



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD IZTAPALAPA

Evaluación farmacocinética de una fracción estandarizada (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) obtenida de cultivos celulares de *Sphaeralcea angustifolia*, administrada vía oral en ratón.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PRESENTA**

M. en M.M. Jade Leonor Serrano Román

COMITÉ TUTORAL

Codirectora: Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Codirectora: Dra. María del Pilar Nicasio Torres

Asesor: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

Iztapalapa, Ciudad de México, julio 2020.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación Biomédica del Sur, del Instituto Mexicano del Seguro Social, CIBIS-IMSS en Xochitepec-Morelos, bajo la dirección de la Dra. María del Pilar Nicasio Torres y la Dra. Elizabeth Hernández Pérez del Departamento de Ciencias de la Salud. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro CVU/Becario 513546/2866574, que comprendió del periodo de 1 de septiembre 2015 al 31 de agosto 2019. El autor agradece al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), por la beca complementaria otorgada durante sus estudios de doctorado, con el número de registro Matrícula 99186328, que comprendió del periodo de 1 de marzo 2016 al 29 de febrero 2020.

El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

COMITÉ TUTORAL

Codirectora

Dra. Elizabeth Hernández Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa
sila@xanum.uam.mx

Codirectora

Dra. María del Pilar Nicasio Torres
Laboratorio de Biotecnología
Centro de Investigación Biomédica del Sur
Instituto Mexicano del Seguro Social
pialiva@yahoo.com.mx

Asesor

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Laboratorio de Farmacología
Centro de Investigación Biomédica del Sur
Instituto Mexicano del Seguro Social
enriqueferrer_mx@yahoo.com

Los miembros del Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **“Evaluación farmacocinética de una fracción estandarizada (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) obtenida de cultivos celulares de *Sphaeralcea angustifolia*, administrada vía oral en ratón”** que presentó:

M. en M.M. Jade Leonor Serrano Román

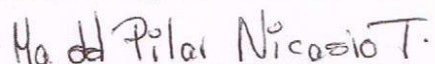
El día 17 de Julio del año 2020

JURADO:

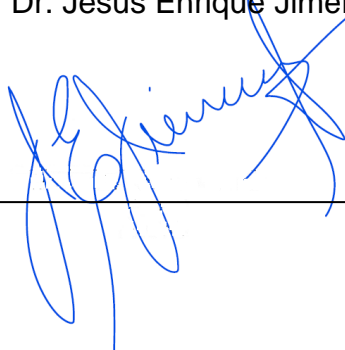
Presidente: Dra. Elizabeth Hernández Pérez



Secretario: Dra. María del Pilar Nicasio Torres



Vocal: Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer



AGRADECIMIENTOS

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

Marie Curie (1867 – 1934)

A la Dra. María del Pilar Nicasio Torres le agradezco por abrirme las puertas del laboratorio de Biotecnología, por ayudarme en mi formación científica, gracias por el apoyo incondicional que siempre me ofreció durante este proyecto, por facilitar los insumos para realizar los experimentos, por todas sus observaciones y correcciones a mis escritos y presentaciones.

Al Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer, le agradezco por su gran apoyo, en el asesoramiento y orientación para realizar los experimentos en el estudio de validación y farmacocinética, le agradezco por tener el tiempo para instruirme y ayudarme siempre que solicité su apoyo.

A la Dra. Elizabeth Hernández Pérez, gracias por recibirme como su estudiante, le agradezco por su instrucción y colaboración en el desarrollo de esta investigación, por su apoyo en los exámenes y sus aportaciones para mejorar este proyecto.

Los tres formaron un maravilloso comité tutorial, siempre ayudándome a mejorar como estudiante y como investigadora.

DEDICATORIA

A Dios porque su amor y bondad no tienen fin, su gracia me sustenta y hoy estoy segura de que todo lo que soy y todo lo que tengo es por medio de su amor. Gracias por las bendiciones y las pruebas porque de ellas he aprendido y hoy sé que son para mejorar.

A mi esposo Elías Gabriel Pallán Martínez gracias por el apoyo incondicional que me has brindado, por amarme sin importar nada, por ser mi compañero de vida y también un gran amigo, te amo.

A mis hijos Elías Gabriel y Jade Geraldine, son uno de los mayores regalos que me ha dado Dios en la vida, son la fuente más pura de mi inspiración, gracias por cada momento de felicidad, por todo su cariño, abrazos, besos, berrinches, juegos y sonrisas, los amo con todo mi corazón.

A mis padres Genaro Fidel Serrano Ocampo y Evangelina Román Tagle, gracias por su apoyo y amor incondicional, siempre han sido un gran ejemplo de vida, su fortaleza, disciplina y nobleza me hacen admirarlos y amarlos cada día más, los amo.

