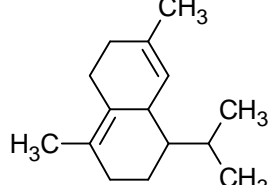
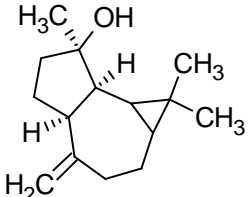
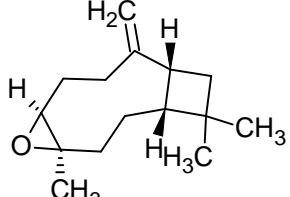
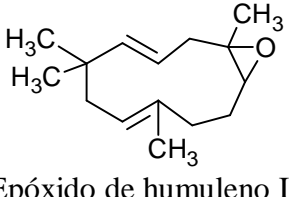
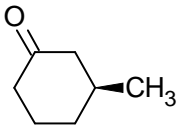
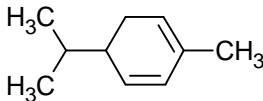
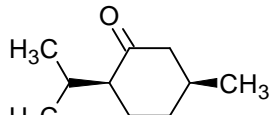
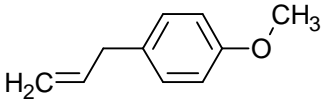
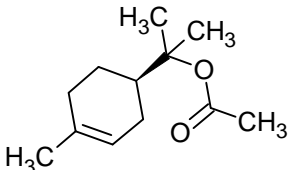
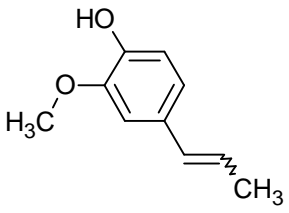
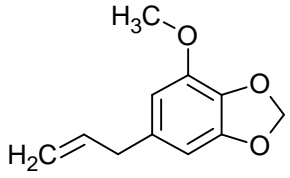
Cuadro 4. Constituyentes del aceite esencial de *C. filaginoides*

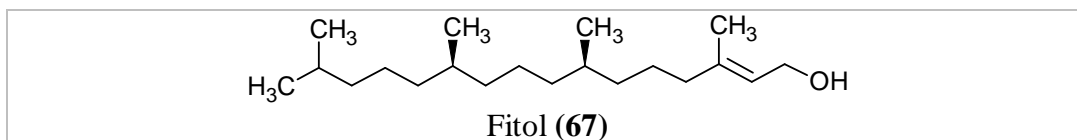
 (Z)-3-Hexen-1-ol (25)	 Aldehído benzoico (26)	 β-Pineno (27)
 o-Cimeno (28)	 Terpinoleno (29)	 Linalool (30)
 cis-p-Ment-2-en-1-ol (31)	 trans-Pineocarveol (32)	 Alcanfor (33)
 Pinocarvona (34)	 Terpinen-4-ol (35)	 Criptona (36)
 α-Terpineol (37)	 Mirtenol (38)	 cis-Sabinol (39)

Cuadro 4. Constituyentes del aceite esencial de *C. filaginoides* (Continuación)

 <p><i>d</i>-Verbenona (40)</p>	 <p><i>trans</i>-Carveol (41)</p>	 <p>Pulegona (42)</p>
 <p>Carvona (43)</p>	 <p>Piperitona (44)</p>	 <p>Aldehído perilla (45)</p>
 <p>Acetato de bornilo (46)</p>	 <p>(-)-Acetato de mirtenilo (47)</p>	 <p>Alcohol perilla (48)</p>
 <p>Tuja-2,4(10)-dieno (49)</p>	 <p>Germacreno D (50)</p>	 <p>β-Cariofileno (51)</p>
 <p>β-Cedreno (52)</p>	 <p>Tujopseno (53)</p>	 <p>β-Acoradieno (54)</p>

Cuadro 4. Constituyentes del aceite esencial de *C. filaginoides* (Continuación)

 <p>Aromadendreno (55)</p>	 <p>α-Amorfenol (56)</p>	 <p>δ-Cadineno (57)</p>
 <p>(-)-Espatuleno (58)</p>	 <p>Óxido de cariofileno (3)</p>	 <p>Epóxido de humuleno II (59)</p>
 <p>(<i>R</i>)-3-Metil-ciclohexanona (60)</p>	 <p>α-Felandreno (61)</p>	 <p>Isomentona (62)</p>
 <p>Estragol (63)</p>	 <p>Acetato de α-terpinilo (64)</p>	 <p>Isoeugenol (65)</p>
 <p>Miristicina (66)</p>		

Cuadro 4. Constituyentes del aceite esencial de *C. filaginoides* (Continuación)

Tabla 2: Componentes del aceite esencial de *C. filaginoides*. Muestra diluida (0.005 mg/mL)

Compuesto	IR	% de área
(Z)-3-Hexen-1-ol (25)	851	6.56
Aldehído benzoico (26)	941	1.00
β -Pino (27)	978	0.24
<i>o</i> -Cimeno (28)	976	3.36
Terpinoleno (29)	1082	0.29
Linalool (30)	1086	5.40
<i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol (31)	1108	5.00
<i>trans</i> -Pinocarveol (32)	1126	7.47
Alcanfor (33)	1123	0.82
Pinocarvona (34)	1137	1.21
Terpinen-4-ol (35)	1164	3.76
Criptona (36)	1160	1.78
α -Terpineol (37)	1176	5.10
Mirtenol (38)	1178	2.44
<i>cis</i> -Sabinol (39)	1140	19.65
D-Verbenona (40)	1183	0.69
<i>trans</i> -Carveol (41)	1200	1.29
Pulegona (42)	1215	4.09
Carvona (43)	1214	4.10
Piperitona (44)	1226	1.54
Aldehído perilla (45)	1260	2.32
Acetato de bornilo (46)	1270	0.44
(-)-Acetato de mirtenilo (47)	1313	0.45
Alcohol perilla (48)	1280	0.54
Tuja-2,4(10)-dieno (49)	936	2.57

IR: Índice de retención de Kováts

Tabla 2. Componentes del aceite esencial de *C. filaginoides*. Muestra diluida (0.005 mg/mL) (Continuación)

Compuesto	IR	% de área
Germacreno D (50)	1479	0.48
Cariofileno (51)	1421	0.38
β -Cedreno (52)	1424	0.24
Tujopseno (53)	1434	0.30
β -Acoradieno (54)	1465	1.46
Aromadendreno (55)	1443	0.25
α -Amorfeno (56)	1477	1.34
δ -Cadineno (57)	1520	0.63
(-)-Espatulenol (58)	1572	1.40
Óxido de cariofileno (3)	1578	9.64
Epóxido de humuleno II (59)	1602	1.74

IR: Índice de retención de Kováts

Tabla 3. Componentes del aceite esencial de *C. filaginoides*. Muestra concentrada (0.05 mg/mL)

Compuesto	IR	% de área
(Z)-3-Hexen-1-ol (25)	851	16.68
R-3-Metil-ciclohexanona (60)	928	1.22
Aldehído benzoico (26)	941	6.32
β -Pino (27)	978	0.31
<i>o</i> -Cimeno (28)	976	6.78
α -Felandreno (61)	1002	1.22
<i>trans</i> -Pinocarveol (32)	1126	15.60
Isomentona (62)	1146	2.58
Estragol (63)	1175	2.92
α -Terpineol (37)	1176	2.87
Pulegona (42)	1215	10.20
Aldehído perilla (45)	1260	3.60
Acetato de α -terpinilo (64)	1335	1.63
Isoeugenol (65)	1381	13.70
β -Acoradieno (54)	1465	2.48
Miristicina (66)	1489	3.71
Óxido de cariofileno (3)	1546	7.78
Fitol (67)	2114	0.38

IR: Índice de retención de Kováts

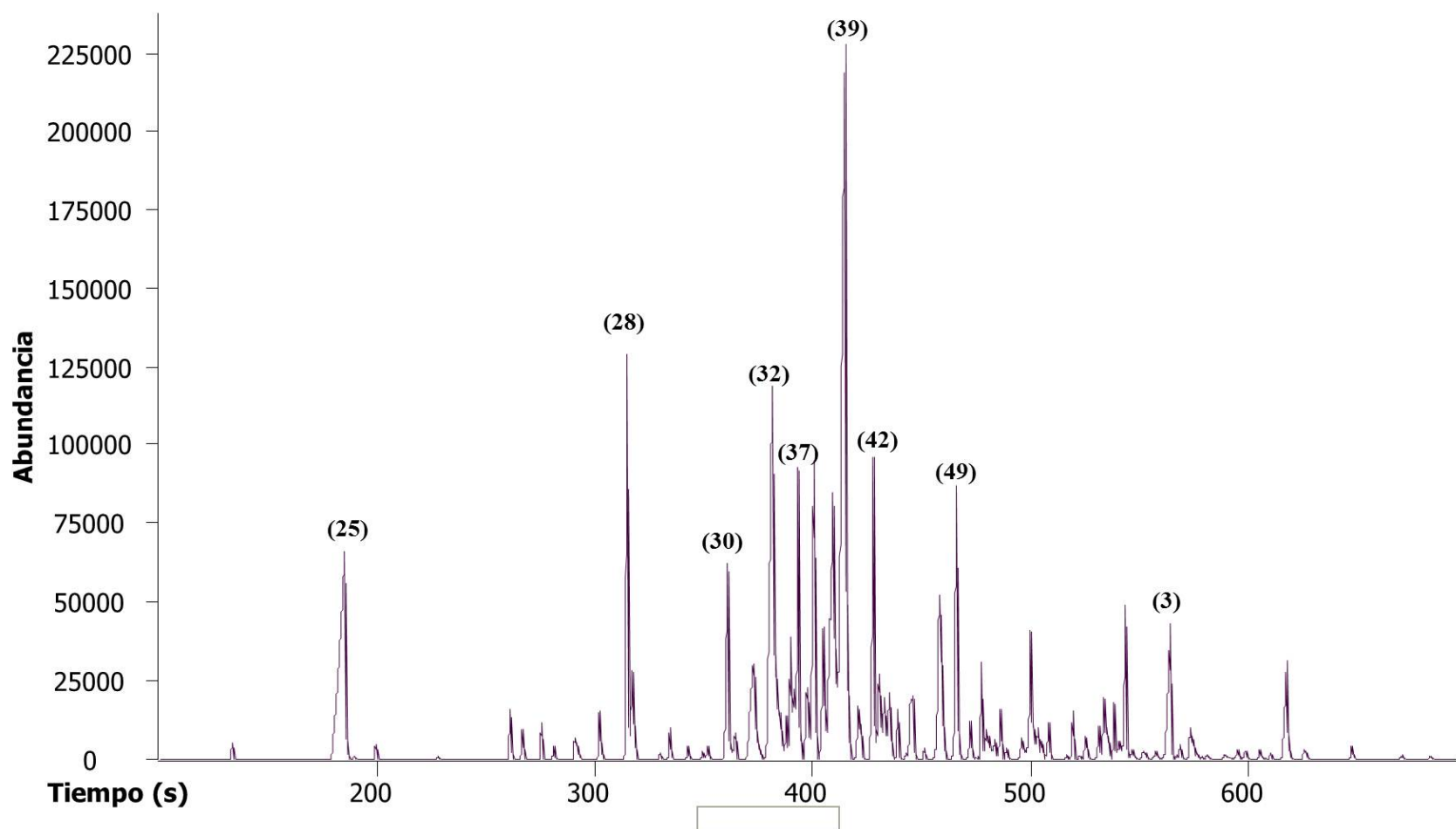


Figura 5. Cromatograma del aceite esencial de *C. filaginoides*. Muestra diluida (0.005 mg/mL): (*Z*)-3-hexen-1-ol (**25**), *o*-cimeno (**28**), linalool (**30**), *trans*-pinocarveol (**32**) α -terpineol (**37**), *cis*-sabinol (**39**), pulegona (**42**), tuja-2,4(10)-dieno (**49**) y óxido de cariofileno (**3**).

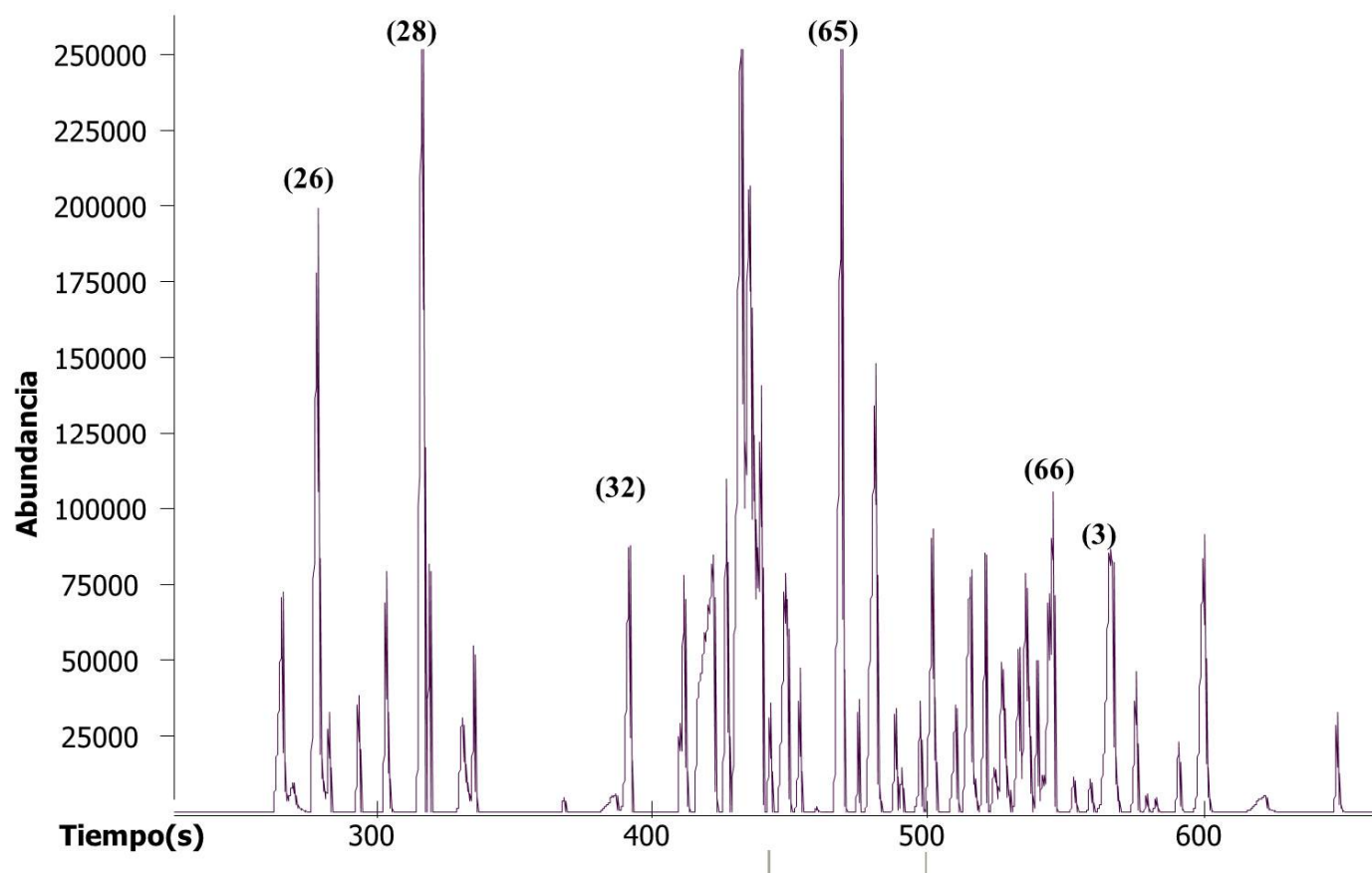


Figura 6. Cromatograma del aceite esencial de *C. filaginoides*. Muestra concentrada (0.05 mg/mL): aldehído benzoico (26), *o*-cimeno (28), *trans*-pineocarveol (32), isoeugenol (65), miristicina (66) y óxido de cariofileno (3).

4.1.2 Perfiles cromatográficos de los compuestos volátiles presentes en la planta completa

Para la determinación de los compuestos volátiles de *C. filaginoides* se empleó la técnica de microextracción en fase sólida en fase de vapor (HS-MEFS) y la identificación de los compuestos como se describió en el inciso anterior (CG-EM).

Esta técnica versátil, reproducible, sensible y selectiva, es útil en la preparación de muestras y en la extracción de analitos de interés. Depende de las características estructurales y de volatilidad de los analitos, de las propiedades fisicoquímicas y de composición química de las fases (fibras), así como de la afinidad entre la fibra y el analito (Bicchi *et al.*, 2000).

La naturaleza química de los analitos que se desean extraer determina el tipo de fase empleada en la microextracción. Los compuestos volátiles presentes en las plantas medicinales pertenecen a varias clases de productos naturales, como terpenoides, productos de degradación de ácidos grasos y carotenoides, fenilpropanoides, derivados de aminoácidos, alcanos, alquenos, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas (Maffei *et al.*, 2011). Así, para el desarrollo del método de microextracción se consideró la diversidad estructural de los analitos que pudiesen estar presentes en el material vegetal de *C. filaginoides* y se seleccionaron tres tipos de fibras de diferente composición y polaridad: polidimetilsiloxano (PDMS), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS).

La fibra PDMS es una de las más utilizadas en los procesos de extracción debido a sus características fisicoquímicas, pues soporta bien la temperatura del inyector del cromatógrafo de gases (superior a 300 °C) y es una fase no polar que puede extraer compuestos de mayor polaridad luego de optimizar condiciones de extracción. Además, las fases mixtas, como la CAR/PDMS y la DVB/CAR/PDMS ofrecen ventajas complementarias respecto a la fase PDMS. En las segundas, el proceso de adsorción de los analitos responde a la porosidad de las partículas de DVB y permite la separación de compuestos más volátiles, además aumentan la selectividad en la extracción al

discriminar compuestos de alto peso molecular (Pawliszyn, 1997). Con estas tres fases se aseguró la extracción de compuestos considerando diferencias en polaridad, volatilidad y pesos moleculares.

Ahora bien, el modo de extracción en fase de vapor obedeció a las características físicas de la muestra a analizar, además de que el tiempo de equilibrio en este modo de extracción es relativamente bajo y los compuestos determinados son de mediana a alta polaridad. Este método también ofrece un incremento en la selectividad si se controla la temperatura de extracción (Pawliszyn, 1997; Vas y Vékey, 2004). A este último respecto, las variaciones en los perfiles cromatográficos obtenidos a distintas temperaturas permitieron establecer que la extracción a temperatura ambiente mostraba los mejores resultados.

Aunado a la selección de las fibras, el modo de extracción y la temperatura, la adición de NaCl a las muestras analizadas incrementó la eficiencia en la extracción al aumentar la distribución entre los analitos y las fibras empleadas (Pawliszyn, 1997; Supelco, 1998).

El análisis por HS-MEFS-CG-EM permitió establecer que los principales compuestos volátiles presentes son *p*-cimeno (**77**), α -felandreno (**61**), *m*-cimeno (**72**), limoneno (**80**), β -felandreno (**73**), β -pineno, γ -terpineno (**74**), *o*-cimeneno (**78**), terpinoleno (**29**), 3-careno (**76**), α -terpineno (**71**) y (\pm)- α -pineno (**69**).

En el **Cuadro 5** se muestran las estructuras de los compuestos identificados mediante HS-MEFS-CG-EM. Los resultados de los análisis independientes se muestran en las **Tablas 4, 5 y 6**. La **Tabla 7** presenta una comparación de los resultados y la asignación de los picos cromatográficos se realiza en las **Figuras 7, 8 y 9**. El análisis de los compuestos volátiles constituye una valiosa herramienta para el establecimiento de los perfiles de identidad química de *C. filaginoides*.