A mi suegra Rosa María Martínez Barrera gracias por su apoyo, cariño y consejos, es un ejemplo de valentía y esfuerzo, la quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
I. Introducción	1
I.1 Enfermedades reumáticas	1
I.2 Artritis reumatoide	2
I.2.1 Tratamiento de la artritis reumatoide	5
I.2.2 Tratamiento farmacológico de la artritis reumatoide	6
I.2.3 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) no biológicos	6
I.2.4 Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) biológicos	7
I.2.5 Inhibidores del factor de necrosis tumoral α (Anti-FNT- α)	7
I.2.6 Inhibidores de anti-CD20, de IL-6 y de la señalización de células T	7
II. Antecedentes	8
II.1 <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don	8
II.1.1 Usos medicinales <i>S. angustifolia</i>	9
II.2 Farmacología y química	9
II.3 Evaluación clínica del fitofármaco	12
II.4 Estudios Biotecnológicos	12
II.5 Actividad antiartrítica de la escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico	15
II.6 Farmacocinética	16
II.6.1 Absorción	17
II.6.2 La distribución	18
II.6.3 La eliminación	19
II.6.3.1 La eliminación renal y biliar	20
II.6.4 Modelos compartimentales	21
II.6.5 Modelo monocompartimental	22
II.6.6 Modelo bicompartimental	23
II.6.7 Estudio farmacocinético de productos naturales	24
III. Justificación	26
IV. Pregunta de Investigación	27
V. Hipótesis	27
VI. Objetivos	27
VI.1 Objetivo general	27
VI.2 Objetivos específicos	27
VII. Materiales y Métodos	28
VII.1. Material vegetal	28
VII.1.1 Cultivo de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i>	28
VII.1.2 Inducción y producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico	29
VII.1.3 Extracción y obtención de suspensiones celulares	29
VII.2 Preparación de la fracción activa SaTES	30
VII.3 Purificación de tomentina y ácido sphaerálcico	31
VII.4 Condiciones de análisis de CLAR	32
VII.5 Curvas de calibración por CLAR de tomentina,	34

escopoletina y ácido sphaerálcico	
VII.6 Animales	34
VII.6.1 Obtención de plasma de ratón	35
VII.7 Soluciones stock de estándares y de patrón interno para perfil cromatográfico	35
VII.8 Curvas de concentración de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasma	35
VII.9 Extracción de los compuestos activos en plasma	36
VII.10 Eficiencia de la extracción (Recuperación)	36
VII.11 Validación de los métodos analíticos	37
VII.11.1 Linealidad y sensibilidad	37
VII.11.2 Prueba de especificidad	37
VII.11.3 Prueba de exactitud y precisión	38
VII.11.4 Estudio de estabilidad	38
VII.12 Análisis farmacocinético	39
VII.12.1 Administración oral e intravenosa	39
VII.12.2. Productos de excreción	40
VIII. Resultados	41
VIII.1 Validación del método analítico por CLAR	41
VIII.1.1 Curvas de calibración de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico	41
VIII.1.2 Linealidad y sensibilidad	41
VIII.2 Validación del proceso de extracción de compuestos activos en plasma	44
VIII.2.1 Eficacia de extracción	44
VIII.2.2 Especificidad	46
VIII.2.3 Precisión y exactitud	46
VIII.2.4 Estabilidad	48
VIII.3 Obtención de la fracción SaTES estandarizada en tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico.	50
VIII.4 Análisis farmacocinético	51
VIII.4.1 Farmacocinética de la administración oral	51
VIII.4.2 farmacocinética de la administración intravenosa	57
VIII.4.3 Farmacocinética de productos de excreción	64
IX. Discusión	70
X. Conclusión	76
XI. Perspectivas	77
XII. Referencias bibliográficas	79
XIII. Cronograma de actividades	84
XIV. Anexo publicación	85

ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto de CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:1) de biomásas celulares de <i>S. angustifolia</i>	31
Cuadro 2. Condiciones de separación cromatográfica en columna para la obtención de la fracción SaTES, escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.	32
Cuadro 3. Sistema de elución para análisis por CLAR de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.	33
Cuadro 4. Parámetros de detección y cuantificación de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico	43
Cuadro 5. Capacidad de recuperación de los compuestos activos extractados en plasma en diferentes días (n=5).	44
Cuadro 6. Parámetros de exactitud y precisión determinados en los análisis intra- e inter- ensayos de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasma de ratón (matriz).	47
Cuadro 7. Perfil de estabilidad de los compuestos activos tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasmas de ratón (matriz) bajo diferentes condiciones de manejo.	49
Cuadro 8. Variaciones en la concentración en plasma de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico después de la administración oral e intravenosa de una dosis única (400 mg/kg) de la fracción de SaTES estandarizada en ratones ICR.	53
Cuadro 9. Parámetros farmacocinéticos después de la administración oral de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico presentes en la fracción SaTES estandarizada de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> en el plasma de ratones ICR; n=10. Los analitos se ajustan a un modelo de dos compartimentos.	56
Cuadro 10. Parámetros farmacocinéticos después de la administración intravenosa de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico presentes en la fracción SaTES estandarizada de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> en el plasma de ratones ICR; n=3. El análisis se realizó en los modelos de uno y dos compartimientos.	61
Cuadro 11. Excreción de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico por orina y heces durante las primeras 24 horas, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada.	65
Cuadro 12. Parámetros farmacocinéticos en el modelo no compartimental de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en orina y en heces de ratones ICR, después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada.	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Fotografía de la especie <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don 1a) planta obtenida por micropropagación en el CIBIS-IMSS, 1b) acercamiento de la flor.	8
Figura 2. Estructuras químicas de los compuestos con actividad antiinflamatoria aislados del cultivo de células en suspensión de la especie <i>Sphaeralcea angustifolia</i> (Cav.) G. Don	14
Figura 3. Tipos de transporte celular	18
Figura 4. Proceso de distribución de un fármaco	19
Figura 5. Representación del modelo monocompartimental	22
Figura 6. Representación del modelo bicompartimental	24
Figura 7. Cromatogramas y espectro de absorción de A) escopoletina $t_r=11.349$ min y $\lambda_{max}= 344.6$ nm (Sigma), B) tomentina $t_r=11.288$ y $\lambda_{max}= 343.4$ nm y D) ácido sphaerálcico $t_r=23.319$ y $\lambda_{max}= 357.7$ nm; aislados de células en suspensión de <i>S. angustifolia</i> . C) Mezcla de escopoletina y tomentina $t_r=11.457$ min y $\lambda_{max}= 344.6$ nm a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ de cada compuesto.	42
Figura 8. Perfiles cromatográficos de las curvas de concentración de (a) tomentina $t_r=11.288$ (20, 10, 5, 2.5, 1.25 y $0.625 \mu\text{g/mL}$), (b) escopoletina $t_r= 11.349$ min (20, 10, 5, 2.5 y $1.25 \mu\text{g/mL}$) y (c) ácido sphaerálcico $t_r= 23.319$ min (40, 20, 10, 5 y $2.5 \mu\text{g/mL}$) con el patrón interno de dopamina ($t_r = 8.019$ min).	43
Figura 9. Perfil cromatográfico de la fracción SaTES obtenida de células en suspensión de <i>Sphaeralcea angustifolia</i> y estandarizada en la mezcla de las cumarinas (tomentina y escopoletina) $t_r=11. 457$ min y ácido sphaerálcico $t_r= 23.319$ con patrón interno dopamina.	50
Figura 10. Análisis de las variaciones de concentración de ácido sphaerálcico en plasma con respecto al tiempo en minutos después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.	52
Figura 11. Análisis de las variaciones de la concentración en plasma de tomentina y escopoletina (mezcla de cumarinas) con respecto al tiempo, después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.	52

- Figura 12.** Análisis de las variaciones de concentración de ácido sphaerálcico en plasma con respecto al tiempo en minutos, después de la administración intravenosa de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos. **63**
- Figura 13.** Análisis de la variación de las concentraciones de la mezcla de tomentina y escopoletina en plasma con respecto al tiempo después de la administración intravenosa de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos. **63**
- Figura 14.** Perfiles cromatográficos de la mezcla de tomentina y escopoletina ($rt = 11.457$ min), y ácido sphaerálcico ($rt = 23.319$ min) detectados en extractos de heces (a) y orina (b) recolectados a las (I) 4, (II) 8, (III) 12 y (IV) 24 horas, después de una administración oral única de fracción SaTES estandarizada. **64**
- Figura 15.** Excreción de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) en orina con respecto al tiempo, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada. **69**
- Figura 16.** Excreción de ácido sphaerálcico en heces con respecto al tiempo, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada. **69**

Abreviaturas

ACF	Adyuvante completo de Freund
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
AIC	Criterio de información de Akaike
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ANA	Ácido naftalenacético
Anti-FNT-α	Inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa
AUC	Área bajo la curva
Bias	Exactitud
°C	Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
Células T CD4	Leucocitos que expresan una proteína de superficie llamada CD4
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₂Cl₂:CH₃OH	Diclorometano:metanol
CL/F	Aclaramiento aparente
Cl/F_obs	Aclaramiento total aparente del compuesto del organismo después de la administración oral
CLAR	Cromatografía líquida de alto rendimiento
C_{last_obs}/C_{max}	Última concentración medible observada /la concentración máxima
cm	Centímetros
C_{max}	Concentración máxima
CN	Cinetina
C_{nom}	Concentración nominal
C_{obs}	Concentración observada
C_p	Concentración plasmática
DE₅₀	Dosis efectiva 50
DHFR	Enzima dihidrofolato reductasa
Δt	Intervalo de recolección de orina o heces
ΔXu	Cantidad de compuesto excretado durante cada intervalo
$\Delta Xu/\Delta t$	Velocidad de excreción determinada experimentalmente
FCE	Factores de crecimiento epidérmico
FARME	Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad
FCF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FR	Factor reumatoide
g	Gramos
FEC-MG	Factores estimulantes de colonias de monocitos y granulocitos
h	Hora(s)
H₂O:CH₃CN	Agua: acetonitrilo
IFN	Interferones
IFN-γ	Interferón gama
IL	Interleucinas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
i.p.	Intraperitoneal
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