Cuadro 5. Compuestos volátiles determinados por HS-MEFS-CG-EM

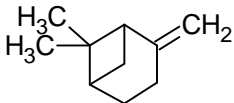
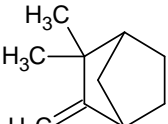
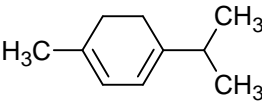
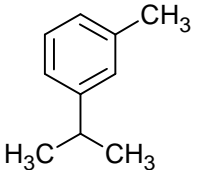
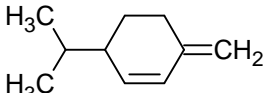
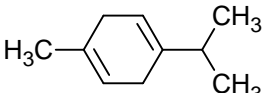
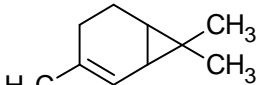
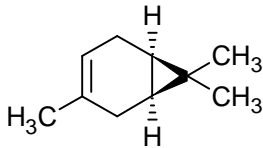
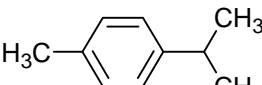
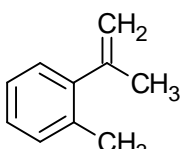
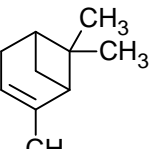
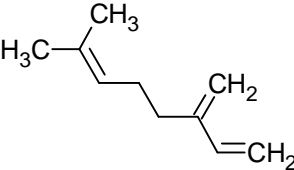
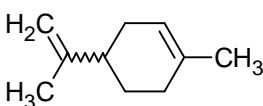
 <p>(±)-α-Pineneno (69)</p>	 <p>Camfeno (70)</p>	 <p>α-Terpineno (71)</p>
 <p><i>m</i>-Cimeno (72)</p>	 <p>β-Felandreno (73)</p>	 <p>γ-Terpineno (74)</p>
 <p>δ-2-Careno (75)</p>	 <p>3-Careno (76)</p>	 <p><i>p</i>-Cimeno (77)</p>
 <p><i>o</i>-Cimeno (78)</p>	 <p>α-Pineneno (79)</p>	 <p>β-Mirceno (80)</p>
 <p>Limoneno (81)</p>		

Tabla 4. Resultados del análisis de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra PDMS (IR, índice de retención de Kováts)

Compuesto	IR	% Área
(±)- α -Pino (69)	936	2.66
Campfeno (70)	950	0.32
β -Pino (27)	978	10.58
α -Felandreno (61)	1002	26.75
α -Terpineno (71)	1013	4.20
<i>m</i> -Cimeno (72)	1013	24.93
β -Felandreno (73)	1023	17.56
γ -Terpineno (74)	1051	9.77
Terpinoleno (29)	1082	1.57
Acetato de bornilo (46)	1270	0.55
Tuja-2,4-(10)-dieno (49)	946	0.32
Mirtenol (38)	1178	0.53
δ -2-Careno (75)	1000	0.26

Tabla 5. Resultados del análisis de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra CAR/PDMS (IR, índice de retención de Kováts)

Compuesto	IR	% Área
(±)- α -Pino (69)	936	3.84
β -Pino (27)	978	5.50
3-Careno (76)	1010	4.24
<i>p</i> -Cimeno (77)	1015	78.06
Terpinoleno (29)	1082	3.33
<i>o</i> -Cimeno (78)	1076	5.04

Tabla 6. Resultados del análisis de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra DVB/CAR/PDMS (IR, índice de retención de Kováts)

Compuesto	IR	% Área
α -Pino (79)	936	1.45
Campfeno (70)	950	0.06
β -Pino (27)	978	10.87
β -Mirceno (80)	987	1.40
α -Felandreno (61)	1002	25.80
Terpinoleno (29)	1082	4.60
<i>m</i> -Cimeno (72)	1013	20.97
<i>p</i> -Cimeno (77)	1015	3.32
Limoneno (81)	1025	21.57
β -Felandreno (73)	1023	4.84
γ -Terpineno (74)	1051	5.11

Tabla 7. Comparación de los resultados obtenidos con las distintas fibras empleadas

Compuesto	IR	Fibra		
		PDMS	CAR/PDMS	DVB/CAR/PDMS
(±)- α -Pinenos (69)	936	✓	✗	✓
α -Pinenos (79)	936	✗	✓	✗
Tuja-2,4(10)-dieno (49)	946	✓	✗	✗
Campfeno (70)	950	✓	✓	✗
β -Pinenos (27)	978	✓	✓	✓
β -Mirceno (80)	987	✗	✓	✗
δ -2-Careno (77)	1000	✓	✗	✗
α -Felandreno (61)	1002	✓	✓	✗
3-Careno (76)	1010	✗	✗	✓
α -Terpineno (71)	1013	✓	✗	✗
<i>m</i> -Cimeno (72)	1013	✓	✓	✗
<i>p</i> -Cimeno (77)	1015	✗	✓	✓
β -Felandreno (73)	1023	✓	✓	✗
Limoneno (80)	1025	✗	✓	✗
γ -Terpineno (74)	1051	✓	✓	✗
<i>o</i> -Cimeno (78)	1076	✗	✗	✓
Terpinoleno (29)	1082	✓	✓	✓
Mirtenol (38)	1178	✓	✗	✗
Acetato de bornilo (46)	1270	✓	✗	✗
✓ : Presente ✗: Ausente				

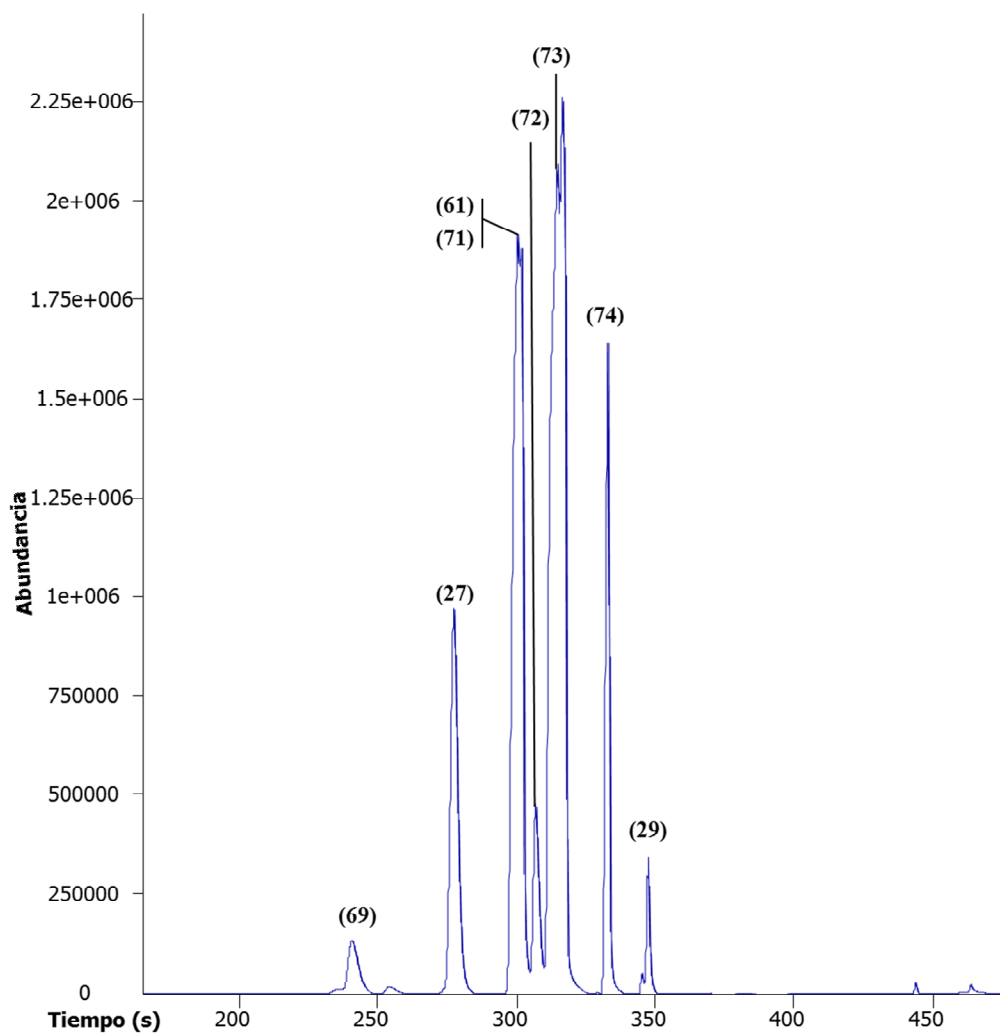


Figura 7. Cromatograma de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra PDMS: (\pm)- α -pineno (69), β -pineno (27), α -felandreno (61), α -terpineno (71), *m*-cimeno (72), β -felandreno (73), γ -terpineno (74), terpinoleno (29).

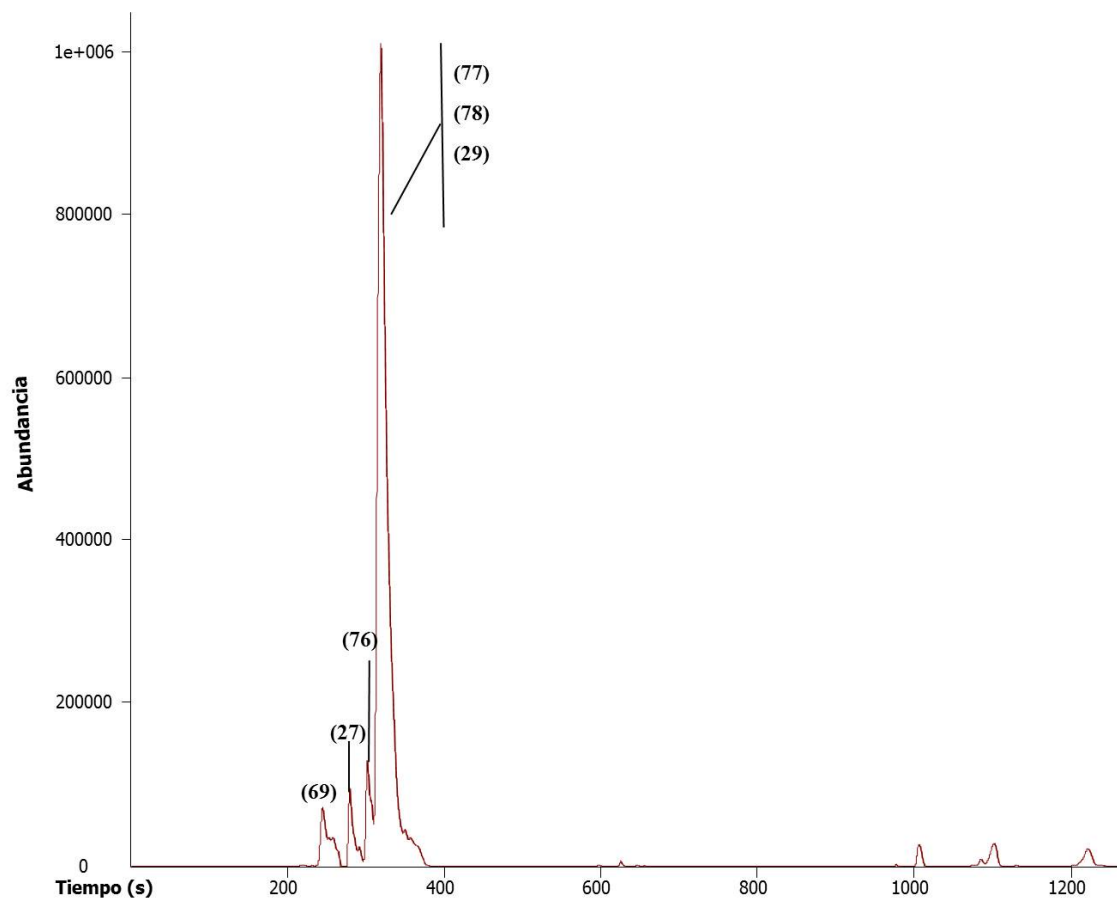


Figura 8. Cromatograma de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra CAR/PDMS: (\pm)- α -pineno (69), β -pineno (27), 3-careno (76), *p*-cimeno (77), *o*-cimeno (78) y terpinoleno (29).

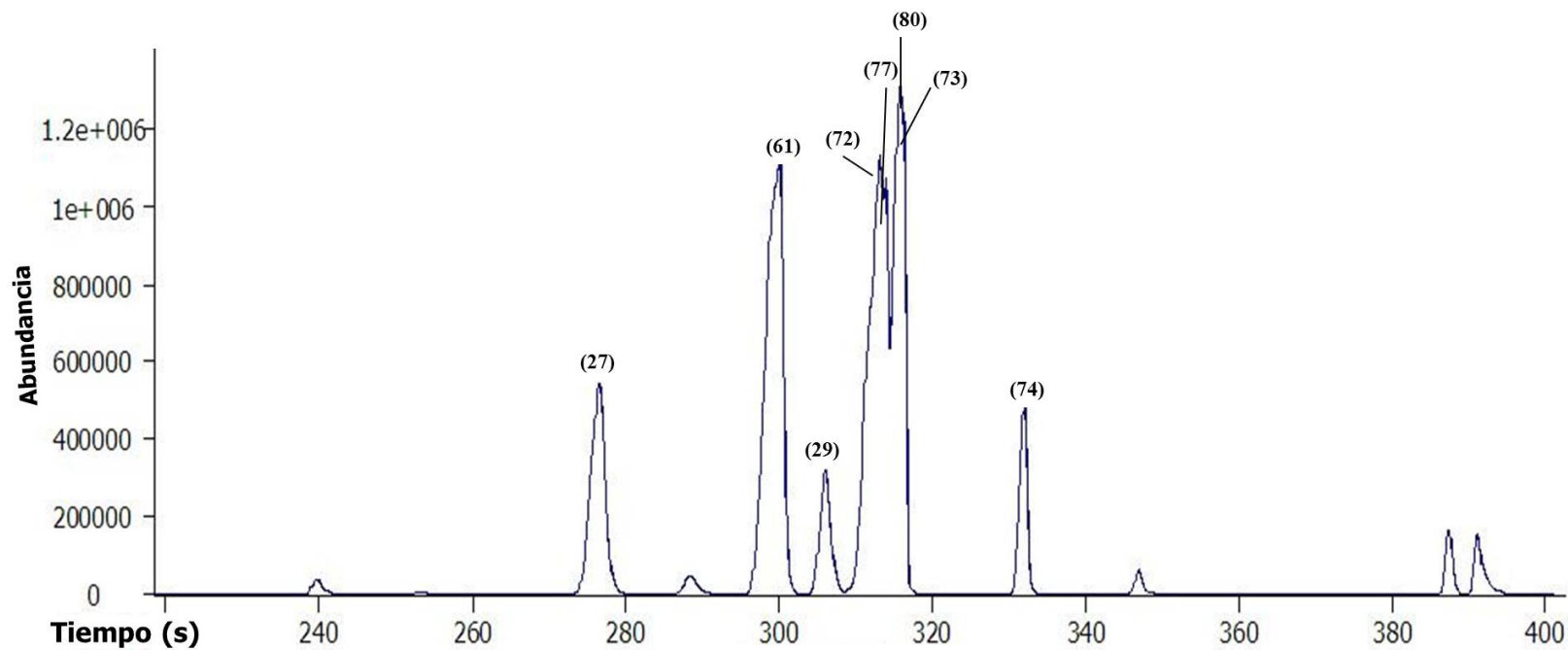


Figura 9. Cromatograma de los compuestos volátiles de *C. filaginoides*. Fibra DVB/CAR/PDMS: β -pineno (27), α -felandreno (61), terpinoleno (29), *m*-cimeno (72), *p*-cimeno (77), limoneno (80), β -felandreno (73) y γ -terpineno (74).

4.2 Ensayos de composición

Los extractos orgánico y acuoso obtenidos a partir del material vegetal fragmentado de *C. filaginoides* fueron generados mediante la optimización de las condiciones de extracción, que para el extracto orgánico fueron maceración exhaustiva con mezcla CH_2Cl_2 -MeOH (1:1) y para el extracto acuoso, infusión. Éste último corresponde a la forma tradicional en la que el simonillo es usado en las prácticas médicas populares del país.

4.2.1 Perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* por CCF

Sin duda, la cromatografía de capa fina (CCF) es una herramienta fundamental para el establecimiento cualitativo de la composición de las plantas medicinales; la sencillez en su implementación y sus costos relativamente bajos la posicionan como una de las técnicas reconocidas oficialmente por la OMS y las farmacopeas a nivel mundial para el aseguramiento de la calidad de los productos naturales medicinales (WHO, 1998).

Sin embargo, la complejidad de los extractos y productos herbolarios hace que el análisis se enfoque a componentes selectos cuya identidad es determinada previamente; la detección de estos compuestos (activos o no) denominados marcadores es la primera estrategia para el control de calidad (Cieśla y Waksmundzka-Hajnos, 2009).

De esta manera, las diferencias observadas en los perfiles obtenidos bajo las mismas metodologías pueden atribuirse a la variabilidad de los compuestos marcadores debida a las condiciones medioambientales (temperatura, humedad, exposición a la luz), de producción, recolecta, conservación y almacenamiento a las que las plantas medicinales son sometidas (Liang *et al.*, 2009). Además, los perfiles cromatográficos de las drogas y extractos reducen el riesgo de confusión asociado al uso de distintas plantas con los mismos nombres comunes, sirven como identificadores de plantas del mismo género cuya especie está en duda y ayudan a la detección de sustancias adulterantes y contaminantes (Alaerts *et al.*, 2010).

Los perfiles cromatográficos obtenidos por CCF presentados en las **Figuras 10 y 11** de los extractos orgánico y acuoso, respectivamente, muestran a la rutina (**6**) como compuesto marcador de ambos extractos.

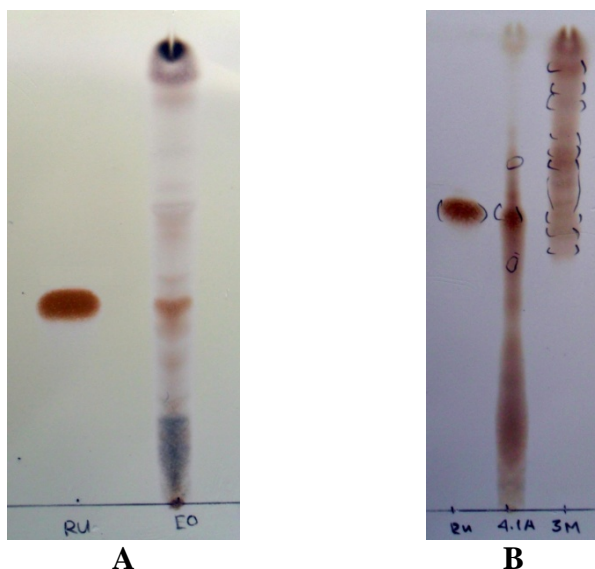


Figura 10. Perfil cromatográfico por CCF. **A.** Carril 1, rutina; carril 2, extracto orgánico de *C. filaginoides*. Fase móvil: AcOEt:MeOH:H₂O (7.3:1.7:1). **B.** Partición del extracto orgánico de *C. filaginoides*. Carril 1, rutina; carril 2, fracción IV; carril 3, fracción III. Fase móvil: AcOEt:MeOH:H₂O (7.5:1.5:1). Fase estacionaria: sílica gel (Merck, tamaño de partícula: 5-20 μ m). Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal.



Figura 11. Perfil cromatográfico por CCF del extracto acuoso de *C. filaginoides*. Carril 1, rutina; carril 2, extracto acuoso. Fase móvil: AcOEt:MeOH:H₂O (7:2:1). Fase estacionaria: sílica gel (Merck, tamaño de partícula: 5-20 μ m). Solución reveladora de sulfato cérico amoniacal.

4.2.2 Establecimiento de los perfiles cromatográficos mediante CLAE

A pesar de su utilidad, los perfiles cromatográficos obtenidos por CCF proporcionan información limitada que puede complementarse con la implementación de otras técnicas de análisis como lo es la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE). El análisis de las huellas digitales obtenidas por CLAE representa una forma más objetiva de determinar la composición de extractos y preparados fitoterapéuticos, puesto que son patrones característicos basados en los compuestos detectados, o si se prefiere, son perfiles químicos que representan a la muestra analizada (Alaerts *et al.*, 2010).

Las huellas digitales son aceptadas por la OMS como estrategia para la identificación y aseguramiento de la calidad de preparados fitoterapéuticos y exhorta a sus países miembros a crear protocolos que las generen (WHO, 1991). Además, el análisis de las huellas digitales evita la estandarización de un extracto o preparado fitoterapéutico en relación a un único compuesto marcador que descarte el efecto sinérgico de todos los componentes sobre la actividad farmacológica, encaminando las investigaciones posteriores a demostrar la eficacia de extractos y preparados (Hendriks *et al.*, 2005).

Entonces, el desarrollo de huellas digitales por CLAE requiere el establecimiento y optimización de metodologías que conduzcan a la mejor resolución, selectividad y reproducibilidad en el proceso de separación de los componentes de las plantas medicinales. Los perfiles así obtenidos se usan para autenticar e identificar productos herbolarios (Ji *et al.*, 2005).

4.2.2.1 Optimización de las condiciones cromatográficas

Un enfoque práctico para el desarrollo de huellas digitales es seleccionar un grupo específico de compuestos. Los estudios fitoquímicos previos realizados a *C. filaginoides* determinaron que la planta contiene flavonoides y terpenoides, siendo los flavonoles glicosídicos rutina (6), astragalina (7), isoquercitrina (8), nicotiflorina (9) y narcisina

(10), así como la aglicona quercetina (13), los compuestos más abundantes (Calzada *et al.*, 2001). Tomando esto en consideración, se realizó una revisión en la literatura especializada sobre metodologías encaminadas a la obtención de perfiles cromatográficos por CLAE de extractos ricos en flavonoides.

Se seleccionó fase reversa para la generación de los perfiles cromatográficos considerando el hecho de que la mayoría de los reportes para separación de flavonoides descritos refieren a trabajos realizados con columnas C₁₈; la información disponible y la generada puede entonces compararse considerando las variaciones en los soportes, sistemas y modos de elución empleados (Dubber y Kanfer, 2004; Ingkaninan *et al.*, 2004; Chen y Xiao, 2005; Zu *et al.*, 2006; Fathiazad *et al.*, 2006; Arsic *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011).

Por otra parte, Kanazawa y colaboradores (2003) establecieron una metodología mediante CLAE de fase reversa y detector de UV-Vis de arreglo de fotodiodos con la cual se determinó el contenido de polifenoles en diversos productos alimenticios, generando así una biblioteca que contiene tiempos de retención, longitud de onda de detección (λ_{\max}), espectros de agliconas y curvas de calibración de 100 estándares. Se reportan los datos para la rutina (6), isoquercitrina (8) y quercetina (13), cuyas λ_{\max} se encuentran entre 253 nm y 352 nm. Este trabajo sirvió como referente para el establecimiento de las λ de trabajo en 254 nm y 280 nm empleando de igual forma un detector de arreglo de diodos.

El modo de elución utilizado en esta investigación fue de tipo gradiente lineal, que de acuerdo a los distintos reportes en la literatura demostró ser de utilidad para la separación de los flavonoides del simonillo (Deng *et al.*, 2008).

La mezcla de elución se estableció ensayando en primera instancia sistemas de MeOH-H₂O y ACN-H₂O en diversas proporciones (para ambas mezclas: 50:50, 75:25, 85:15, 90:10, 100:0). Sin embargo, la retención no fue satisfactoria debido a la polaridad de los componentes del extracto evaluado. Se utilizó entonces un sistema de elución ternario constituido por MeOH-ACN-H₂O con el que si bien se mejoró la retención, los

picos presentaron ensanchamiento y coleo. La adición de distintos ácidos orgánicos a la fase móvil mejoró la selectividad y retención de la muestra. Se probaron distintas concentraciones de ácido fórmico (0.1-0.5%), trifluoroacético (0.01-0.05%) y fosfórico (0.5-1%) adicionadas al agua obteniéndose la mejor separación con ácido fosfórico en una concentración de 1%. De igual forma, la velocidad de flujo se estableció con rangos que variaban de los 0.6 a 1.2 mL/min, siendo esta última la empleada en la generación del perfil cromatográfico.