k₁₀	Constante de velocidad de eliminación del compartimiento central
k₁₂	Constante de velocidad de transferencia desde el compartimiento central al compartimiento periférico
k₂₁	Constante de velocidad de transferencia desde el compartimiento periférico al compartimiento central
ka	Constante de absorción
ke	Constante aparente de la velocidad de primer orden para la excreción
kg	Kilogramos
KNO₃	Nitrato de potasio
L	Litro
λ_z	Lambda _z
LOD	Límites de detección
LOQ	Límites de cuantificación
m	Metros
medio MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
mg	Miligramos
μg	Microgramos
min	Minuto
mL	Mililitro
μl	Microlitros
μm	Micrómetro
mmol	Milimolar
MRT	Tiempo medio de residencia
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTX	Metrotexato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NH₄NO₃	Nitrato de amonio
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
NOM	Norma oficial mexicana
FCDP	Factores de crecimiento derivado de plaquetas
pg	Picogramo
p/v	Peso/volumen
R²	Coeficiente de determinación
rf	Tiempo de retención
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Precisión
<i>S. angustifolia</i>	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>
SC	Criterio de Schwarz
SD	Desviación estándar
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SS	Suma de cuadrados
t_{1/2}	Vida media de eliminación
t_{1/2α}	Tiempo medio de absorción para el compartimiento central
t_{1/2β}	Tiempo medio de absorción para el compartimiento periférico
t_{1/2ka}	Tiempo medio de absorción
TFA	Ácido trifluoroacético
Th	Linfocitos t colaboradores

T_{lag}	Tiempo de retraso
tm	Punto medio del intervalo de recolección.
T_{max}	Tiempo de la máxima concentración
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
FNT-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TPA	12 -O-Tetradecanoilforbol-13-Acetato
UV	Ultra violeta
FCEV	Factor de crecimiento endotelial vascular
V/F	Volumen de distribución aparente
v/v	Volumen/volumen
Vz/F_{obs}	Volumen aparente de distribución durante la fase terminal después de la administración no intravenosa
Xu	Cantidad acumulativa de compuesto eliminadas sin cambios

Resumen

Sphaeralcea angustifolia (Cav.) G. Don (*Malvaceae*) es una planta que ha sido ampliamente usada en enfermedades inflamatorias. Los componentes activos con efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores identificados de esta especie fueron tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico (SaTES); los cuales fueron obtenidos del cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia*. Antes de la prueba farmacocinética, la cromatografía líquida de alto rendimiento para tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico se realizó para determinar la exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad, especificidad, límites de detección y los parámetros de cuantificación de un intervalo de tiempo, además de la eficiencia de la extracción y la estabilidad de los compuestos.

El estudio farmacocinético se realizó con ratones ICR (albino), los cuales recibieron una dosis oral o intravenosa (400 mg/kg) de la fracción activa SaTES estandarizada. Los resultados de la validación de los métodos analíticos permitieron la detección de una mezcla de cumarinas y ácido sphaerálcico de la fracción SaTES en plasma; por lo tanto, se consideraron fármacos con potencial actividad antiartrítica porque no se detectaron productos derivados de su biotransformación. De acuerdo con los valores de los criterios de información de Akaike (AIC), suma de los cuadrados (SS), criterio de Schwarz (SC) y el coeficiente de determinación (R^2), la cinética de los compuestos siguió un modelo de dos compartimentos.

Para determinar las constantes farmacocinéticas de la eliminación urinaria y fecal en ratones de compuestos antiartríticos de la fracción activa estandarizada (SaTES) de *S. angustifolia*, administrada por vía oral a 400 mg/kg. Se estableció que la mezcla de cumarinas (escopoletina y tomentina) fue eliminada por la orina; mientras que el ácido sphaerálcico se eliminó principalmente por vía fecal, siguiendo un comportamiento no compartimental. No se detectaron productos derivados de su biotransformación. La información proporcionada permitirá el diseño de un fitomedicamento de administración oral, efectivo y seguro, útil para el tratamiento de la artritis reumatoide.

Palabras clave: Farmacocinética, artritis, antiartrítico, cumarinas, escopoletina, tomentina, ácido sphaerálcico, inmunomodulador.