Entonces, la selección de estas condiciones correspondió a aquellas que ofrecieron buena resolución, menor tiempo de análisis y presiones de trabajo bajas (Snyder *et al.*, 1997; Zu *et al.*, 2006).

La coelución de una muestra de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* y de una solución estándar de rutina (**6**), corroboró la presencia de este flavonoide como compuesto mayoritario en ambos extractos; en los dos casos se observó un incremento en el área bajo la curva del pico correspondiente a (**6**). De esta manera, se estableció a (**6**) como el compuesto marcador de ambos extractos. En las **Figuras 12 y 13** se muestran los perfiles cromatográficos de los extractos orgánico y acuoso obtenidos por CLAE.

4.2.3 Validación de un método analítico por CLAE

A pesar de su amplio uso en la terapéutica tradicional mexicana, ni *C. filaginoides* ni los preparados derivados de ella son sometidos a controles de calidad en los que se estandarice el contenido de algunos de sus componentes que sirvan como marcadores, poniendo en duda la calidad y por ende, la seguridad y eficacia de la especie.

Como se estableció en los perfiles cromatográficos por CCF y CLAE de los extractos orgánico y acuoso, la rutina (**6**) es el compuesto marcador. Entonces, el protocolo desarrollado para la validación del método analítico por CLAE se encaminó a la cuantificación de este compuesto en el extracto orgánico de *C. filaginoides*

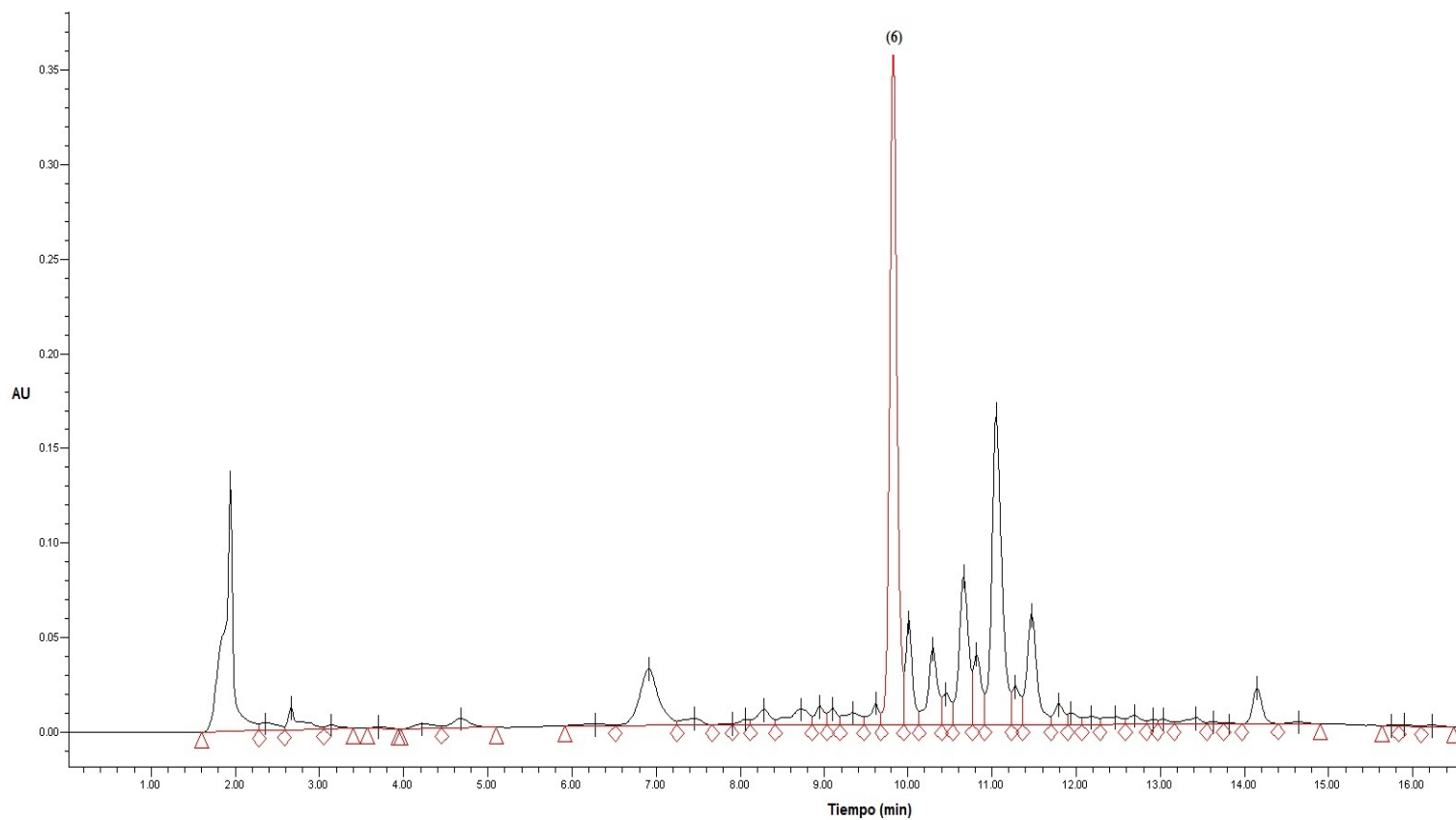


Figura 12. Perfil cromatográfico por CLAE del extracto acuoso de *C. filaginoides*. Columna Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (5 μm , 250 \times 4.0 mm). Fase móvil, MeOH-ACN-H₂O + H₃PO₄ 1%. Tipo de elución gradiente lineal: 5% MeOH, 15-40% ACN, 0-15 min. $\lambda = 254$ nm. Velocidad de flujo 1.2 mL/min. Volumen de inyección 20 μl . Rutina (6) en $t_R = 9.825$ min.

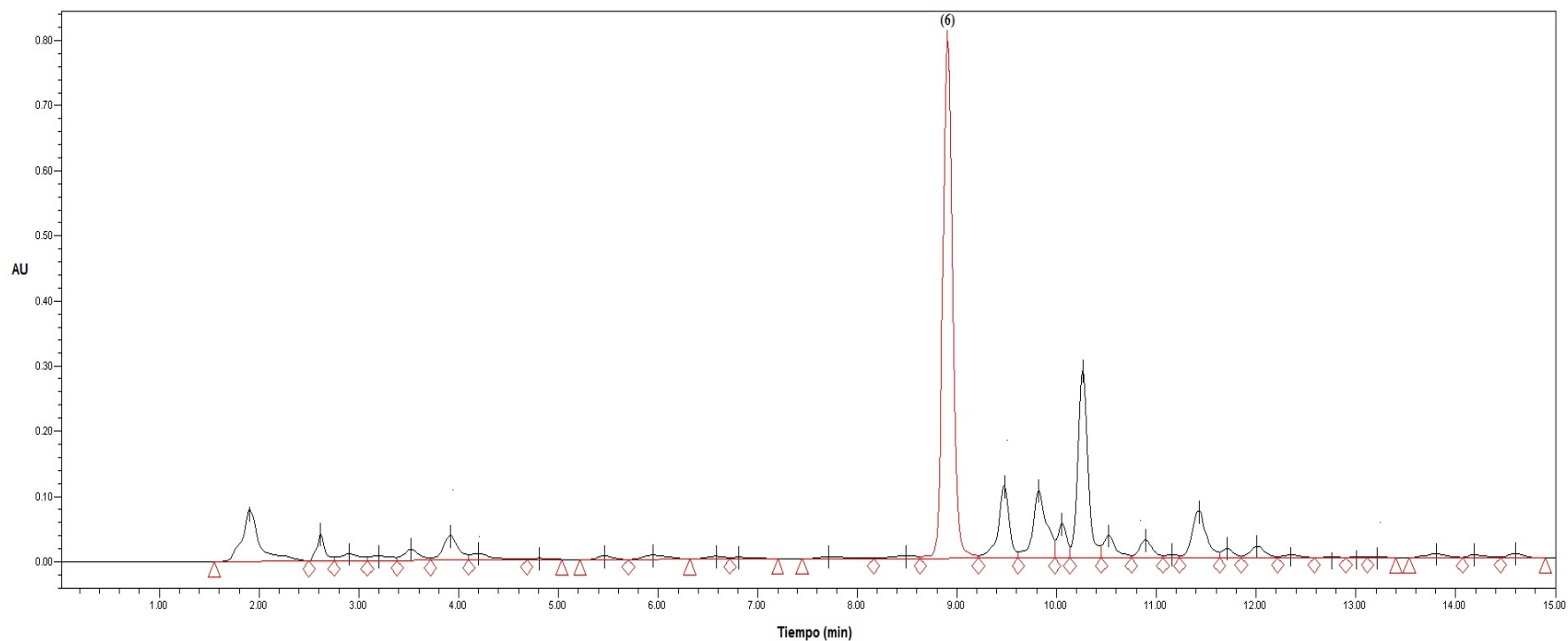


Figura 13. Perfil cromatográfico por CLAE del extracto orgánico de *C. filaginoides*. Columna Hibar® RT LiChrospher® 100 RP-18 (5 μ m, 250 \times 4.0 mm). Fase móvil, MeOH-ACN-H₂O + H₃PO₄ 1%. Tipo de elución gradiente lineal: 5% MeOH, 15-40% ACN, 0-15 min. λ = 254 nm. Velocidad de flujo 1.2 mL/min. Volumen de inyección 20 μ l. Rutina (6) en t_R = 8.905 min.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia es una excelente técnica analítica cuantitativa. Un método analítico bien diseñado, validado y ejecutado tendría altos niveles de precisión y exactitud en el análisis de los componentes seleccionados. En ese sentido, validar un método se refiere a demostrar experimentalmente la capacidad que éste posee para cumplir el propósito para el que fue diseñado (García *et al.*, 2002).

Para lograr mejores resultados con un método analítico por CLAE deben controlarse los parámetros que afectan la cuantificación del componente seleccionado (Snyder *et al.*, 1997). De esta manera, en el presente trabajo se evaluaron algunos de los parámetros de calidad establecidos en las Guías de Validación publicadas por la FDA [ICH Q2 (R1), 2005] y por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A.C., que se detallan a continuación.

4.2.3.1 Linealidad del sistema

Es requisito que un método analítico cuantitativo mida al analito de interés en un rango amplio de concentraciones y que la respuesta asociada sea lineal, es decir, que tanto los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito (Snyder *et al.*, 1997).

Para el sistema evaluado, la linealidad se estableció construyendo una curva de calibración con diferentes niveles de concentración de rutina (**6**), en un rango de 50 a 750 $\mu\text{g/mL}$. La rutina (**6**) fue aislada previamente de la especie *C. filaginoides* y tiene una pureza de 99% de acuerdo a los análisis espectroscópicos realizados (Mata *et al.*, 1997 y Calzada *et al.*, 2001). Los resultados para la curva de calibración se muestran en la **Tabla 8** y en la **Figura 14** se presenta la gráfica de dicha curva. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión simple y los parámetros estadísticos calculados se presentan en la **Tabla 9**.

Tabla 8. Resultados experimentales de la curva de calibración de rutina (6)

Concentración (µg/mL)	Área					
	1	2	3	4	5	6
750	18770336	17544402	18471540	18374420	18664301	17529219
625	15146356	14737312	15340141	15212519	15209418	16068592
500	12246031	11589800	12986125	11958903	11613402	12068622
375	8886293	8875422	9362437	9017268	9019856	8427975
250	6450057	6101242	6644929	6257205	6283934	5834465
100	2441187	2463562	2763433	2724149	2655812	2207241
50	1272557	1260988	1490844	1387651	1349229	1119415

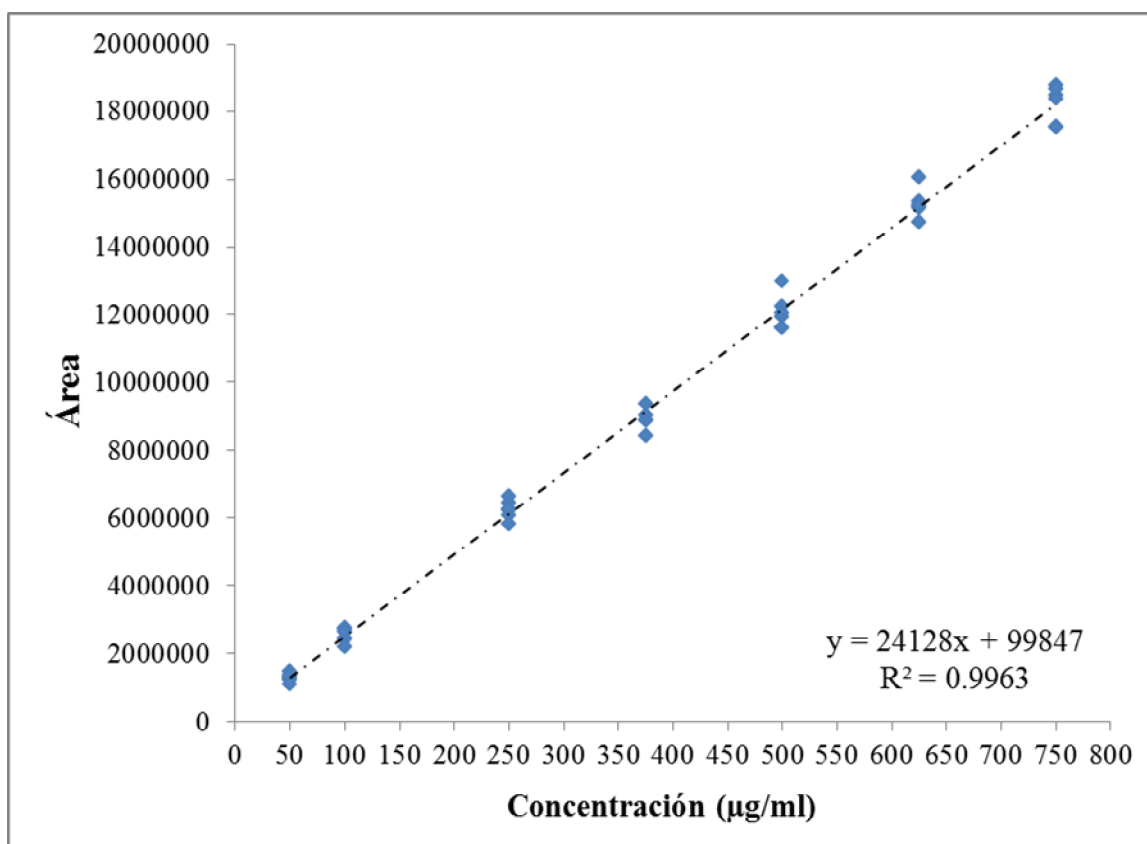


Figura 14. Gráfica de evaluación de la linealidad del sistema de la rutina (6)

Tabla 9. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del sistema

Pendiente (b_1)	24127.9873
Ordenada al origen (b_0)	99847.4275
Coefficiente de correlación (R)	0.9981
Coefficiente de determinación (R^2)	0.9963
Intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$]	23655.8-24600.2
$t_{0,95,40}$	2.021

Ahora bien, para evaluar si la ecuación de regresión obtenida describe satisfactoriamente la relación entre la concentración de rutina (**6**) y la respuesta analítica, se realizó un análisis de variancia de la regresión lineal. El resultado de tal análisis indicó que el estadístico de Fisher (F) calculado (-10282.17) es distinto del crítico [F 0.05 (40, 40) = 0.59]. Entonces, la variación en la respuesta analítica se encuentra explicada por el modelo propuesto, que es lineal en el intervalo de concentraciones ensayado.

4.2.3.2 Linealidad del método y exactitud (porcentaje de recobro)

Las mediciones del área bajo la curva proporcionan la respuesta analítica en función del detector empleado. La respuesta entonces debe relacionarse con la concentración del analito de interés, para lo que se usan principalmente cuatro técnicas de cuantificación: el área de pico normalizada, estándar externo, estándar interno y el método de adiciones patrón (Snyder *et al.*, 1997). Ahora bien, para evaluar si el método analítico propuesto es lineal para el rango de concentraciones establecido, se cuantificó el porcentaje de recobro del analito rutina (**6**). Se construyó una curva de calibración a partir de disoluciones de la matriz enriquecidas con una muestra de referencia de que contenían tres diferentes niveles de concentración de rutina (**6**). Las cantidades adicionadas a la matriz fueron 50, 500 y 750 $\mu\text{g/mL}$. En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos; el ajuste de datos se realizó mediante regresión lineal simple. La **Figura 15** corresponde a la gráfica de linealidad del método y los parámetros estadísticos calculados se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 10. Resultados de la linealidad del método cantidad adicionada-cantidad recuperada en porcentaje por nivel

Solución	Cantidad adicionada (µg/mL)	Área	Cantidad recuperada (µg/mL) o	% Recobro
1	750	18528381	763.78	101.84
2	750	17859516	736.06	98.14
3	750	18035363	743.35	99.11
4	750	18373967	757.38	100.98
5	750	17913698	738.31	98.44
6	500	12134119	498.77	99.75
7	500	12104594	497.54	99.51
8	500	11942836	490.84	98.17
9	500	12176492	500.52	100.10
10	500	12241371	503.21	100.64
11	50	1293933	49.49	98.98
12	50	1304732	49.94	99.87
13	50	1328645	50.93	101.86
14	50	1292881	49.45	98.89
15	50	1299486	49.72	99.44

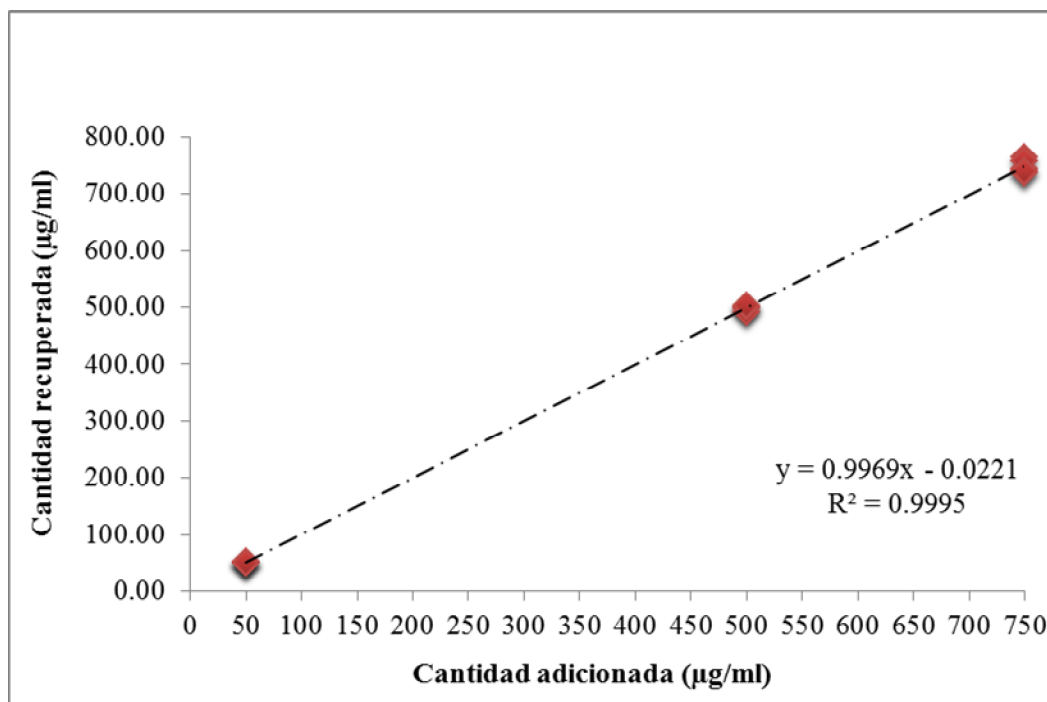


Figura 15. Gráfica de la evaluación de la linealidad del método

Tabla 11. Parámetros estadísticos calculados para la linealidad del método

Pendiente (b_1)	0.9969
Ordenada al origen (b_0)	-0.0221
Coefficiente de correlación (R)	0.9997
Coefficiente de determinación (R^2)	0.9995
Intervalo de confianza para la pendiente [$IC(\beta_1)$]	0.9829-1.0108
Intervalo de confianza para la ordenada [$IC(\beta_0)$]	-7.2932-7.2491
$t_{0.95,13}$	2.160
Coefficiente de variación de regresión del recobro $CV_{y/x}$	0.1118%

Los resultados obtenidos permiten determinar que el método analítico es lineal, puesto que cumple con los criterios de aceptación establecidos en las guías normativas seleccionadas para este estudio (García *et al.*, 2002; ICH Q2 (R1), 2005).

La exactitud del método se estableció mediante el porcentaje de recobro obtenido y cuyos resultados se muestran en la **Tabla 10**. El promedio del porcentaje de recobro se encuentra en el intervalo aceptado para el método analítico (98-102%) y el intervalo calculado (98.14-101.86%) incluye al 100%, por lo que el método es exacto para el intervalo de concentraciones ensayado.

4.2.3.3 Precisión del método (repetibilidad)

La precisión del método analítico expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de una muestra homogénea bajo condiciones determinadas. Uno de los niveles de evaluación de la precisión se expresa en términos de repetibilidad (Snyder *et al.*, 1997). De acuerdo a lo establecido en la guía del ICH, la repetibilidad se evaluó mediante la respuesta analítica obtenida de siete soluciones con una concentración de 750 $\mu\text{L/mL}$. Los resultados obtenidos y los parámetros evaluados se presentan en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados experimentales de repetibilidad

Solución	Concentración (µg/mL)	Área
1	750	15581672
2	750	15382679
3	750	14864845
4	750	15173732
5	750	15152882
6	750	14941969
7	750	15460463
Media aritmética (\bar{y})		15222606
Desviación estándar (S)		266185.36
Coefficiente de variación (%CV)		1.75

El coeficiente de variación obtenido es menor a 2% (1.75%), por lo que se estableció la precisión del método.