Abstract

Sphaeralcea angustifolia (Cav.) G. Don (*Malvaceae*) it is a plant has been widely used in inflammatory diseases. The active components with immunomodulatory effects identified of this species were tomentin, scopoletin, and sphaeralcic acid (SaTES); they were obtained from a cell suspension culture of *S. angustifolia*. Before of pharmacokinetic assay, high-performance liquid chromatography of tomentin, scopoletin, and sphaeralcic acid was performed, for determining the accuracy, precision linearity, sensibility, specificity, detection limits, and quantification time-range parameters in addition to extraction efficiency and stability of the compounds.

The pharmacokinetic assay was performed with ICR (albino) mice, which received an oral or an intravenous dose (400 mg/kg) of the standardized SaTES active fraction. The results of the validated analytical methods allowed for detection of a coumarin mixture and sphaeralcic acid from SaTES fraction in plasma; therefore, they are considered drugs with potential antiarthritic activity because no products derived from their biotransformation were detected. According to the values of Akaike Information Criteria (AIC), sum of squares (SS), Schwarz Criteria (SC), and determination coefficient (R^2), the compounds kinetics followed a two-compartment model.

For determine the pharmacokinetic constants of the urinary and fecal elimination in mice of antiarthritic compounds from standardized active fraction (SaTES) of *S. angustifolia*, orally administered to 400 mg/kg. It was established that the coumarin mixture (scopoletin and tomentin) were eliminated by the urine; while, sphaeralcic

acid was mainly eliminated by fecal path, following both a non-compartmental behavior. No products derived from their biotransformation were detected. The information provided will allow the design of a phytomedicine for oral administration, effective and safe, useful for the treatment of rheumatoid arthritis.

Keywords: Pharmacokinetic, arthritis, antiarthritic, coumarins, scopoletin; tomentin; sphaeralcic acid; immunomodulatory.

I. Introducción

I.1 Enfermedades reumáticas

Las enfermedades reumáticas comprenden cerca de 200 padecimientos de origen inflamatorio que afectan al sistema músculo-esquelético (articulaciones, huesos, músculos, tendones y ligamentos). Los síntomas y signos clínicos de mayor frecuencia son dolor, rigidez, disminución de la movilidad articular y, como resultado, diferentes grados de discapacidad física (Marini *et al.*, 2004; Mould-Quevedo *et al.*, 2008; Rodríguez-Amado *et al.*, 2011).

La importancia en salud pública de este conjunto de enfermedades radica en su elevada incidencia y prevalencia en la población en general, además de la comorbilidad asociada a la discapacidad física (Barrera-Cruz *et al.*, 2009; Rodríguez-Amado *et al.*, 2011).

En México, las enfermedades reumáticas en general no aumentan la mortalidad a corto plazo, por lo tanto, no se consideran una prioridad de salud, pero debido a su influencia en la calidad de vida e impacto socio-económico las convierte en un problema de salud pública. Los costos directos e indirectos implicados en estos trastornos son la principal causa de incapacidad permanente por enfermedad entre los afiliados al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), comprenden casi el 7 % de las consultas con el médico familiar en esta institución (Secretaría de Salud 2010; Rodríguez-Amado *et al.*, 2011).

El Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) cita que existen más de 1.5 millones de personas que padecen algún tipo de enfermedad reumática, entre los cuales la artritis reumatoide es una de las de

mayor prevalencia. La artritis reumatoide afecta del 0.2 al 2 % de la población mundial, principalmente al grupo con mayor capacidad laboral o productiva dentro de la sociedad (Barrera-Cruz *et al.*, 2009). Además, el 25 % de la población adulta sufre alguna forma de artrosis, porcentaje que se incrementa considerablemente en las personas mayores de 65 años y principalmente en mujeres (ISSSTE, 2012).

I.2 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide es una afección autoinmune, sistémica, crónica y degenerativa cuyo tejido blanco es la membrana sinovial que envuelve a las articulaciones. Esta afección conduce eventualmente a una poliartritis inflamatoria caracterizada por un patrón simétrico de articulaciones afectadas (Delgado-Vega, 2006; Neugebauer *et al.*, 2007).

Los síntomas más frecuentes son el dolor articular crónico, la inflamación articular, eritema (enrojecimiento), rigidez matutina o tras el reposo de las articulaciones, fatiga, cansancio, adinamia (disminución del movimiento), astenia (fatiga muscular), tanto física como cognitiva, malestar general o fiebre, contracturas musculares, parestesias y disestesias alrededor de las articulaciones, pérdida de la función de una o varias articulaciones y limitación de la movilidad (Mould-Quevedo *et al.*, 2008).

La membrana sinovial, es relativamente carente de células formada por 2 o 3 estratos de sinoviocitos, sostenidos sobre una fina red de tejido de colágeno, donde llegan numerosos vasos sanguíneos y linfáticos, así como terminaciones nerviosas. El sinovio es responsable del proceso inflamatorio y sus diferentes manifestaciones clínicas (Delgado-Vega, 2006; Larrarte *et al.*, 2007).