4.2.3.4 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron a partir de la recta de calibración del inciso **4.2.3.1** de esta sección de resultados y discusión, empleando diez réplicas de una solución preparada con 1 mg/mL de la matriz de trabajo diluida 1:1 con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (2:8). En la **Tabla 13** se muestran los resultados del análisis y los límites calculados empleando las expresiones dadas en el inciso **3.4.3.4** del desarrollo experimental.

Tabla 13. Determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Solución	Área	LD	LC
1	433111	7.52 µg/mL	22.79 µg/mL
2	413953		
3	425801		
4	450363		
5	536165		
6	538328		
7	532067		
8	488745		
9	537371		
10	553518		

4.2.3.5 Estabilidad

Los estudios de estabilidad del estándar de rutina (**6**) realizados en este trabajo se refieren a la variación en la concentración bajo la influencia de condiciones de refrigeración, de exposición a radiación UV, así como hidrólisis ácida e hidrólisis básica. El resultado de la condición de refrigeración se expresa como la diferencia absoluta de la media aritmética de la condición de almacenaje respecto a la media aritmética del análisis inicial $|d_i|$. El valor obtenido fue de 25.25%, excediendo el recomendado de $|d_i| \leq 2\%$.

En lo que respecta a las condiciones de exposición a radiación e hidrólisis, sólo en el caso de la hidrólisis básica se presentó descomposición del estándar, evidencia de ello fue la disminución del área bajo la curva correspondiente a la rutina (**6**). Así, el promedio del contenido del estándar de (**6**) fue de 42.84% respecto a la concentración inicial de la solución preparada (500 µg/mL).

4.2.4 Cuantificación de rutina (6) en el extracto orgánico de *C. filaginoides*

Luego de validado el método analítico se cuantificó a la rutina (6) en ocho muestras preparadas de forma independiente con una concentración de 10 mg/mL de extracto orgánico de *C. filaginoides*. Se empleó la ecuación de la recta descrita para la linealidad del sistema, $y = 24128x + 99847$. En la **Tabla 14** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 14. Rutina (6) cuantificada en el extracto orgánico de *C. filaginoides*

Muestra	mg/100 g extracto
1	3664.98
2	3194.73
3	3641.27
4	3413.01
5	3739.45
6	3859.14
7	3573.09
8	3420.52
Media aritmética	3563.27
Desviación estándar	198.08

4.3 Eficacia preclínica. Estudios biológicos

Las plantas medicinales son empleadas para tratar las más variadas afecciones por amplios sectores de la población que no quieren o no pueden consultar a un médico alópata. Como se señaló en la sección de antecedentes, el incremento en el consumo de plantas medicinales y sus derivados hace necesario el desarrollo de protocolos experimentales que establezcan sus efectos farmacológicos y sus potenciales efectos adversos. Se requiere entonces evaluar la actividad de compuestos aislados, preparados y extractos de las plantas medicinales en los modelos farmacológicos convenientes (Heinrich *et al.*, 1998).

Algunas de las actividades farmacológicas atribuidas a *C. filaginoides* han sido demostradas de forma preclínica mediante ensayos *in vitro*; de la misma manera, los compuestos activos responsables de estas actividades se obtuvieron en forma pura a través de estudios biodirigidos (Mata *et al.*, 1997 y Calzada *et al.*, 2001).

Ahora bien, en esta sección se presentan los resultados de eficacia preclínica en ratones de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides*, obtenidos de estudios selectos que conducen a la validación de otros de sus usos tradicionales. Asimismo, se describen por vez primera estudios de toxicidad aguda en ratones.

4.3.1 Toxicidad aguda

La apreciación general sobre los remedios herbolarios es que son seguros debido a su uso ancestral por distintas culturas. Sin embargo, existen múltiples reportes de efectos adversos relacionados a la administración de plantas medicinales, que si bien en algunos casos se debieron a adulteraciones o contaminantes, en muchos otros pudieron asociarse directamente a los componentes químicos de las plantas y/o a las interacciones de éstos con alimentos y medicamentos alopáticos (Mosihuzzaman y Choudhary, 2008).

Resulta entonces necesario establecer la seguridad de las plantas medicinales y sus derivados como primer paso en un protocolo preclínico; la evaluación de los parámetros de inocuidad debe hacerse de acuerdo a metodologías y lineamientos éticos ya establecidos (WHO, 2000).

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad aguda (expresada como DL_{50}) de los extractos orgánico y acuoso íntegros de *C. filaginoides* empleando el método propuesto por Lorke (1983), cuyas ventajas son la obtención de resultados en tiempos cortos y empleando pocos animales ($n=3$), con lo que se optimizan recursos y se da cumplimiento a las normatividades éticas vigentes respecto a experimentación con animales (NOM-062-ZOO-1999).

Los resultados obtenidos presentados en la **Tabla 15** muestran que a las dosis ensayadas, los extractos orgánico y acuoso no son tóxicos para ratones, estableciendo así

que la DL_{50} para ambos es mayor a **5000 mg/kg**. Por otra parte, las observaciones conductuales de los animales durante el periodo de experimentación, permitieron descartar la presencia de efectos neurotóxicos. Además, el análisis macroscópico de los principales órganos no reveló ninguna clase de daño asociado a la administración de los extractos que sugiriera efectos tóxicos sistémicos.

Tabla 15. Toxicidad aguda de los extractos íntegros de *C. filaginoides*

Extracto evaluado	Primera fase		Segunda fase	
	Dosis (mg/kg)	Mortalidad	Dosis (mg/kg)	Mortalidad
Orgánico	10	0/3	1600	0/3
	100	0/3	2900	0/3
	1000	0/3	5000	0/3
Acuoso	10	0/3	1600	0/3
	100	0/3	2900	0/3
	1000	0/3	5000	0/3

4.3.2 Evaluación del potencial antinociceptivo

Conyza filaginoides es empleada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de afecciones gastrointestinales que cursan con dolor abdominal. Por ello se evaluó el potencial antinociceptivo del extracto orgánico con los modelos de placa caliente y estiramiento abdominal. Para la selección de estos modelos se consideró que de forma ideal, un modelo animal de nocicepción debe cumplir ciertas características, como lo son especificidad (tanto en el estímulo nociceptivo empleado como en la respuesta obtenida de ello), sensibilidad (cuantificar la respuesta considerando rangos de intensidad), validez (distinguir entre cambios conductuales inespecíficos), confiabilidad (consistencia en los resultados obtenidos) y reproducibilidad (Le Bars *et al.*, 2001). Como un único modelo no ofrece todas estas características, se emplearon los dos modelos señalados para obtener información complementaria.

4.3.2.1 Modelo de placa caliente

Los modelos de nocicepción que involucran estimulación térmica producen en los ratones dos componentes conductuales estereotipados que pueden ser evaluados experimentalmente: lamer las extremidades y saltar. Cabe mencionar que estas respuestas corresponden a respuestas supraespinales integradas, por lo que el modelo es específico para sustancias con actividad sobre sistema nervioso central. Por tanto, la sensibilidad de la prueba mejora si se considera como tiempo de latencia la aparición de cualquiera de estas conductas (Carter, 1991; Le Bars *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos para los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* se muestran en la **Figura 16** y **Figura 17**, respectivamente.

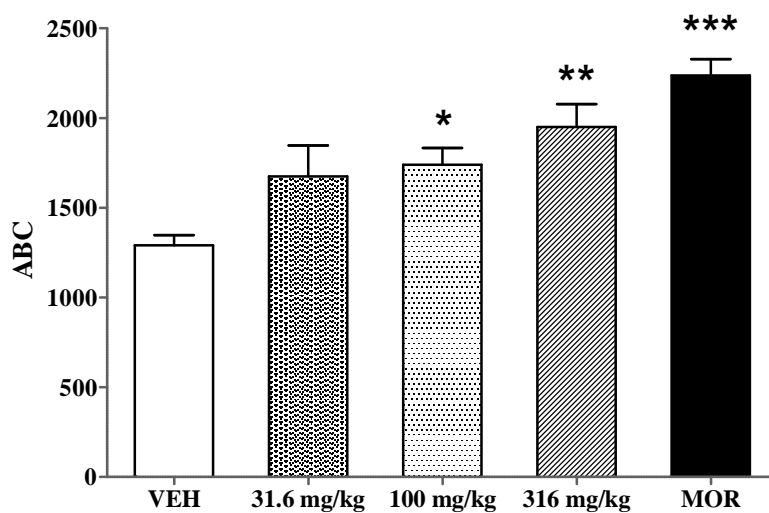


Figura 16. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. filaginoides*. Placa caliente. ABC: área bajo la curva, VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MOR: morfina 5 mg/kg. Cada barra representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n=8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

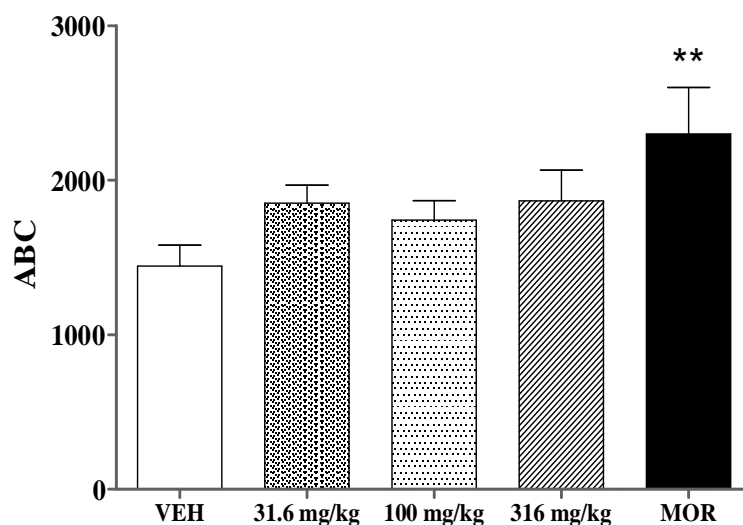


Figura 17. Efecto antinociceptivo del extracto acuoso de *C. filaginoides*. Placa caliente. ABC: área bajo la curva, VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), MOR: morfina 5 mg/kg. Cada barra representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n=8$). ** $p < 0.01$.

La evaluación del extracto orgánico en el modelo de la placa caliente permitió comprobar un efecto antinociceptivo significativo dependiente de la dosis (100 y 316 mg/kg, $p < 0.05$). No obstante, la evaluación del extracto acuoso no reveló efectos importantes a todas las dosis ensayadas.

El efecto antinociceptivo determinado en este modelo podría deberse a la presencia de rutina (**6**) como compuesto mayoritario en el extracto orgánico (como se determinó en las pruebas de composición), sin descartar los efectos sinérgicos de los otros componentes, pues se ha reportado con anterioridad que extractos orgánicos ricos en flavonoides poseen efectos antinociceptivos que han sido asociados a las propiedades antioxidantes de estos compuestos (Couto *et al.*, 2011; Awaad *et al.*, 2011). Aunado a esto, las propiedades analgésicas de dos especies de *Conyza* han sido investigadas, las de *C. sumatrensis*, cuyos extractos acuosos poseen actividad analgésica central y los extractos metanólicos de *C. dioscoridis*, evaluados en este mismo modelo (Asongalem *et al.*, 2004; Awaad *et al.*, 2011).

Sin embargo, el mecanismo de acción preciso del extracto orgánico de *C. filaginoides* debe establecerse empleando antagonistas de receptores específicos involucrados en las vías del dolor, como los opioides (Pires *et al.*, 2009).

4.3.2.2 Modelo de estiramiento abdominal

La nocicepción generada mediante agentes químicos tiene como característica principal ser una forma de estimulación lenta, progresiva y de más larga duración que la producida por estimulación térmica. Los comportamientos asociados a esta forma de nocicepción están bien caracterizados en ratones y pueden ser cuantificados con relativa sencillez (Le Bars *et al.*, 2001).

Los estiramientos abdominales generados por la administración intraperitoneal de agentes químicos que irritan las membranas serosas se consideran actos reflejos que evidencian dolor peritoneo visceral e inflamación y permiten la evaluación del efecto producido por analgésicos leves a nivel periférico. Aunque el modelo es inespecífico, es sensible y las dosis efectivas medias calculadas con éste pueden extrapolarse a humanos (Atta y EL-Sooud, 2004).

Los resultados de la evaluación del extracto orgánico presentados en la **Figura 18** muestran que a las dosis ensayadas, no se observó ningún efecto antinociceptivo significativo. Este hallazgo contrasta con las investigaciones que señalan que la rutina (**6**) es un inhibidor de la prostaglandina E₂, que interfiere con el metabolismo del ácido araquidónico e inhibe a la fosfodiesterasa dependiente de AMPc (Yildizolgu-Ari *et al.*, 1991). Estas acciones farmacológicas tienen como resultado la disminución de sustancias proinflamatorias y en consecuencia, del dolor. Resulta entonces necesario diseñar y conducir experimentos que establezcan el origen de las diferencias observadas en los resultados obtenidos.

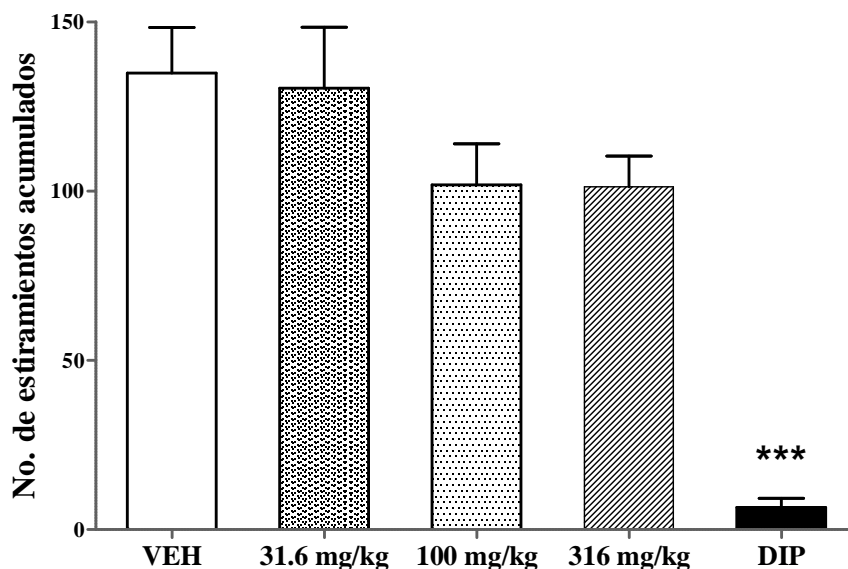


Figura 18. Efecto antinociceptivo del extracto orgánico de *C. filaginoides*. Estiramiento abdominal. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), DIP: dipirona 100 mg/kg. Cada barra representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n=7$). *** $p < 0.001$.

4.3.3 Evaluación sobre la motilidad intestinal

La literatura herbolaria mexicana refiere al simonillo para el tratamiento de cólicos intestinales y diarrea (Martínez, 1989). Para validar su eficacia de forma preclínica y corroborar la actividad antiespasmódica observada *in vitro* para extractos y compuestos aislados de *C. filaginoides* (Rojas *et al.*, 1995; Mata *et al.*, 1997), se evaluó al extracto acuoso empleando un modelo de tránsito intestinal. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 19**.

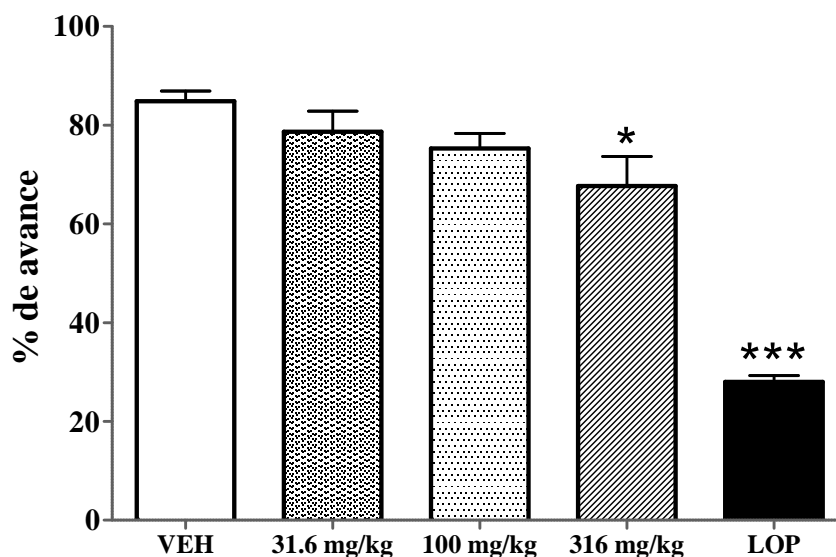


Figura 19. Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto acuoso de *C. filaginoides*. VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%), LOP: loperamida 8 mg/kg. Cada barra representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo ($n=6$). * $p<0.05$ y *** $p < 0.001$.

El efecto espasmolítico observado podría atribuirse a la presencia de rutina (6) como compuesto mayoritario del extracto acuoso, en concordancia con los resultados obtenidos *in vitro* por Mata y colaboradores (1997); además, en un modelo animal similar al realizado, la inyección intraperitoneal de rutina (6) redujo la motilidad en intestino delgado (Capasso *et al.*, 1999).

La evaluación de la actividad sobre músculo liso de otras especies de *Conyza*, demostró que el extracto metanólico de *C. dioscoridis* induce relajación persistente en duodeno de conejo de forma dependiente de la dosis; el extracto metanólico de *C. linifolia* produce una respuesta contráctil a dosis bajas, seguida de una relajación a dosis altas. En el primer caso, el mecanismo de acción postulado involucra el bloqueo de canales de calcio; en el segundo, no se obtuvieron resultados concluyentes empleando antagonistas muscarínicos y agonistas adrenérgicos (Atta *et al.*, 2004).

Es importante señalar que los resultados obtenidos de esta evaluación no son suficientes para proponer un posible mecanismo de acción del extracto acuoso de *C. filaginoides*; deben diseñarse metodologías encaminadas a discernir si existe o no sinergia entre los componentes del extracto acuoso, y qué clase de receptores están involucrados en el efecto espasmolítico observado, ya sean muscarínicos, adrenérgicos, opioides o canales de calcio (Gilani *et al.*, 2011; Takeuchi *et al.*, 2007).

4.3.4 Evaluación del potencial antidiabético

Además de los reportes de uso popular medicinal en padecimientos gastrointestinales, la infusión de las partes aéreas de simonillo figura en el índice etnobotánico que Andrade-Cetto y Heinrich (2005) elaboraron sobre plantas medicinales mexicanas empleadas en el tratamiento de la diabetes. Con base en el trabajo anterior y como parte de la evaluación de la eficacia preclínica de *C. filaginoides*, se describen los resultados obtenidos en algunos ensayos conducentes al establecimiento del potencial antidiabético de esta especie. Cabe resaltar que éste constituye el primer reporte preclínico *in vivo* de la eficacia antidiabética de una especie americana de *Conyza*.

La relevancia de las investigaciones preclínicas del potencial antidiabético de plantas medicinales radica en varios hechos fundamentales. En primera instancia, la diabetes mellitus se ha convertido en problema de salud público a nivel mundial. Las cifras publicadas por la OMS revelan que aproximadamente 346 millones de personas padecen algún tipo de diabetes, de los cuales un 0.1% muere a consecuencia de las complicaciones asociadas a los altos niveles de glucosa sanguínea. Los índices de morbilidad y mortalidad son elevados en los países pobres y en los de economías emergentes, como lo confirma la Encuesta Nacional de Salud de 2006 para México (Olaiz-Fernández *et al.*, 2006; WHO, 2011c). Los sistemas de salud se ven rebasados ante la creciente demanda de tratamientos más eficaces y con menos efectos adversos, además de baratos y de fácil adquisición. Frente a este panorama, el conocimiento etnobotánico surge como una de las principales fuentes de información en la búsqueda sistemática de nuevas entidades químicas con actividad biológica, como en el caso de la

metformina, medicamento antidiabético derivado de la galegina, una guanidina aislada de *Galega officinalis* L., cuyos usos se remontan al medioevo (Witters, 2001).

Por otra parte, la mayoría de las más de 1200 plantas medicinales empleadas empíricamente en todo el mundo para el tratamiento de la diabetes mellitus no han sido evaluadas farmacológicamente, ni se han determinado los compuestos químicos responsables de la actividad antidiabética. En nuestro país, aproximadamente 150 plantas son usadas popularmente como antidiabéticas y sólo un tercio de ellas han sido investigadas en extenso (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1997, 1998, 2002; Román-Ramos *et al.*, 1998).

Ahora bien, es fundamental que para sustentar científicamente los usos tradicionales de las plantas medicinales antidiabéticas se diseñen modelos farmacológicos que proporcionen información reproducible y confiable sobre su eficacia. Los modelos animales que se empleen deben adecuarse teniendo en cuenta la etiología y fisiopatología de la diabetes mellitus, considerando además las limitantes técnicas y de recursos disponibles. Idealmente, los experimentos preclínicos deben conducirse inicialmente *in vivo* y complementarse con estudios *in vitro* para establecer mecanismos de acción probables (Fröde y Medeiros, 2008).

Los modelos farmacológicos seleccionados (efecto hipoglucemiante agudo y tolerancia a la glucosa y sacarosa) evaluaron el potencial antidiabético de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* en animales sanos y en diabéticos mediante la determinación de sus efectos sobre los niveles de glucosa en sangre.

4.3.4.1 Efecto hipoglucemiante agudo

Una de las estrategias en el tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2 es la reducción de los niveles de glucemia mediante varios mecanismos; los medicamentos alopáticos de elección son los hipoglucemiantes orales, cuyos miembros más representativos son las sulfonilureas, las biguanidas, los inhibidores de α -glucosidasas y las tiazolinedionas. La normalización de los niveles de glucosa en sangre

reduce las complicaciones a largo plazo asociadas a la diabetes mellitus, como las cardiovasculares (Emilien *et al.*, 1999).