En la artritis reumatoide, la inflamación induce la liberación de mediadores endógenos, que favorecen a su vez, el flujo de moléculas y de células del sistema inmune que interactúan en red para estimularla o inhibirla. Las sustancias químicas mediadoras de la inflamación son producidas por las células que intervienen en el proceso, o son activadas a partir de moléculas presentes en el plasma, entre las que se encuentran las citocinas (Larrarte *et al.*, 2007; Juárez-Ciriaco *et al.*, 2008).

Las citocinas son producidas por los linfocitos y los macrófagos durante la respuesta inmunitaria a la inflamación, como son las interleucinas (IL) de la 1 a la 18, interferones (IFN) α y β , factor de necrosis tumoral (FNT) α y β , factores estimulantes de colonias de monocitos y granulocitos (FEC-GM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), factor de crecimiento epidérmico (FCE) y factor de crecimiento de fibroblastos (FCF). Muchos de los efectos de estas citocinas aumentan la actividad de los polimorfonucleares de macrófagos y la expresión de moléculas de histocompatibilidad. Provocan fiebre y liberación de proteínas que forman parte de las moléculas que participan en la inflamación, e inducen la expresión de receptores y moléculas de adhesión, así como la proliferación de células endoteliales y fibroblastos (Larrarte *et al.*, 2007).

En este sentido, los linfocitos T colaboradores, cooperadores o también conocidos como efectores (Th), participan en maximizar la capacidad del sistema inmune, como la activación de otras células inmunitarias y de manera importante son mediadores de la respuesta inmune-adaptativa. Los Th maduros, expresan la proteína de superficie CD4, por lo que son llamadas células T CD4⁺ (McInnes & Schett, 2007).

Los linfocitos T CD4⁺, las células B y los macrófagos se infiltran en el sinovio y pueden organizarse en discretos agregados linfoides con centros germinales. La hiperplasia resulta en un incremento de sinoviocitos semejantes a los macrófagos y semejantes a los fibroblastos (Firestein, 2003). Los fibroblastos, osteoclastos y condrocitos son estimulados por citocinas proinflamatorias, y como resultado producen localmente enzimas como las metaloproteínasas (enzimas proteolíticas que causan la destrucción ósea y cartilaginosa), proteasas de serina y agreganasas (enzimas proteolíticas que actúan sobre proteoglicanos, como los agreganos que son componentes del cartílago), llevando así a la destrucción de las estructuras articulares (Firestein, 2003).

Las citocinas derivadas de macrófagos y fibroblastos detectadas en el sinovio, son las interleucinas IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, FNT- α , el Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (FEC-GM) (Firestein, 2003; McInnes & Schett, 2007). Las citocinas IL-1 β , FNT- α , e IL-6 son los principales mediadores de la progresión de la respuesta inflamatoria. Una vez localizado el foco de daño, la liberación de estas citocinas proinflamatorias cesa y comienza la producción y liberación de citocinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10, las que a su vez desactivan a las células efectoras (McInnes & Schett 2007; Juárez-Ciriaco *et al.*, 2008).

En la artritis reumatoide, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) son mediadores de daño debido a que constituyen un riesgo para las células y las biomoléculas, como son los ácidos nucleicos, las proteínas, polisacáridos y lípidos. La sobreproducción de radicales libres, por los neutrófilos y

los monocitos contribuyen a la degradación de la matriz extracelular del cartílago e inhiben la síntesis de proteoglicanos y ácido hialurónico, dañando a la membrana celular, además de inducir la apoptosis de los sinoviocitos (Jang & Murrell, 1998; Wang *et al.*, 2002).

Las células polimorfonucleares inflamatorias, ingieren complejos inmunes que dan como resultado la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO), a través de la vía del sistema NADPH oxidasa, conocido como “estallido respiratorio”. Muchas de estas células inflamatorias generan cantidades de óxido nítrico (NO), un radical libre, en respuesta a la presencia de las citocinas proinflamatorias. El resultado del daño oxidante en las articulaciones, son los productos de la oxidación de lípidos como el malonildialdehído y de la oxidación de proteínas produciendo proteínas carboniladas, cuyas altas concentraciones son evidencia de daño tisular (Jang & Murrell, 1998; Bhowmick *et al.*, 2008).

I.2.1 Tratamiento de la artritis reumatoide

Los pacientes con artritis reumatoide pueden recibir un manejo farmacológico y un no farmacológico. El tratamiento farmacológico debe ser lo suficientemente agresivo para inducir la remisión de la enfermedad y consiste en antiinflamatorios, corticoides e inmunosupresores, agentes biológicos, entre otros, dependiendo de la cronicidad y severidad del cuadro. El manejo no farmacológico consiste en: educar al paciente y a la familia, apoyo psicológico, social y laboral (adecuación, reubicación, rehabilitación ocupacional, entre otros), medicina física y rehabilitación (medios físicos y ortésicos), (Ministerio de Salud, 2016).

I.2.2 Tratamiento farmacológico de la artritis reumatoide

El manejo farmacológico para la artritis reumatoide consiste en inducir la remisión completa de la enfermedad o alternativamente conseguir la mínima actividad inflamatoria posible. Dependiendo de la gravedad del cuadro se administran analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides e inmunosupresores, entre otros. Los AINE son fármacos antiinflamatorios, analgésicos, y antipiréticos. Los corticoides orales son efectivos para el manejo de la inflamación articular e inhiben la progresión radiológica; además deben ser usados en la menor dosis posible y por el menor tiempo permitido (Bao & Dai, 2011; Ministerio de Salud, 2016).

I.2.3 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) no biológicos

Estas sustancias son capaces de prevenir o reducir el daño articular y de esa manera preservar al máximo la articulación y su función. Ejemplo de FARME no-biológicos incluyen el Metrotexato, que por sus características de eficacia razonable y bajo costo, es el fármaco de elección para iniciar el tratamiento. Este posee actividad antiproliferativa e inmunosupresora por inhibir competitivamente a la enzima clave en el metabolismo del ácido fólico Dihidrofolato reductasa (DHFR), regula la cantidad de folato intracelular disponible para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos (Ministerio de Salud, 2016).

I.2.4 Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FARME) biológicos

El uso de los agentes biológicos (FARME biológicos) requiere la aprobación de la Junta Médica Reumatológica y se debe contar con una sala especial de aplicación de medicamentos o alternativamente servicio de hospitalización. Los agentes biológicos recomendados son: etanercept, infliximab, rituximab. Infliximab es una proteína que se une de forma específica al FNT- α , lo bloquea e inhibe de esta forma los mecanismos bioquímicos que provocan la respuesta inflamatoria. (Tak & Kalden, 2011; Ministerio de Salud, 2016).

Otros FARME-biológicos utilizados en el tratamiento de la inflamación articular son aquellos que bloquean selectivamente a las interleucinas (IL) proinflamatorias FNT- α , IL-1, IL-6 e IL-1 β (Tak & Kalden, 2011).

I.2.5 Inhibidores del factor de necrosis tumoral α (Anti-FNT- α)

Los inhibidores del FNT- α se utilizan asociados a Metotrexato (siempre que éste no esté contraindicado). Los inhibidores FNT- α reducen los síntomas e inhiben la progresión del daño estructural. (Tak & Kalden, 2011 y Ministerio de Salud, 2016).

I.2.6 Inhibidores de anti-CD20, de IL-6 y de la señalización de células T

Rituximab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que en combinación con Metotrexato inhibe la progresión del daño estructural en las articulaciones (McInnes & Schett 2007; Tak & Kalden, 2011; Ministerio de Salud, 2016).

Otros agentes biológicos para el tratamiento de artritis reumatoide son Abatacept, el cual inhibe señales co-estimuladoras que previenen la activación de células T e

inhibe el daño estructural. Otro agente biológico es Tocilizumab un anticuerpo anti-IL 6 utilizado como monoterapia o en combinación con Metotrexato (McInnes & Schett 2007; Tak & Kalden, 2011; Ministerio de Salud, 2016).

II. Antecedentes

II.1 *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don

La especie *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. (Malvaceae), crece en forma natural en climas templados, semi-secos y secos, entre los 1890 y los 3900 msnm. Se ha encontrado en orillas de caminos, áreas de disturbio, campos de cultivos abandonados y áreas urbanas. Esta planta es comúnmente conocida como “yerba del negro”, “vara de San José”, “hierba del golpe”, “cardón”, “malvón” o “tlixihuitl” en la lengua náhuatl (Figura 1) (Argueta *et al.*, 1994).

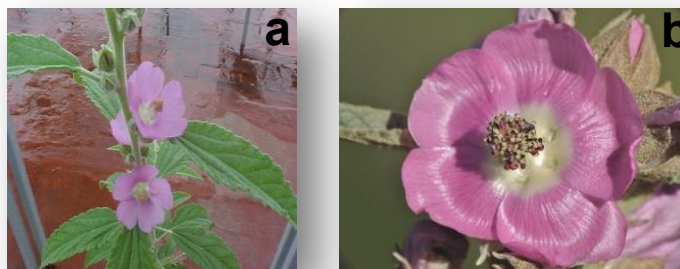


Figura 1. Fotografía de la especie *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. 1a) planta obtenida por micropropagación en el CIBIS-IMSS, 1b) acercamiento de la flor.

El género *Sphaeralceae* contiene alrededor de 40 especies que se encuentran principalmente en el oeste de América del Norte, con más del 50 % de ellas distribuidas en México en los Estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila,

Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Argueta *et al.*, 1994).