Para la evaluación del efecto hipoglucemiante agudo de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* se empleó el modelo descrito en el inciso 3.5.4.3 de la parte experimental. Los resultados para el extracto orgánico en animales normales muestran que existe un efecto hipoglucemiante luego de 1.5 horas (100 mg/kg $p < 0.05$) y a las 3 horas (316 mg/kg $p < 0.05$) (**Figura 20**). Si bien la evaluación de este extracto en animales diabéticos no mostró un efecto hipoglucemiante significativo, puede observarse una tendencia en la disminución de la glucemia (316 mg/kg) (**Figura 21**).

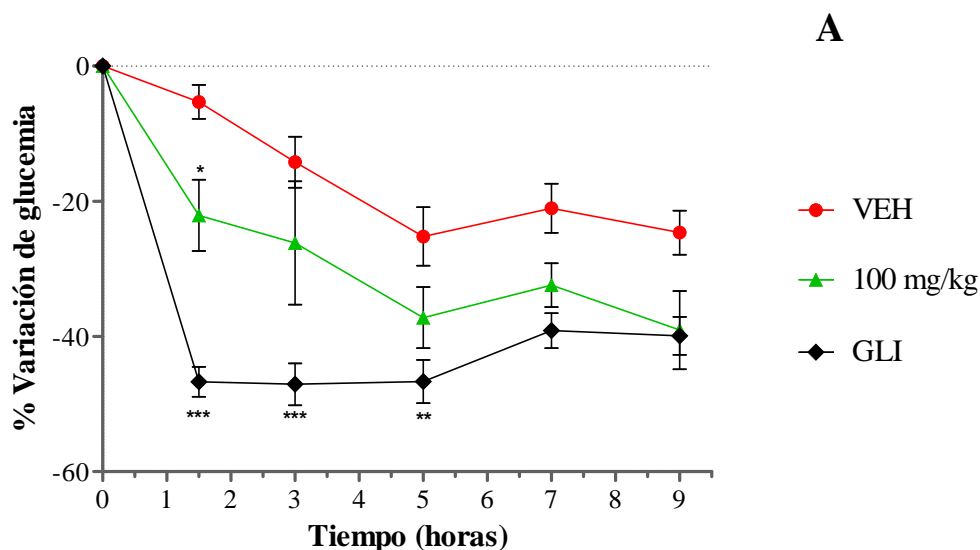


Figura 20. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales normoglucémicos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=5$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=10$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=8$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$.

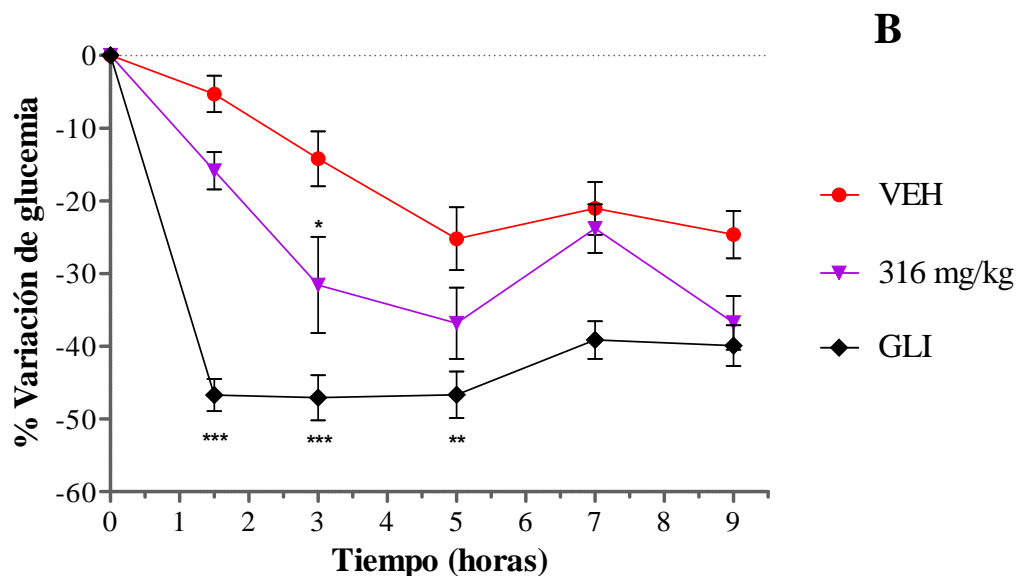


Figura 20. Continuación. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales normoglucémicos. **B. Dosis 316 mg/kg** ($n=4$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=10$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=8$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

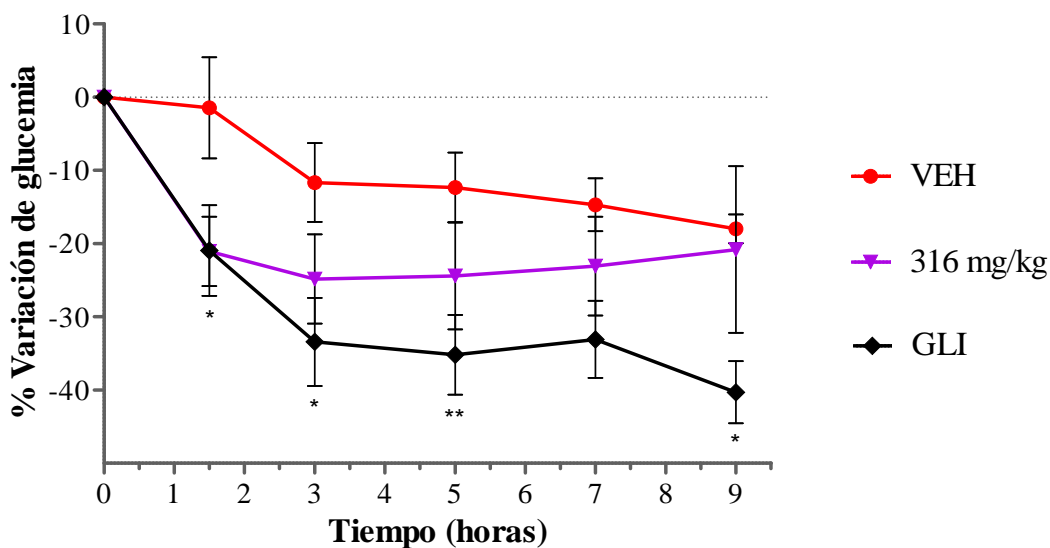


Figura 21. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **Dosis 316 mg/kg** ($n=5$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=10$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Por su parte, el extracto acuoso en animales sanos presentó un efecto hipoglucemiante a todas las dosis ensayadas (100-316 mg/kg) durante las tres primeras horas de evaluación (**Figura 22**). El mismo extracto mostró un efecto hipoglucemiante a las 3 horas (177 mg/kg $p < 0.05$) y a las 9 horas (316 mg/kg $p < 0.05$) en animales diabéticos (**Figura 23**).

Los efectos hipoglucemiantes observados para ambos extractos podrían deberse a que los flavonoides presentes en ellos [como la rutina (**6**) mayoritaria en ambos] actúan de forma sinérgica sobre los mecanismos de transporte de glucosa y/o en la promoción de la liberación de insulina. No obstante, el mecanismo de acción preciso debe establecerse *in vitro* con los modelos farmacológicos pertinentes (Fröde y Medeiros, 2008; Manzano y Williamson, 2010).

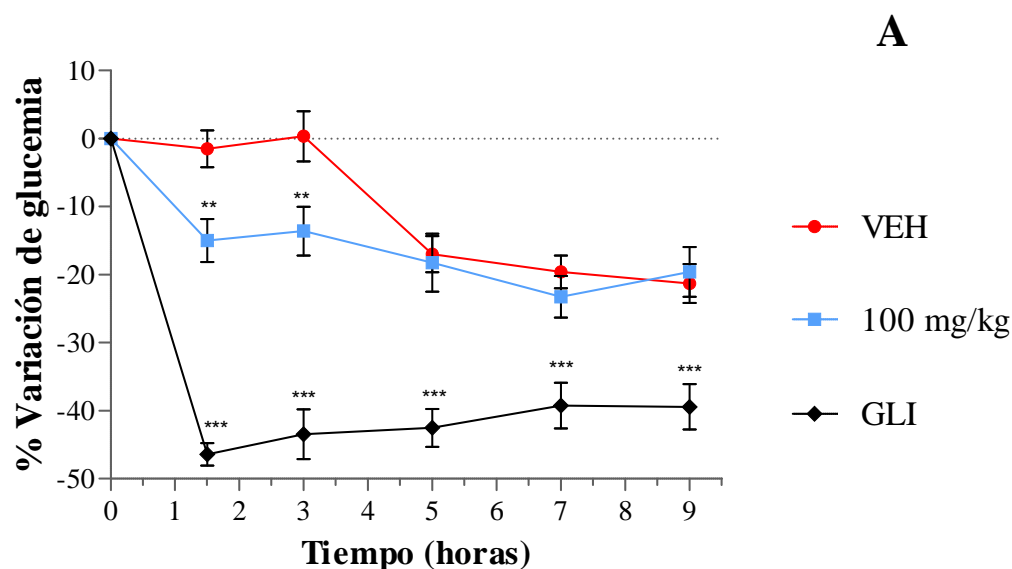


Figura 22. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales sanos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=8$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=16$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. *** $p < 0.001$.

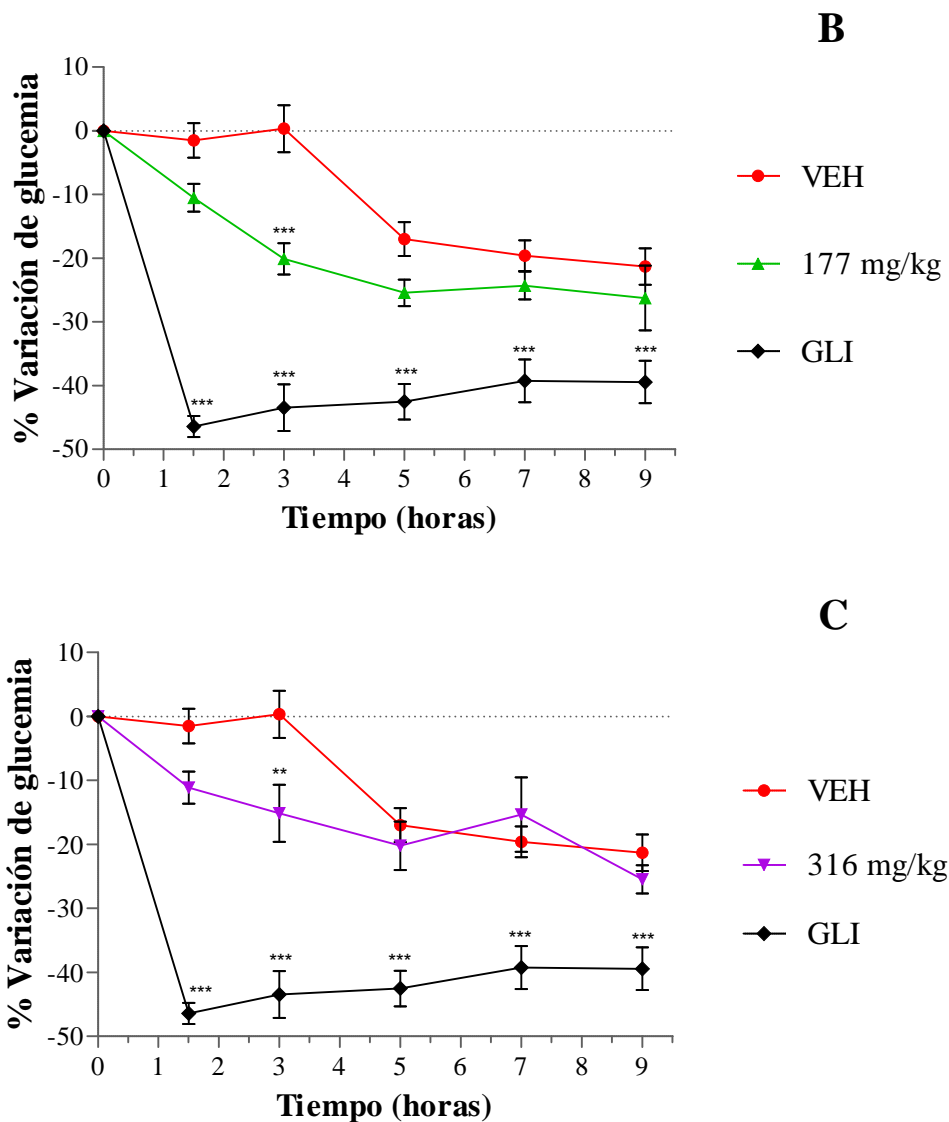


Figura 22. Continuación. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales sanos. **B. Dosis 177 mg/kg** ($n=8$). **C. Dosis 316 mg/kg** ($n=8$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=16$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

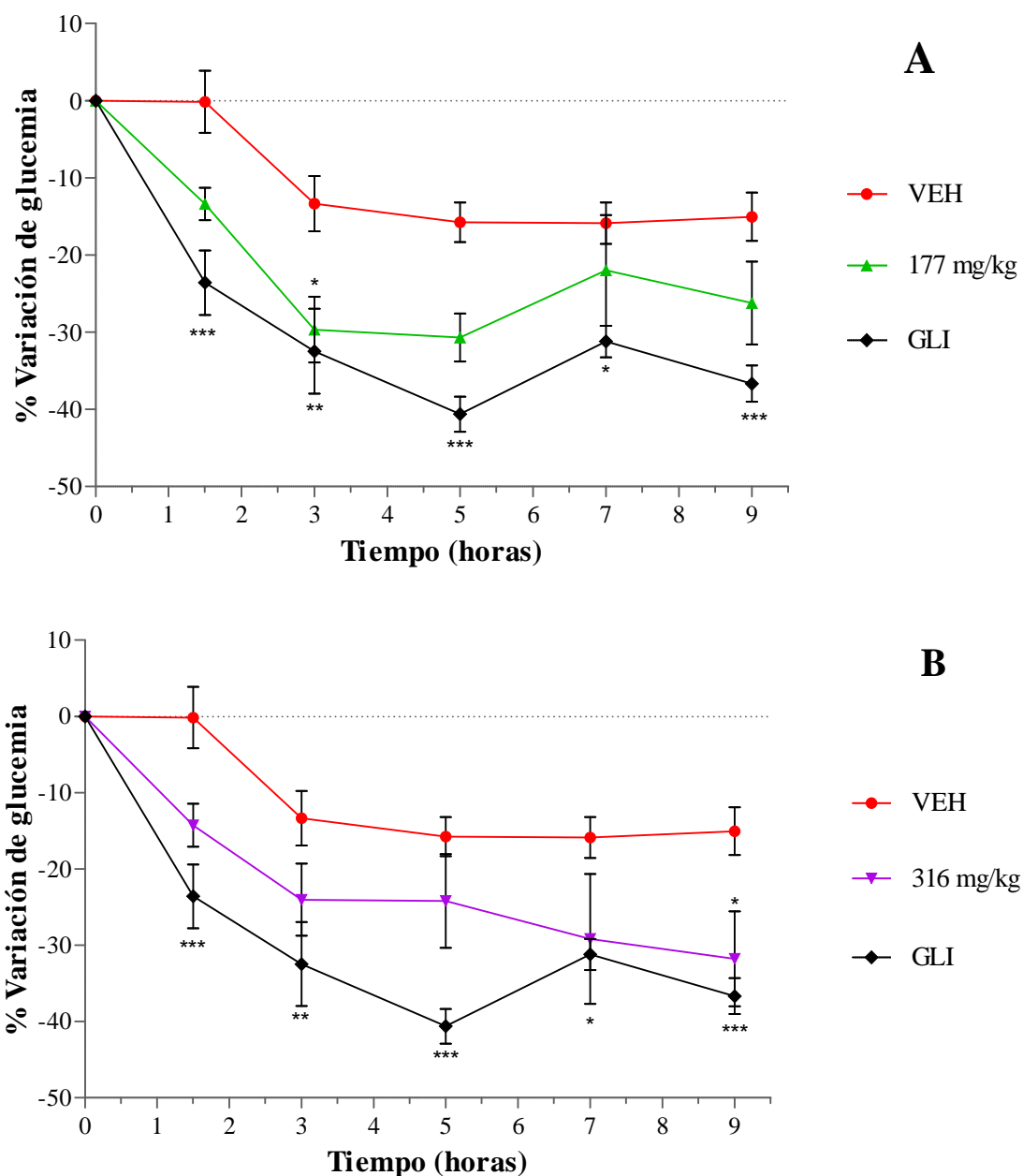


Figura 23. Efecto hipoglucemiante agudo del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **A. Dosis 177 mg/kg** ($n=6$). **B. Dosis 316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=18$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

4.3.4.2 Efecto sobre la tolerancia a la glucosa

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen hiperglucemia persistente y los niveles de glucosa en sangre se ven incrementados aún más luego del consumo de alimentos. Por ello, las estrategias farmacológicas en el tratamiento están encaminadas a la reducción de tales niveles, ya sea afectando el transporte y/o reabsorción de glucosa a nivel tisular o promoviendo la liberación de insulina (Emilien *et al.*, 1999).

Para evaluar el efecto antihiper glucémico del extracto orgánico de *C. filaginoides* se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en animales sanos y en animales diabéticos como se describió en el inciso 3.5.4.4 de la sección experimental. Las **Figuras 24 y 25** muestran las gráficas generales de resultados para los animales nomoglucémicos y diabéticos, respectivamente. En las **Figuras 26 y 27** se muestran los resultados para los niveles de dosis donde hubo diferencias estadísticas significativas, en animales sanos y diabéticos, respectivamente.

La administración de la carga de glucosa a los animales de experimentación emula la condición hiper glucémica que se presenta tras la ingesta de alimentos. Este aumento en los valores de gluquemia (pico posprandial) se ve mermado por hipoglucemiantes orales convencionales, como la glibenclamida empleada en el modelo.

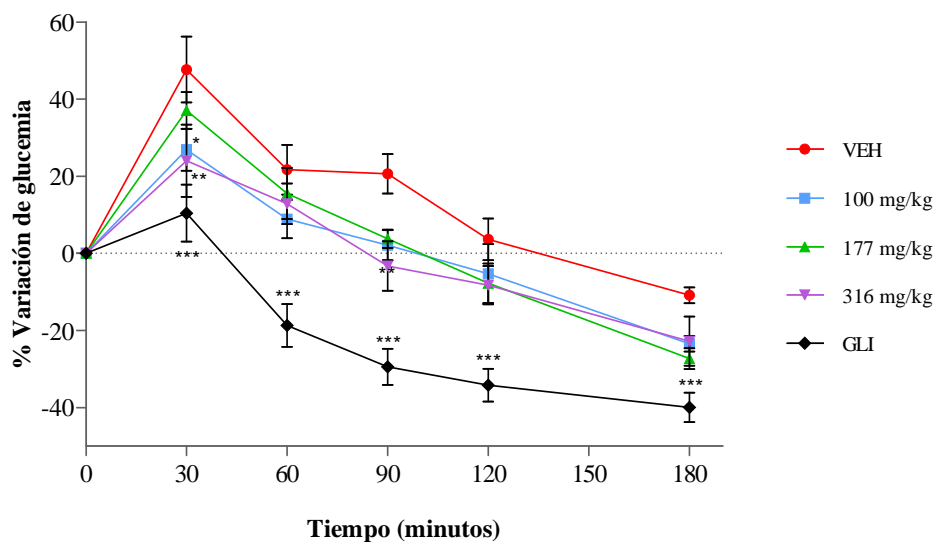


Figura 24. Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales normales. **Dosis 100 mg/kg** ($n=8$), **177 mg/kg** ($n=7$), **316 mg/kg** ($n=8$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=7$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=7$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

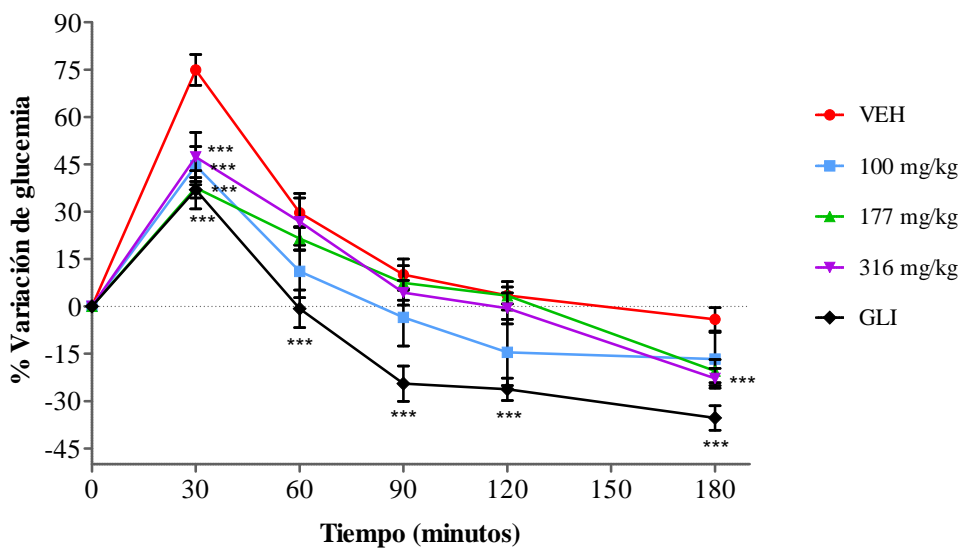


Figura 25. Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **Dosis 100 mg/kg** ($n=5$), **177 mg/kg** ($n=7$), **316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=8$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=8$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. *** $p < 0.001$.

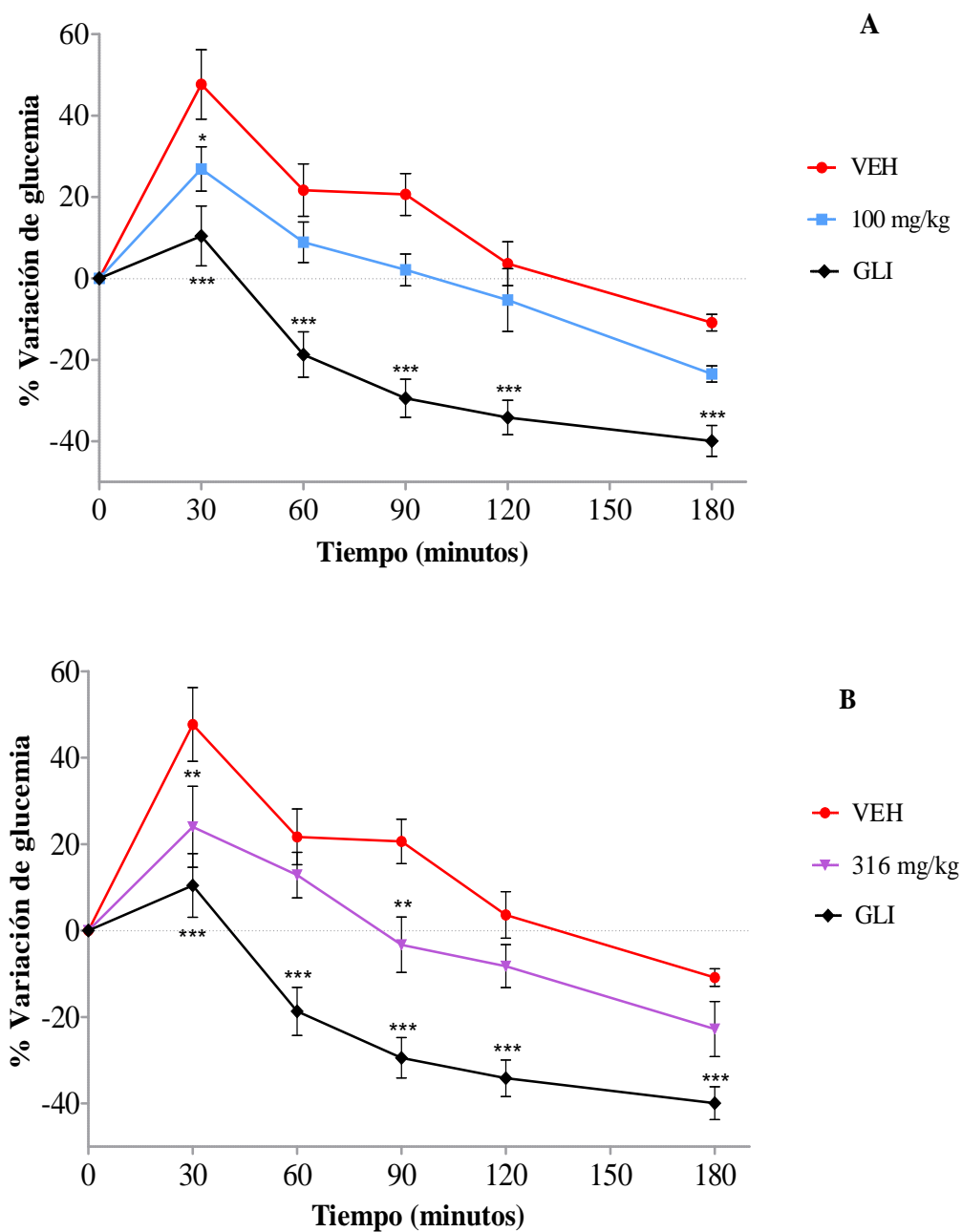


Figura 26. Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales sanos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=7$) y **B. Dosis 316 mg/kg** ($n=7$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=7$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=8$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

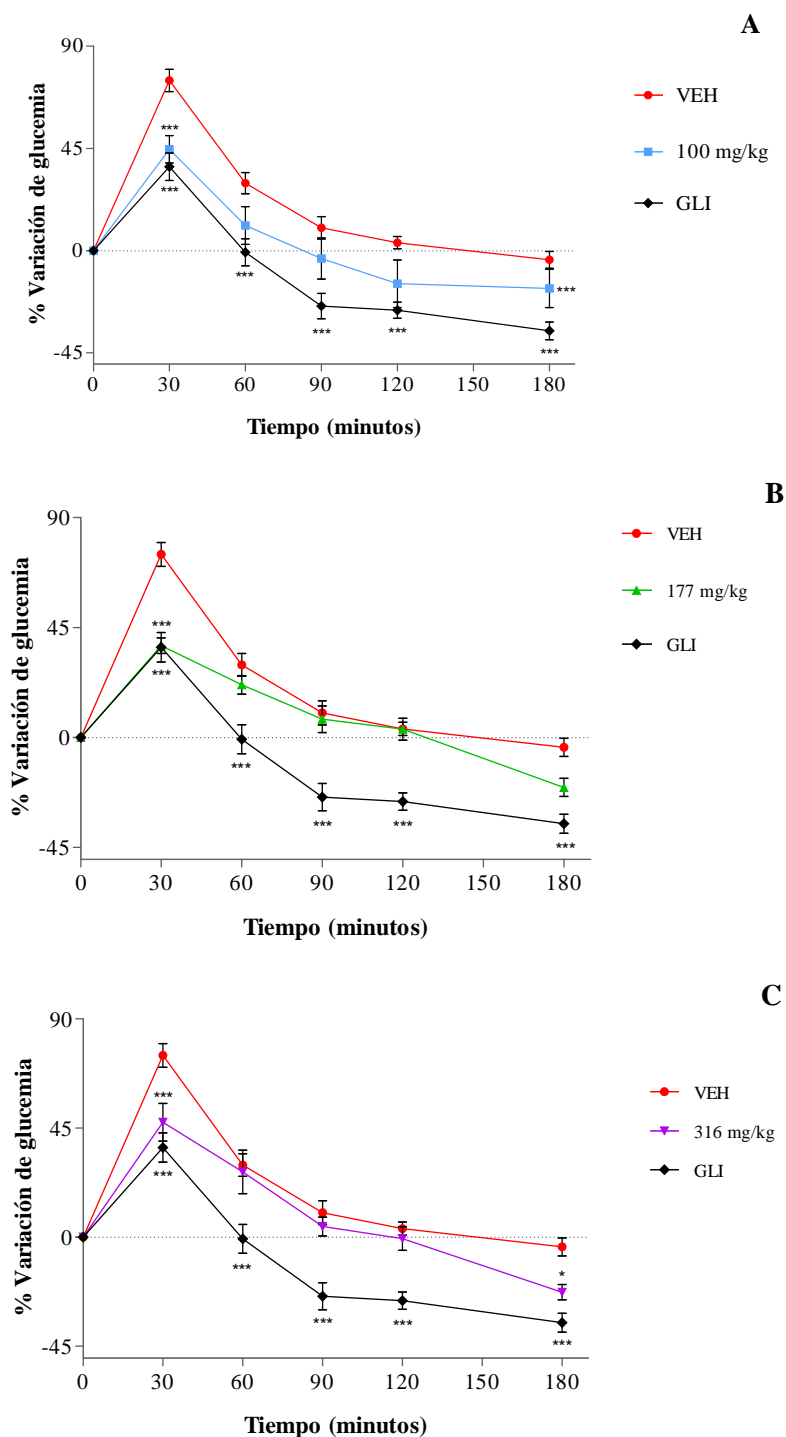


Figura 27. Prueba de tolerancia a la glucosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=6$), **B. 177 mg/kg** ($n=6$) y **C. 316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=8$), GLI: glibenclamida 10 mg/kg ($n=8$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

De los resultados obtenidos puede observarse que a los 30 minutos se dio inhibición en el aumento del pico posprandial en ratones sanos a las dosis de 100 mg/kg (26.9% $p < 0.05$) y 316 mg/kg (24.0% $p < 0.01$). En ese mismo tiempo, a la dosis de 177 mg/kg no se presentó diferencia significativa respecto al control blanco (37.05% $p > 0.05$). Estos resultados parecen apuntar que el extracto afecta a ratones normales de modo independiente de la dosis.

Por otra parte, los experimentos realizados en ratones diabéticos mostraron efectos antihiper glucémicos significativos como los causados por la glibenclamida ($p < 0.001$) en todas las dosis ensayadas a los 30 minutos, observándose la mayor inhibición en el incremento de glucosa posprandial a la dosis de 177 mg/kg (37.58% $p < 0.001$) y sin que el efecto fuera dependiente de la dosis.

El efecto antihiper glucémico observado para el extracto orgánico podría deberse al bloqueo de alguno de los dos transportadores intestinales principales: el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT, por sus siglas en inglés) o el transportador GLUT2 (Manzano y Williamson, 2010).

La actividad antihiper glucémica pudiera ser atribuida a la presencia de isoquercitrina (**8**) (reportada con anterioridad para *C. filaginoides*) como producto de hidrólisis de la rutina (**6**). La enzima que escinde el enlace α -glicosídico presente en la rutina, la α -L-ramnosidasa, fue aislada de *Bacteroides* JY6, componente de la microflora intestinal humana (Jang y Kim, 1996; Yadav *et al.* 2010). Se ha documentado que la isoquercitrina (**8**) posee actividad inhibitoria sobre el transportador SGLT-1, posiblemente de tipo competitivo, disminuyendo la reabsorción de glucosa en la nefrona y por ende, la glucemia. En este orden de ideas, la isoquercitrina (**8**), producto de hidrólisis de *Bacteroides* JY6 antes descrita, contribuiría al efecto antihiper glucémico observado (Ader *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2007; Paulo *et al.*, 2008).

Además, *Bacteroides* JY6 produce β -glucosidasas y β -galactosidasas que hacen suponer que a nivel intestinal podrían generar la aglicona quercetina (**12**) a partir de la rutina. La quercetina inhibe la recaptación de glucosa mediante GLUT2 de forma no

competitiva *in vitro* e *in vivo*, disminuyendo así las concentraciones de glucosa en sangre (Kwon *et al.*, 2007; Manzano y Williamson, 2010; Skopec *et al.*, 2010).

Sin embargo, es importante mencionar que los efectos antihiper glucémicos de los extractos de *C. filaginoides* deben demostrarse en modelos adecuados *in vitro*, para analizar efectos individuales y sinérgicos.

4.3.4.3 Efecto sobre la tolerancia a la sacarosa

Los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* fueron evaluados en un modelo de tolerancia a la sacarosa empleando animales sanos y diabéticos. El pico posprandial fue generado por la administración de una solución de sacarosa, como se describió en la parte experimental.

En primera instancia, se muestran los resultados generales obtenidos para el extracto orgánico en las **Figuras 28 (animales sanos)** y **29 (animales diabéticos)**. Las **Figuras 30** y **31** corresponden a las dosis de extracto orgánico donde hubo diferencias estadísticas significativas en animales sanos y diabéticos, respectivamente. Los resultados generales para el extracto acuoso se presentan en las **Figuras 32 (animales sanos)** y **33 (animales diabéticos)** y en las **Figuras 34** y **35** se muestran las dosis de extracto acuoso donde hubo diferencias significativas en animales sanos y diabéticos, respectivamente.

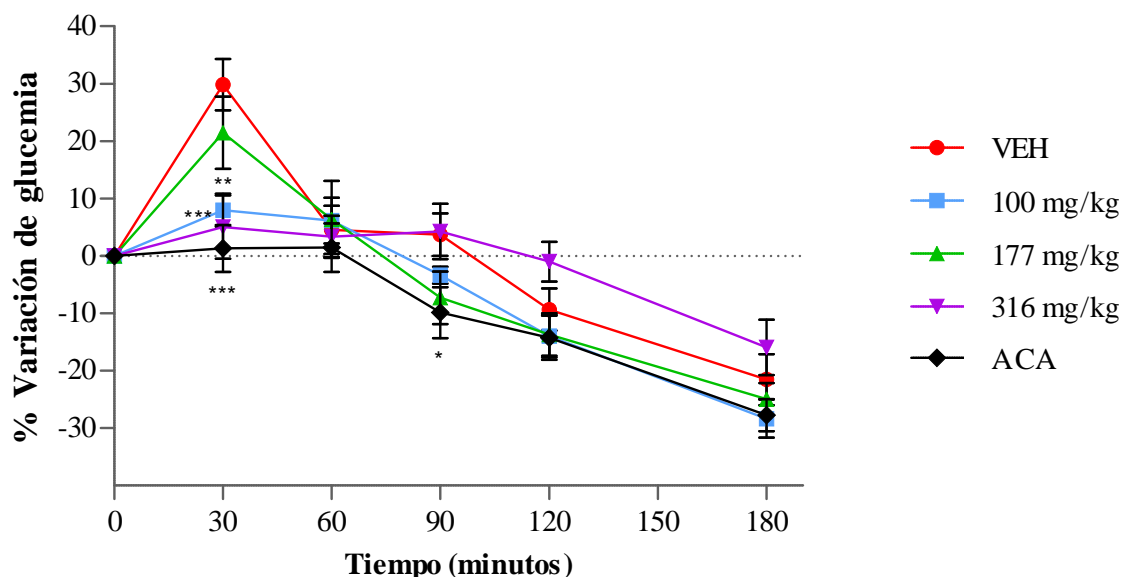


Figura 28. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales sanos. **Dosis 100 mg/kg** ($n=7$), **177 mg/kg** ($n=6$), **316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=16$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=16$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

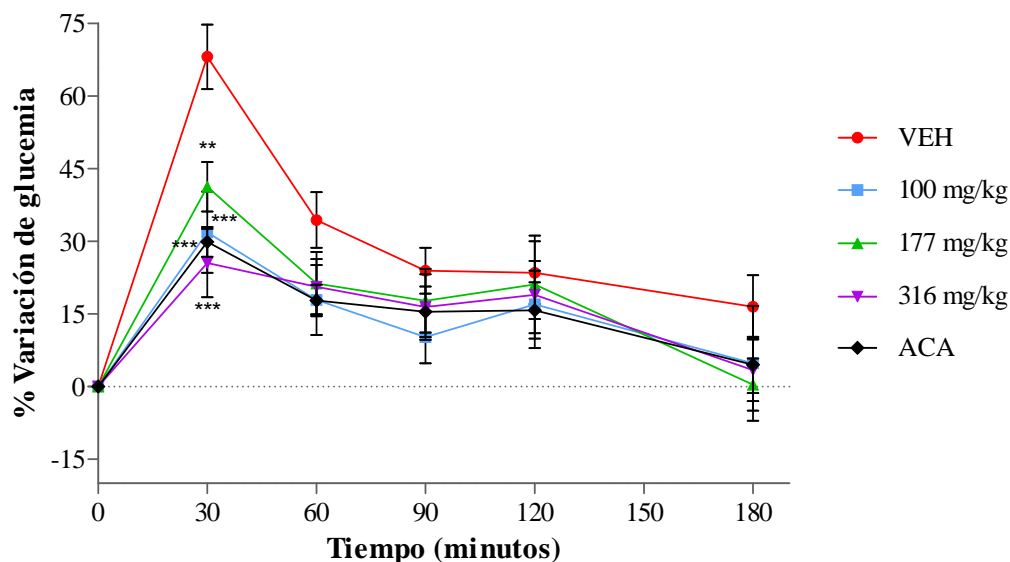


Figura 29. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **Dosis 100 mg/kg** ($n=5$), **177 mg/kg** ($n=6$), **316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=13$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=12$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

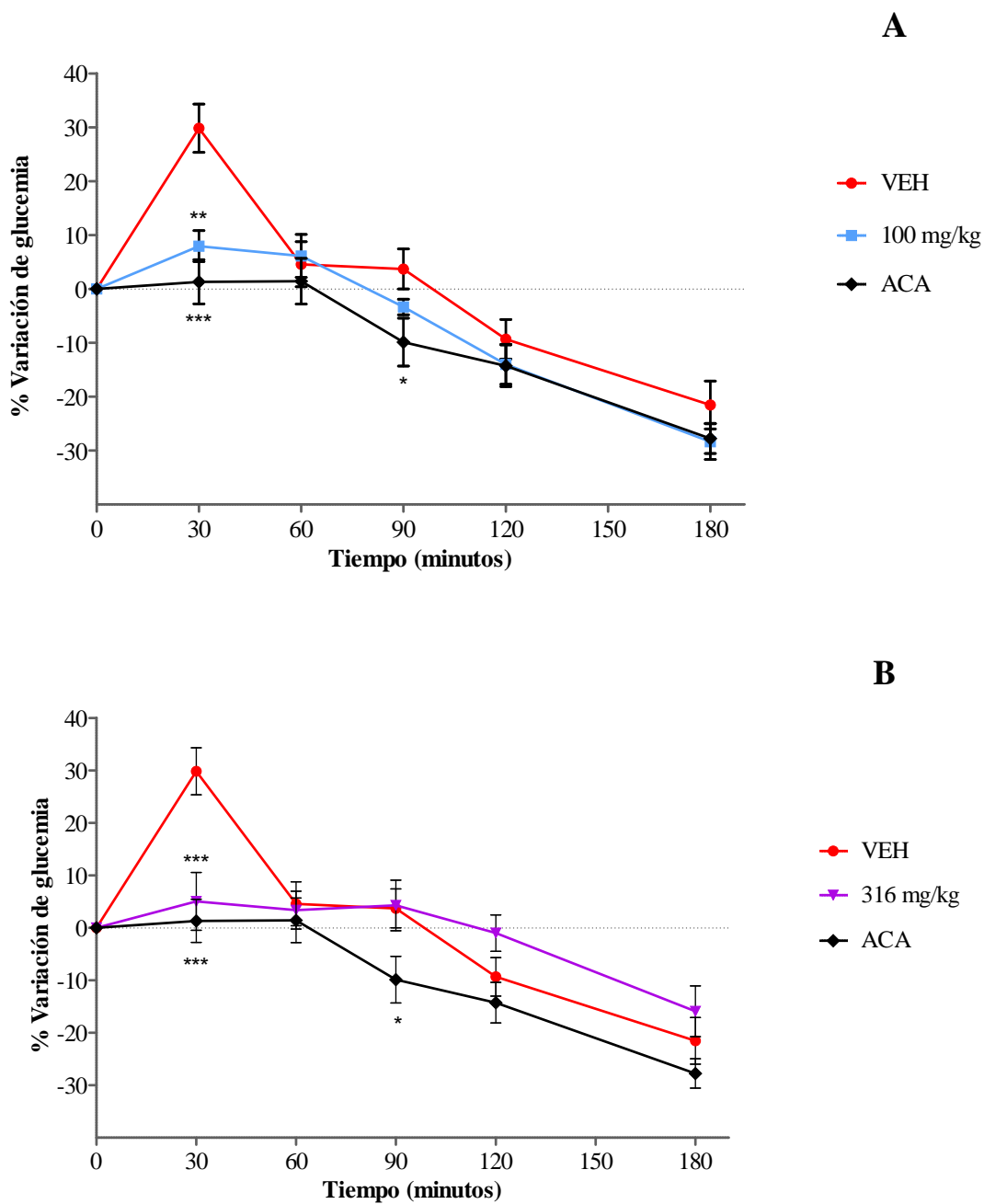


Figura 30. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales sanos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=7$) y **B. Dosis 316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=16$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=16$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

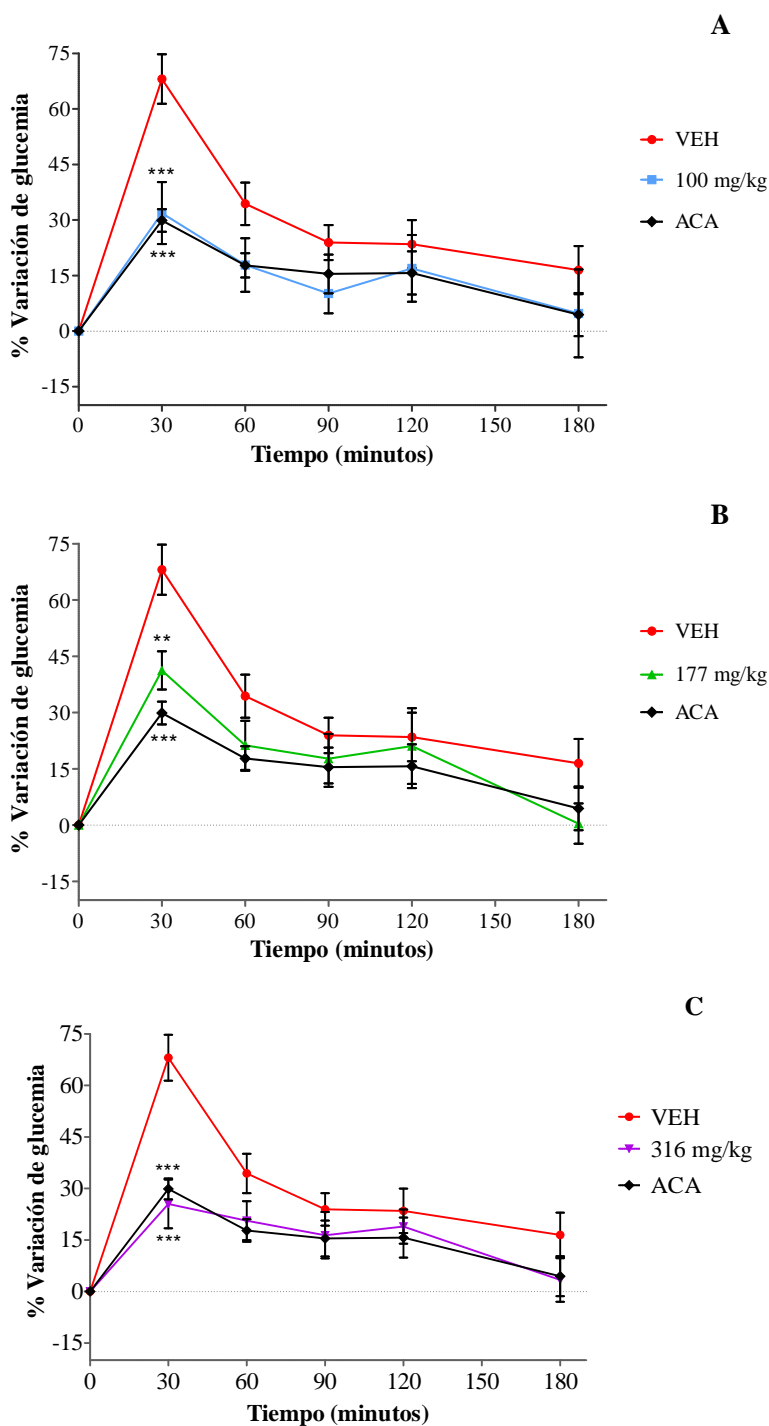


Figura 31. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto orgánico de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=5$), **B. Dosis 177 mg/kg** ($n=6$) y **C. Dosis 316 mg/kg** ($n=6$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=13$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=12$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

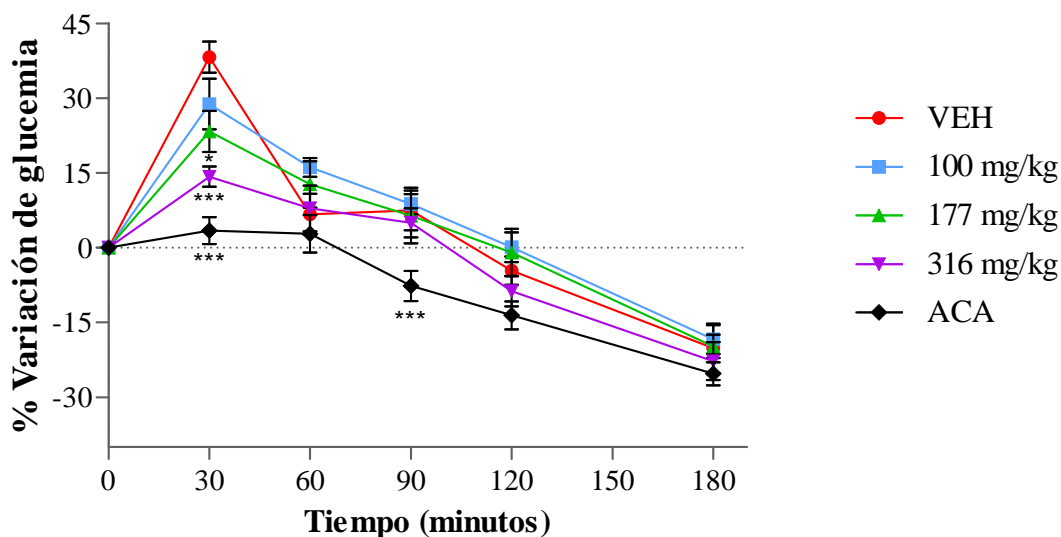


Figura 32. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales sanos. **Dosis 100 mg/kg** ($n=6$), **177 mg/kg** ($n=6$) y **316 mg/kg** ($n=7$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=15$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=18$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

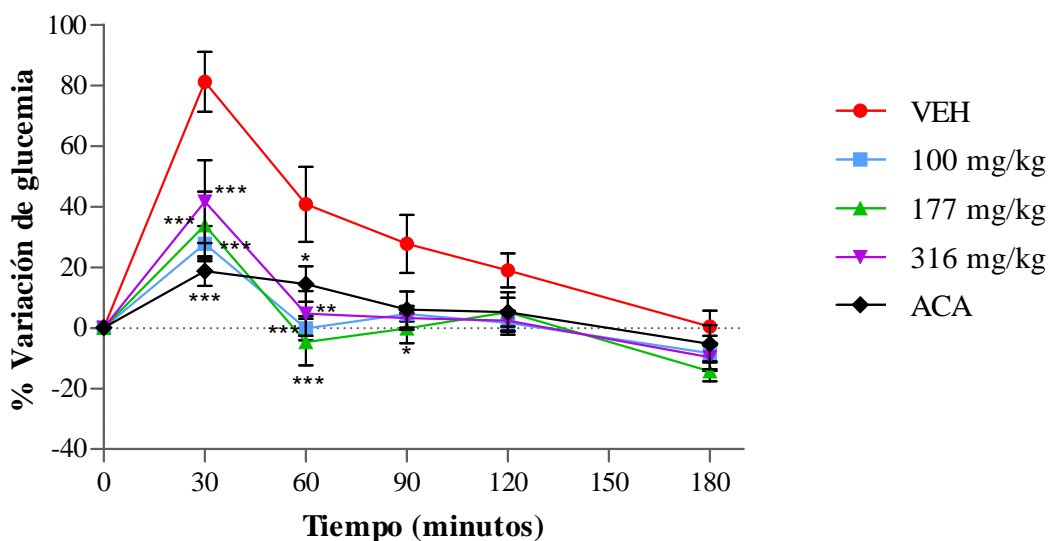


Figura 33. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **Dosis 100 mg/kg** ($n=6$), **177 mg/kg** ($n=8$) y **316 mg/kg** ($n=8$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=7$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=14$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$.

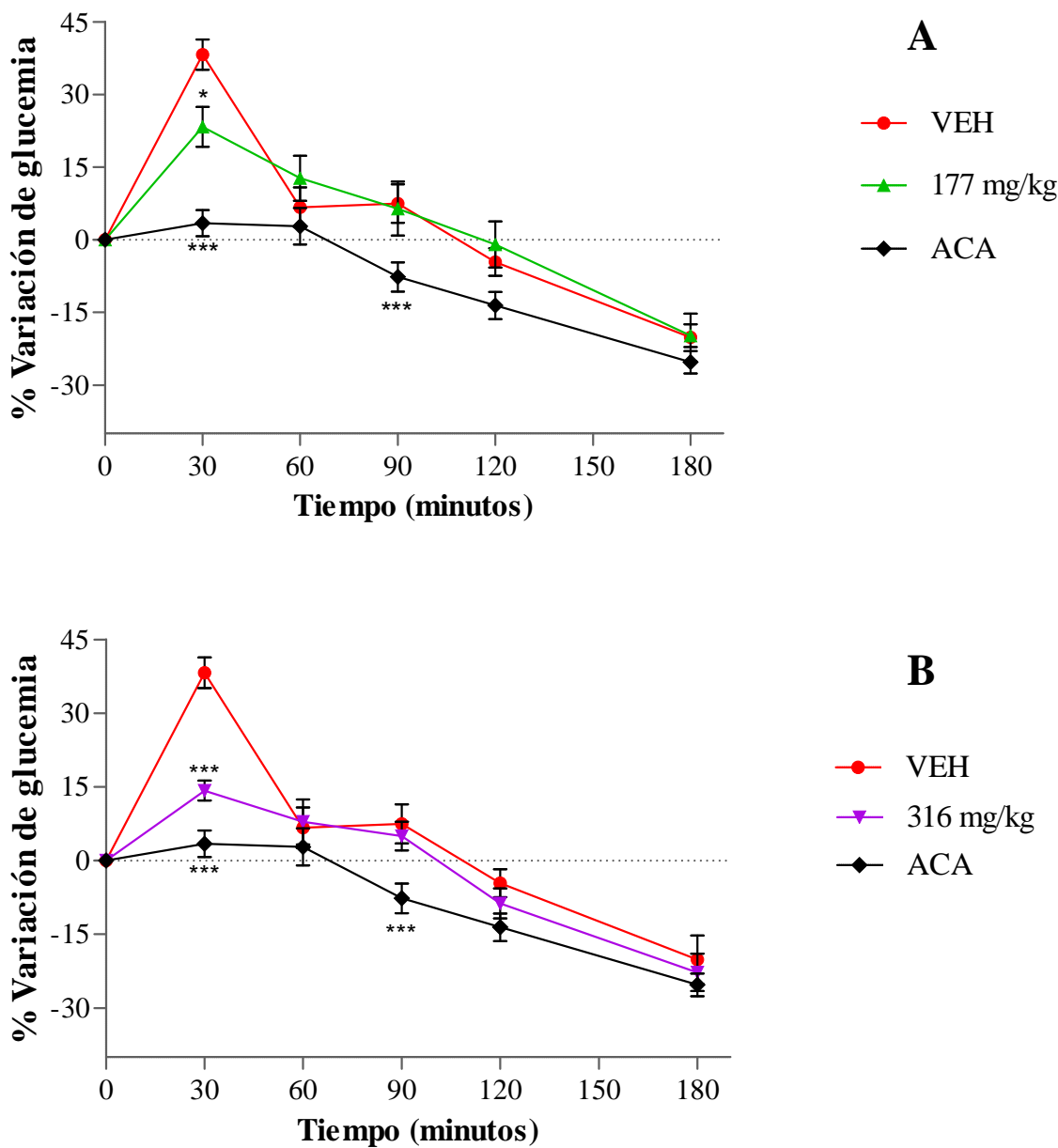


Figura 34. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales sanos. **A. Dosis 177 mg/kg** ($n=6$), **B. Dosis 316 mg/kg** ($n=7$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=15$), ACA: acarbosa 3 mg/kg ($n=18$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

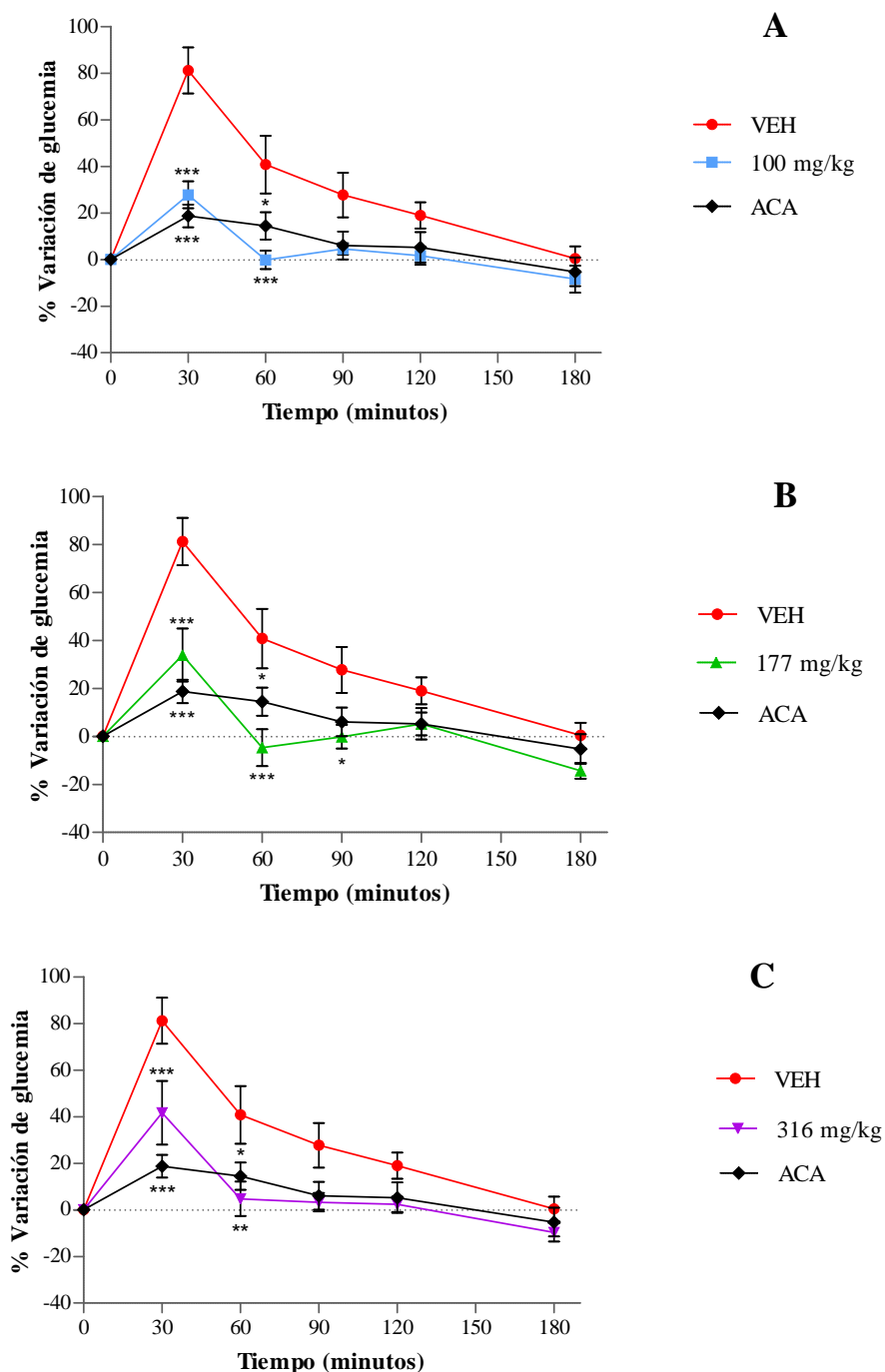


Figura 35. Prueba de tolerancia a la sacarosa del extracto acuoso de *C. filaginoides* en animales diabéticos. **A. Dosis 100 mg/kg** ($n=6$), **B. Dosis 177 mg/kg** ($n=8$), **C. Dosis 316 mg/kg** ($n=8$). VEH: solución salina isotónica (NaCl 0.9%) ($n=7$), ACA: acarbosea 3 mg/kg ($n=14$). Cada punto representa el promedio \pm EEM para los animales de cada grupo. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$.

Los resultados obtenidos para los extractos orgánico y acuoso, tanto en animales sanos como en diabéticos, muestran inhibición en el incremento del pico posprandial a los treinta minutos a los diferentes niveles de dosis ensayadas. Así, en animales normoglucémicos, las dosis de extracto orgánico de 100 mg/kg (7.95% $p<0.01$) y 316 mg/kg (5.03%, $p<0.001$) muestran un efecto antihiperoglucémico comparable con el de la dosis de acarbosa ensayada (3 mg/kg). Por su parte, la evaluación del extracto acuoso en animales sanos también muestra tal efecto a las dosis de 177 mg/kg (23.32% $p<0.05$) y 316 mg/kg (14.22% $p<0.001$).

Por otro lado, los experimentos realizados en animales diabéticos presentan efectos antihiperoglucémicos a todas las dosis ensayadas para ambos extractos. Para el extracto orgánico, las dosis de 100 mg/kg (31.85% $p<0.001$) y 316 mg/kg (25.5% $p<0.001$) inhiben el incremento del pico posprandial, ésta última con un efecto mayor que el observado para la acarbosa (29.87% $p<0.001$). La evaluación del extracto acuoso mostró un fenómeno de hormesis: el mayor efecto antihiperoglucémico corresponde a la dosis de 100 mg/kg (27.76% $p<0.001$), seguido de la dosis de 177 mg/kg (33.86% $p<0.001$) y finalmente, la dosis de 316 mg/kg (41.64% $p<0.001$).

Se podría establecer que el mecanismo de acción antihiperoglucémico de los extractos radica en la rutina (**6**) detectada como compuesto mayoritario para ambos extractos y en sus productos de hidrólisis a nivel intestinal isoquercitrina (**8**) y quercetina (**12**). Tal aseveración concuerda con los resultados descritos en la literatura para estos flavonoides.

Kamalakkannan y Mainzen (2006) reportaron que la administración oral crónica de rutina (**6**) a ratas normoglucémicas y diabéticas a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, disminuyó significativamente ($p<0.05$) los niveles de glucosa en plasma en los animales diabéticos, no así en los normales. Además, el tratamiento con rutina (**6**) incrementó la insulina plasmática, el péptido C, las proteínas totales, la hemoglobina total y disminuyó la hemoglobina glicosilada, parámetros que sirven como indicadores del control de glucemia.

La literatura especializada refiere tres mecanismos de acción por los cuales la rutina (**6**) y su aglicona quercetina (**12**) ejercen sus efectos antihiper glucémicos. El primero de ellos reside en su actividad antioxidante, la cual reduce significativamente los daños ocasionados por la peroxidación de ácidos grasos y proteínas en los pacientes diabéticos y contribuye a la preservación de las células β -pancreáticas viables para incrementar la producción de insulina. Estos factores contribuyen en conjunto a la disminución de la glucemia (Murota y Terao., 2003; Paulo *et al.*, 2008; Rauter *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010, Bansal *et al.*, 2011). El segundo mecanismo postulado es la inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) en extractos orgánicos ricos en flavonoides, entre ellos la rutina (**6**) y la quercetina (**12**); tal inhibición reduce los niveles de glucemia e incrementa la secreción de insulina (Bansal *et al.*, 2011).

Ahora bien, el tercer mecanismo postulado es la inhibición de la enzima α -glucosidasa, responsable de la hidrólisis de carbohidratos a monosacáridos a nivel intestinal; el retraso en la reabsorción ocasionado por los fármacos inhibidores de esta enzima constituye uno de los blancos terapéuticos más prometedores en la búsqueda de agentes antihiper glucémicos (Emilien *et al.*, 1999).

La inhibición *in vitro* de la α -glucosidasa por rutina (**6**), isoquercitrina (**8**) y quercetina (**12**), fue investigada por Qin Li y colaboradores (2009), mediante ensayos colorimétricos y cinéticas enzimáticas. En el trabajo se describe que estos flavonoides pueden unirse con la α -glucosidasa para formar un complejo mediante interacciones hidrofóbicas; dicho complejo apaga la fluorescencia en el ensayo colorimétrico y puede ser medido espectroscópicamente. Las constantes de unión fueron inversamente proporcionales a la polaridad del flavonoides, es decir, la quercetina presentó el valor mayor. Además, se determinó que las variaciones en los glicósidos unidos al núcleo de la quercetina, no impactan de manera importante la capacidad de unión del flavonoide con la enzima, con lo que se da pauta a la búsqueda de estructuras similares que puedan presentar efectos inhibitorios sobre la α -glucosidasa.

Adicionalmente, existen múltiples reportes de extractos orgánicos ricos en flavonoides que inhiben a la α -glucosidasa (Zhang *et al.*, 2010; Rauter *et al.*, 2010; Adisakwattana *et al.*, 2010; Kasabri *et al.*, 2011; Ö.D. Can *et al.* 2011), lo cual sustenta el estudio de los extractos considerando los efectos sinérgicos de todos sus componentes en la actividad antidiabética.

Entonces, parece razonable sugerir que el mecanismo de acción de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* sobre los niveles de glucemia obedece a una combinación de los mecanismos de acción antes señalados, con lo que se justifica por primera vez de forma preclínica, los usos tradicionales de la infusión de simonillo para el tratamiento de la diabetes. No obstante, es necesario diseñar los protocolos que comprueben tal eficacia *in vivo* e *in vitro*.

V. CONCLUSIONES

Los estudios aquí presentados son los primeros de su tipo para *Conyza filaginoides* y constituyen un aporte fundamental en el establecimiento de los parámetros de calidad, seguridad y eficacia a nivel preclínico de esta especie de amplio uso en las prácticas médicas tradicionales en el país.

Así, el análisis del aceite esencial por CG-EM permitió identificar como constituyentes mayoritarios del aceite esencial al alcohol (*Z*)-3-hexen-1-ol y a los terpenoides *trans*-pinocarveol, *cis*-sabinol, óxido de cariofileno, pulegona, isoeugenol y *o*-cimeno. De manera adicional, el análisis de los componentes volátiles por HS-MEFS-CG permitió establecer que los principales compuestos presentes son los monoterpenos *p*-cimeno, α -felandreno, *m*-cimeno, limoneno, β -felandreno, β -pineno y γ -terpineno. Por otra parte, se obtuvieron las huellas digitales de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* mediante CLAE, encontrando como compuesto marcador de ambos extractos al flavonol glicosídico rutina. Los perfiles cromatográficos obtenidos por CG-EM del aceite esencial y de los compuestos volátiles, así como los generados por CLAE serán de utilidad en el establecimiento de la identidad química de la especie; adicionalmente podrán emplearse en el aseguramiento de calidad de la droga cruda de *C. filaginoides* y de los preparados a base de ella.

Se desarrolló y validó un método analítico por CLAE para cuantificar el contenido de rutina en el extracto orgánico de *C. filaginoides* que fue selectivo, lineal, exacto y preciso en el rango de concentraciones evaluadas. Este método servirá como base para el establecimiento de pruebas de composición, aportando un parámetro adicional que garantice la calidad de la droga cruda de simonillo y sus derivados fitoterapéuticos al sentar las bases para la elaboración de productos estandarizados.

En relación a la seguridad preclínica, se realizaron los estudios de toxicidad aguda en ratones de los extractos orgánico y acuoso de *C. filaginoides* mismos que indicaron que

la DL_{50} de ambos preparados es mayor a 5000 mg/kg. Este dato, aunado a sus antecedentes etnobotánicos, da cuenta de la posible inocuidad de la especie en humanos.

Las evaluaciones farmacológicas realizadas sobre los extractos orgánico y acuoso del simonillo condujeron a la validación científica de algunos de sus usos tradicionales, como en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales que cursan con dolor. De esta manera, se determinó el potencial antinociceptivo del extracto orgánico en ratones (31.6-316 mg/kg) empleando el modelo de placa caliente; el efecto antinociceptivo del preparado fue significativo y dependiente de la dosis. Asimismo, la infusión de la planta presentó una actividad antiespasmódica en un modelo de motilidad intestinal (Palacios-Espinosa *et al.*, 2008) a la dosis de 316 mg/kg. Este efecto puede estar relacionado con el empleo de la planta para los cólicos biliares. Muy posiblemente los flavonoides de la planta con propiedades antiespasmódicas comprobadas son los agentes biodinámicos responsables de la respuesta farmacológica detectada (Mata *et al.*, 1997).

Las investigaciones preclínicas conducentes al establecimiento del potencial antidiabético de *C. filaginoides* obedecieron a antecedentes etnobotánicos recientes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005), que refieren el empleo de las infusiones de simonillo para el tratamiento de la diabetes. Los extractos orgánico y acuoso presentaron un efecto hipoglucemiante significativo en animales sanos y en diabéticos (100-316 mg/kg) durante las tres primeras horas de evaluación. Además, la evaluación del efecto antihiper glucémico de los extractos de *C. filaginoides* en animales normoglucémicos y diabéticos presentó muy buenos resultados, ya que el de naturaleza orgánica a diferentes dosis (100-316 mg/kg) disminuyó el pico posprandial en los ensayos de tolerancia a la sacarosa y glucosa. De la misma manera, la infusión (100-316 mg/kg) provocó un decrecimiento de la glucosa posprandial después de la administración oral de una carga de sacarosa. Tales efectos sugieren que los extractos provocan su acción mediante mecanismos que involucren la reabsorción y/o transporte de glucosa a nivel intestinal, la liberación de insulina de las células β -pancreáticas e incluso la inhibición de las α -glucosidasas intestinales. La presencia de rutina en la planta sustenta la anterior conclusión, ya que se ha comprobado que este compuesto y sus productos de hidrólisis (quercetina e isoquercitrina) ejercen su

acción sobre alguno de los blancos de acción antes mencionado (Ader *et al.*, 2001; Paulo *et al.*, 2008; Manzano y Williamson, 2010; Skopec *et al.*, 2010). Entonces la composición química de la planta permitiría generar un preparado antidiabético con distintos blancos de acción, con el consiguiente efecto sinérgico.

La diversidad de efectos demostrada por los extractos y sus componentes hacen de *Conyza filaginoides* un candidato idóneo para el desarrollo de agentes fitoterapéuticos seguros y eficaces.

Por último, las pruebas de identidad, composición y eficacia preclínica realizadas en el presente trabajo de investigación, generaron una parte importante de la información necesaria para contribuir a la generación de las monografías tipo OMS y farmacopeica de *Conyza filaginoides*. La existencia de este tipo de documentos permitirá el uso racional de esta especie tan arraigada en las prácticas médicas populares de México.

VI. PERSPECTIVAS

1. Realizar la descripción microscópica de *C. filaginoides* mediante la obtención de cortes histológicos de las distintas partes de la planta, a fin de establecer una de las pruebas de identidad botánica necesarias para la elaboración de la monografía tipo OMS de esta especie.
2. Aplicar el método analítico desarrollado para determinar el contenido de rutina (6) en algunos preparados fitoterapéuticos elaborados con *C. filaginoides*, desarrollando las metodologías pertinentes para la preparación de la muestra a analizar.
3. Establecer mediante modelos farmacológicos adecuados, los mecanismos de acción *in vitro* de los extractos y/o fracciones de *C. filaginoides* que expliquen sus actividades analgésicas, antiespasmódicas y antihiper glucémicas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Ader P., Blöck M., Pietzsch S. y Wolfram S. (2001). Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters*. **162**: 175-180.
- Adisakwattana S., Jiphimai S., Prutanopajai P., Chanathong B., Sapwarboli S. y Ariyapitipan T. (2010). Evaluation of α -glucosidase, α -amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **61**(3): 295–305.
- Ahmed A. (1990). A diterpene xyloside from *Conyza steudellii*. *Phytochemistry*. **30**(2): 611-612.
- Ahmed M. y Ahmed A. (1990). Terpenoids from *Conyza stricta*. *Phytochemistry*. **29**(8): 2715-2716.
- Alaerts G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J. y Heyden Y. V. (2010). Recent Developments in Chromatographic Fingerprints from Herbal Products: Set-Up and Data Analysis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **13**: 900-922.
- Alarcón-Aguilar F. J., Román-Ramos R., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R., González-Paredes B. y Flores-Saenz J. L. (1997). Effects of three Mexican medicinal plants (*Asteraceae*) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*. **55**: 171-177.
- Alarcón-Aguilar F. J., Román-Ramos R., Pérez-Gutiérrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C.C. y Flores-Saenz J.L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. **61**: 101–110.
- Alarcón-Aguilar F. J., Román-Ramos R., Flores-Saenz J. L. y Aguirre-García F. (2002). Investigation on the Hypoglycaemic Effects of Extracts of Four Mexican Medicinal Plants in Normal and Alloxan-diabetic Mice. *Phytotherapy Research*. **16**: 383–386.
- Altamirano F. (1904). *Materia Médica Mexicana: A Manual of Mexican Medicinal Herbs*. Sociedad Farmacéutica de México. México. p.67.
- American Botanical Council, 2011. Página web. <http://abc.herbalgram.org/site/PageServer?pagename=Monographs> (Acceso en Junio 2011).
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo I. Instituto Médico Nacional. 1894. p. 121-126, 295-312.
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo II. Instituto Médico Nacional. 1895. p. 284.
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo IV. Instituto Médico Nacional. 1904. p.144-148.

- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo V. Instituto Médico Nacional. 1907. p.157-164, 209, 210, 222, 242-245, 285, 286.
- Anales del Instituto Médico Nacional. Tomo VI. Instituto Médico Nacional, 1908. p. 97, 98, 124, 154.
- Asongalem E. A., Foyet H.S., Ngogang J., Folefoc G.N., Dimob T., Kamtchouing P. (2004). Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. *Journal of Ethnopharmacology*. **91**: 301–308.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. Página web. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7497>. (Acceso en Marzo 2010).
- Atta A. H. y Mouneir S. M. (2004). Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **92**: 303–309.
- Atta A. H y EL-Sooud K. A. (2004). The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **95**: 235–238.
- Awaad A. S., El-meligy R. M., Qenawy S. A., Atta A. H. y Soliman G. A. (2011). Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of some desert plants. *Journal of Saudi Chemical Society*. Artículo en prensa.
- Bansal P., Paula P., Mudgala J., Nayaka P. G., Pannakal S. T., Priyadarsini K. I. y Unnikrishnan, M.K. (2011). Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. Artículo en prensa.
- Barbosa L. C., Paula V., Azevedo A. S., Silva E. A. y Nascimento E. A. (2005). Essential oil composition from some plant parts of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. *Flavour and Fragrance Journal*. **20**: 39–41.
- Bicchi C., Drigo S. y Rubiolo P. (2000). Influence of fiber coating in headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*. **892**: 469–485.
- Bohlmann F. y Jakupovic J. (1979). 8-oxo-a-selinen und neue scopoletin derivate aus *Conyza*-Arten. *Phytochemistry*. **18**: 1367-1370.
- Bohlmann F. y Wegner P. (1982). Three diterpenes from *Conyza podocephala*. *Phytochemistry*. **21**(7): 1693-1695.
- British Herbal Medicine Association, 2011. Página web. <http://www.bhma.info/publications/publication3.html> (Acceso en Agosto 2011).
- Calixto J. B. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. **33**: 179-189.

- Calzada F., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Contreras A y Mata R. (1998). Screening of Mexican Medicinal Plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*. **36** (5): 305-309.
- Calzada F., Cedillo-Rivera R. y Mata R. (2001). Antiprotozoal Activity of the Constituents of *Conyza filaginoides*. *Journal of Natural Products*. **64**: 671-673.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. y Capasso F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*. **65** (4): 337-353.
- Carter R. B. (1991). Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*. **47**: 211-220.
- Chen X. y Xiao J. (2005). RP-HPLC-DAD Determination of Flavonoids: Separation of Quercetin, luteolin and Apigenin in *Marchantia convoluta*. *Irani Journal of Pharmaceutical Research*. **3**: 175-181.
- Christensen L. P. y Lam J. (1991). Acetylenes and related compounds in Asterae. *Phytochemistry*. **30** (8): 2453-2476.
- Cieśla L. y Waksmundzka-Hajnos M. (2009). Review Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 1035–1052.
- Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, 2011. Página web. <http://www.ccmp.gov.tw/en/public/public.asp?selno=94&relno=94&level=C>. (Acceso en Agosto 2011).
- Couto V. M., Vilela F. C., Dias D. F., Dos Santos M. H., Soncini R., Nascimento C. G. y Giusti-Paiva A. (2011). Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **134**: 348–353.
- Cronquist A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York. p. 1021-1028.
- Cronquist A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden. 2nd edition. p. 26-28, 413-417, 446-448.
- Déciga-Campos M., Guerrero-Analco J. A., Quijano L. y Mata R. (2006). Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. **83**: 342–348.
- Deng S., West B. y Jensen J. (2008). Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol glycoside and aglycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method. *Food Chemistry*. **111**: 526–529.
- Domínguez X. A., Quintero G. y Butruille D. (1972). Triterpenoids and triacontane from *Conyza filaginoides*. *Phytochemistry*. **11**: 1855-1856.

- Dubber M. J y Kanfer I. (2004). High performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **7**(3): 303-309.
- Emilien G., Maloteaux J. y Ponchon M. (1999). Pharmacological Management of Diabetes: Recent Progress and Future Perspective in Daily Drug Treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. **81**(1): 37-51.
- The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, 2011. Página web. <http://escop.com/publications> (Acceso en Agosto 2011).
- European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care, 2011. European Pharmacopoeia. Página web. <http://www.edqm.eu/en/European-Pharmacopoeia-1401.html> (Acceso en Julio 2011).
- Fathiazad F., Delazaar A., Amiri R. y Sarker S. (2005). Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. **3**: 222-227.
- Fröde T. S. y Medeiros Y. S. (2008). *Journal of Ethnopharmacology*. **115**: 173-183.
- Galal A. H., Abdel-Sattar E., El-Feraly F., Mossa J., Meselhy M., Katoda S. y Namba T. (1998). Diterpene acids from *Conyza incana*. *Phytochemistry*. **48**(1): 159-163.
- García M. A., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. L., Alcántara A. (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos A. C. p. 55.
- Khana S., Mehmooda M., Akbar-Ali A., Ahmed F., Darc A. y Gilani A. H. (2011). Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of betel nut in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. Artículo en prensa.
- Guerrero-Analco J., Medina-Campos O., Brindis F., Bye R., Pedraza-Chaverri J., Navarrete A. y Mata R. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry*. **68**: 2087-2095.
- Gutiérrez-Lugo M. T., Barrientos-Benítez T., Luna B., Ramírez-Gama R. M., Bye R., Linares E. y Mata R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crud drug extracts from Mexican Medicinal Plants. *Phytomedicine*. **2** (4): 341-347.
- Heinrich M., Robles M., West J. E., Ortiz de Montellano B. R. y Rodríguez E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **38**: 539-565.
- Hernández F. (1959). *Historia Natural de Nueva España*. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 44, 269, 270.
- Hersch-Martínez P. (1997). Medicinal Plants and Regional Traders in Mexico: Physiographic differences and conservational challenge. *Economic Botany*. **51**: 107-120.

- Hersch-Martínez P. (2000). *Plantas medicinales. Relato de una posibilidad confiscada: el estatuto de la flora en la biomedicina mexicana*. Instituto Nacional de Antropología e Historia. p. 60.
- Hinshaw J. V. Solid-Phase Microextraction, 2003. Página web. <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/> (Acceso en Febrero 2011).
- Hogan S., Zhang L., Li J., Sun S., Canning C. y Zhou K. (2010). Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutrition & Metabolism*. **7**: 71-79.
- Hrutfiord B. F., Hatheway W. H., Smith D. B. (1988). Essential oil of *Conyza canadensis*. *Phytochemistry*. **27**(6): 1858-1860.
- International Conference of Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. Step 4 version. 13 p.
- Ignat I., Volf I. y Popa V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. **126**: 1821–1835.
- Nuengchamnong N., Hermans-Lokkerbol A. e Ingkaninan K. (2004). Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colotimetric Detection of Antioxidant Activity. *Naresuan University Journal*. **12**(2): 25-37.
- Jang I. S. y Kim D. H. (1996). Purification and Characterization of a-L-Rhamnosidase from *Bacteroides* JY-6, a Human Intestinal Bacterium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **19**(12): 1546-1549.
- Ji Y., Xua Q., Hub Y. y Heyden Y. (2005). *Journal of Chromatography A*. **1066**: 97–104.
- Kamalakkannan N. y Mainzen Prince P. S. (2006). Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. **98**: 97-103.
- Sakakibara S., Honda Y., Nakagawa S., Ashida H. y Kanazawa K. (2005). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 571-581.
- Kasabri V., Afifi F. y Hamdan I. (2011). In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. **133**: 888–896.
- Kong L. D., Abliz Z., Zhou C. X., Li L. J., Cheng C. H. K y Tan R. X. (2001). Glycosides and xanthine oxidase inhibitors from *Conyza bonariensis*. *Phytochemistry*. **58**: 645–651.

- Kwon O., Eck P., Chen S., Corpe C. P., Lee J., Kruhlak M. y Levine M. (2007). Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **21**: 366-377.
- Le Bars D., Gozariu M y Cadden S. W. (2001). Animal Models of Nociception. *Pharmacological Reviews*. **53**(4): 597–652.
- Liang X., Jin Y., Wang Y., Jin G., Fua Q., Xiao Y. (2009). Qualitative and quantitative analysis in quality control of traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 2033–2044.
- Lis A. y Piggott J. R. y Góra J. (2002). Chemical composition variability of the essential oil of *Conyza canadensis* Cronq. *Flavour and Fragrance Journal*. **18**: 364–367.
- Lorke D. (1983). A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing. *Archives of Toxicology*. **54**: 275-287.
- Maffei M. E., Gertsch J. y Appendino G. (2011). *Natural Product Reports*. **28**: 1359-1380.
- Mukhtar N., Iqbal K., Anis I y Malik A. (2002). Sphingolipids from *Conyza canadensis*. *Phytochemistry*. **61**: 1005–1008.
- Manzano S. y Williamson G. (2010). Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. **54**: 1773–1780.
- Martínez M. (1979). *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México. p.70.
- Martínez M. (1989). *Las plantas medicinales de México*. Ed. Botas. México. p. 90.
- Mata R., Rojas, Acevedo L., Estrada S., Calzada F., Rojas I., Bye R. y Linares E. (1997). Smooth Muscle Relaxing Flavonoids and Terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta Medica*. **63**: 31-35.
- Mendoza, C. G., García, P. J., y Estrada, L. E. (1997). *Catálogo y usos terapéuticos de plantas medicinales que se comercializan en fresco en el Mercado de Sonora*. Materiales para la docencia, No 2. Chapingo, México. 135 p.
- Monroy-Ortíz C. y Castillo España P. (2007). *Plantas Medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Segunda edición. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 405 p.
- Mosihuzzaman M. y Choudhary M. I. (2008). Protocols on safety, efficacy, standardization, and documentation of Herbal Medicine (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. **80**(10): 2195–2230.

- Murota K. y Terao J. (2003). Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **417**: 12–17.
- Navarro J. (1992). *Historia Natural o Jardín Americano (Manuscrito de 1809)*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Mexicano del Seguro Social e Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. p.30.
- Nesom L. (1990). Further definition of *Conyza* (Asteraceae: Astereae). *Pytologia*. **68**: 229-233.
- Nesom L. (1990). Taxonomy of the genus *Laennecia* (Asteraceae: Astereae). *Pytologia*. **68**: 205-228.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 58 p.
- Can Ö. D., Öztürk Y., Öztürk N., Sagratini G., Ricciutelli M., Vittori S. y Maggi F. (2011). Effects of treatment with St. John's Wort on blood glucose levels and pain perceptions of streptozotocin-diabetic rats. *Fitoterapia*. **82**: 576–584.
- Olaiz-Fernández G., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Rojas R., Villalpando-Hernández S., Hernández-Avila M., Sepúlveda-Amor J. (2006). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.
- Omolo M.O., Okinyo D., Ndiege O., Lwande W. y Hassanali A. (2005). Fumigant toxicity of the essential oils of some African plants against *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Phytomedicine*. **12**: 241–246.
- Palacios-Espinosa F., Déciga-Campos M. y Mata R. (2008). Antinociceptive, hypoglycemic and spasmolytic effects of *Brickellia veronicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. **118**: 448–454.
- Paulo A., Martins S., Branco P., Dias T., Borges C., Rodrigues A., Costa M., Teixeira A. y Mota-Filipe H. (2008). The Opposing Effects of the Flavonoids Isoquercitrin and Sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on Oral Glucose Tolerance in Rats. *Phytotherapy Research*. **22**: 539–543.
- Pawliszyn J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. Wiley-VCH. New York. 247 p.
- Pires J. M., Mendes F., Negri G., Duarte-Almeida J. M. y Carlini E. A. (2009). Antinociceptive Peripheral Effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both Plants known popularly by Brand Names of Analgesic Drugs. *Phytotherapy Research*. **23**: 212–219.
- Qin Y., Zhou F., Gao F., Bian J. S. y Shan F. (2009). Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**: 11463–11468.

- Rauter A., Martins A., Borges C., Mota-Filipe H., Pinto R., Sepodes B. y Justino J. (2010). *Phytotherapy Research*. **24**: S133–S138.
- Rojas A., Cruz S., Rauch V., Bye R., Linares E. y Mata R. (1995). Spasmolytic Potential of Some Plants Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Phytomedicine*. **2**(1): 51-55.
- Alarcón-Aguilar F.J., Roman-Ramos R., Pérez-Gutiérrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C. C. y Flores-Saenz J. L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. **61**: 101–110.
- Skopec M., Green A. K. y Karasov W. H. (2010). Flavonoids Have Differential Effects on Glucose Absorption in Rats (*Rattus norvegicus*) and American Robins (*Turdus migratorius*). *Journal of Chemical Ecology*. **36**: 236–243.
- Snyder L., Kirkland J. J. y Glajch J. L. (1997). Practical HPLC Method Development. Second edition. John Wiley Sons Inc. USA. 800p.
- *Nueva Farmacopea de la Sociedad Farmacéutica de México*. (1896). Oficina Tipográfica de la Oficina de Fomento. México.
- Su Y., Koike K., Guo D., Satou T., Liu J., Zheng J. y Nikaido T. (2001). New apiose-containing triterpenoid saponins from *Conyza blinii*. *Tetrahedron*. **51**: 6721-6726.
- Svetaz L., Zuljan F., Derita M., Petenatti E., Tamayo G., Cáceres A., Filho V. C., Giménez A., Pinzón R., Zacchino S. y Gupta M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*. **127**: 137–158.
- Tada T., Tezuka Y., Shimomura K., Ito S., Hattori H. y Katoda S. (2001). Effect of depigmentation for 3,4-di-*O*-Caffeoylquinic Acid Guided by Tyrosinase Inhibitory Activity from *Conyza filaginoides*. *Journal of Oleo Science*. **50**(4): 211-215.
- Tada T., Ohnishi K., Komiya T. e Imai K. (2002). Syntetic search for cosmetic ingredients: preparations, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of caffeic amides. *Journal of Oleo Science*. **51**(1): 19-27.
- Takeuchi T., Tanaka K., Nakajima H., Matsui M. y Azuma Y. (2007). M2 and M3 muscarinic receptors are involved in enteric nerve-mediated contraction of the mouse ileum: findings obtained with muscarinic-receptor knockout mouse. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **292**: G154–G164.
- ZipCodeZoo. The BayScience Foundation, 2010. Página web. http://zipcodezoo.com/Plants/C/Conyza_filaginoides/ (Acceso en Junio 2010).
- The International Plant Name Index, 2010. Página web. <http://ipni.org/> (Acceso en Junio 2010).

- Torrenegra R., Robles J., Waibel R., Löwel M. y Achenbach H. (1994). Diterpenes and diterpene xylosides from *Conyza trihecatactis*. *Phytochemistry*. **35**(1): 195 - 199.
- Urzúa A. y Mendoza L. (1995). Diterpene acetylxylosides from the exudate of *Conyza linearis*. *Phytochemistry*. **39**(6):1489-1491.
- Van Den Dool H. y Kratz P. D. (1963). A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*. **11**: 463-471.
- Vas G. y Vékey K. (2004). Special feature: Tutorial. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*. **39**: 233–254.
- Verspohl, E. J. (2002). Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica*. **68**: 581-590.
- Villaseñor J. (1993). *La familia Asteraceae en México*. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. **XLIV**: 117-124.
- World Health Organization, 1991. Guidelines for the assessment of herbal medicines. Programme on Traditional Medicines. Geneve. 5p.
- World Health Organization, 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneve. 122p.
- World Health Organization, 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneve. 80p.
- World Health Organization, 2002. WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneve. 74p.
- World Health Organization, 2008. Fact sheet 134. Página web. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html> (Acceso en Junio 2010).
- World Health Organization, 2011. Página web. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/> (Acceso en Julio 2011).
- World Health Organization, 2011. Promoting African Medicinal Plants through an African Herball Pharmacopoeia. Special Issue 14. Geneve. 4p.
- World Health Organization, 2011. Fact sheet 312. Página web. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html> (Acceso Agosto 2011).
- Witters, L. (2001). The blooming of the French lilac. *Journal of Clinical Investigation*. **108**: 1105–1107.
- Yadav V., Yadav P. K., Yadav S. y Yadav K.D.S. (2010). α -L-Rhamnosidase: A review. *Process Biochemistry*. **45**: 1226–1235.

- Yang C., He Z., Li X., Zheng Q., He C., Yang J. y Morita T. (1989). Blinin, a neoclerodane diterpene from *Conyza blinii*. *Phytochemistry*. **28**(11): 3131-3134.
- Yildizoglu-Ari N., Melih Altan V., Altinkurt O.y Ozturk Y. (1991). Pharmacological effects of rutin. *Phytotherapy Research*. **5**: 19-23.
- Zdero C., Bohlmann F. y Mungai G. M. (1990). *Seco*-clerodanes and other diterpenes from *Conyza welwitschii*. *Phytochemistry*. **29**(7): 2247-2252.
- Zdero C., Bohlmann F. y Mungai G. M. (1991). Clerodanes, *seco*-clerodanes, geranyl geraniol derivatives and unusual sesquiterpenes from *Conyza hypoleuca*. *Phytochemistry*. **30**(2): 575-581.
- Zhang L., Yang J., Chen X., Zan K., Wen X., Chen H., Wang Q. y Lai M. (2010). Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*. **132**: 518–524.
- Zolla C. (1994). *Flora Medicinal Indígena de México*. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. III. México. p. 1383.
- Zu Y., Li C., Fu Y. y Zhao C. (2006). Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **41**: 714-719.