II.1.1 Usos medicinales *Sphaeralcea angustifolia*

Sphaeralcea angustifolia (*S. angustifolia*) se utiliza principalmente en afecciones que involucran un proceso inflamatorio: golpes, torceduras o quebraduras y heridas. En estos casos, es común la aplicación tópica de la planta machacada con unas gotitas de aceite cubriendo la zona afectada con un lienzo. También se menciona el uso de la raíz masticada para mitigar el dolor de las encías, afirmar los dientes y expeler la mucosidad, o en polvo para quitar las ronchas (Argueta *et al.*, 1994).

II.2 Farmacología y química

El extracto cloroformo-diclorometano de partes aéreas de *S. angustifolia* inhibió el desarrollo del edema subplantar (79%) inducido con λ -carragenina en ratas vía i.p. a 400 mg/kg (Meckes *et al.*, 2004).

En el modelo de inflamación crónica inducida con el ACF (adyuvante completo de Freund) por 12 días, la administración intraperitoneal (i.p.) del extracto (100 mg/kg/día) inhibió de manera sostenida y significativa (62.6 %) la formación del edema en la pata de la rata. Asimismo, en el modelo de edema auricular en ratón inducido con TPA (12 -O-tetradecanoilforbol-13-acetato por 5 días), la aplicación tópica del extracto redujo en un 51 % el edema auricular, a las 3 horas; además, el extracto ejerció un efecto protector al disminuir la irritación producida por TPA en la oreja del ratón. (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

Como etapa siguiente en el estudio de *S. angustifolia*, se llevó a cabo el fraccionamiento químico del extracto CH₂Cl₂ de las partes aéreas. Con base en los compuestos identificados, se atribuyó el efecto antiinflamatorio de dicho extracto de manera prioritaria al contenido de escopoletina, así como a otros constituyentes (β -sitosterol, estigmasterol, α y β amirinas y el ácido trans-cinámico) citados con actividad antiinflamatoria (García-Rodríguez *et al.*, 2012). El monoterpeno loliolido fue aislado del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta (Osti-Castillo *et al.*, 2010).

En el modelo agudo del edema auricular, el efecto antiinflamatorio que presentó el extracto fue dosis dependiente con una dosis efectiva media (DE₅₀) de 640 μ g/oreja), la escopoletina aislada tuvo un efecto similar (DE₅₀ = 660 μ g/oreja), el β -sitosterol fue significativamente menos activo (DE₅₀ = 1,610 μ g/oreja) que el extracto y la escopoletina (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

Posteriormente, se mencionó un avance en el conocimiento sobre los posibles mecanismos involucrados en la actividad antiinflamatoria de la planta, evaluando el efecto del extracto CH₂Cl₂, sobre la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias en el modelo de artritis experimental en ratas inducida con ACF. Los resultados en estos estudios demostraron que el extracto redujo los niveles séricos de las interleucinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6; de la misma forma, disminuyeron los niveles de FNT- α en el líquido sinovial (Juárez-Ciriaco *et al.*, 2008).

Conjuntamente, se observó un incremento en la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10. En este mismo estudio, se determinó que la aplicación tópica

del extracto CH₂Cl₂ de partes aéreas de la planta mezclado en vaselina en dosis de 100 ó 280 mg/parche sobre el dorso rasurado de conejos, no produce eritema o edema a las 24 y 72 horas después de su aplicación (Juárez-Ciriaco *et al.*, 2008).

La toxicidad aguda del extracto CH₂Cl₂ también fue evaluada en ratones y en ratas por administración vía i.p. empleando el procedimiento de Lorke. La dosis letal media (LD₅₀) fue de 350 mg/kg en ratas y de 2.150 g/kg en ratones; además, no hubo cambios hematológicos y bioquímicos, y no se observaron cambios histopatológicos en el hígado, riñón, pulmón y corazón (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

El extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de cultivos celulares de *S. angustifolia*, en el modelo de artritis experimental a dosis de 100 mg/kg al día 9 inhibió el edema articular un 72.19 %. Además mostró un efecto inmunomodulador en la concentración de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y FNT- α) disminuyendo los niveles de éstas en un 71.93% y 60.98% respectivamente e incrementando los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 en un 59.61 % en las articulaciones (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

La administración del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH no modificó el efecto inducido por Caolin/Carragenina, sobre el tamaño del bazo, éste es estadísticamente similar al de los del grupo control negativo. No obstante, los niveles locales de las citocinas se moduló favorablemente, al disminuir la concentración de las citocinas proinflamatorias FNT- α e IL-1 β e incrementar los niveles de las antiinflamatorias la IL-10 y la IL-4 alcanzaron niveles estadísticamente superiores a los del grupo control de daño (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

II.3 Evaluación clínica del fitofármaco

Los estudios realizados sobre la especie *S. angustifolia* constituyeron la plataforma científica básica para generar un fitomedicamento que fue evaluado clínicamente. Para tal propósito, se desarrolló un gel con el extracto CH₂Cl₂ de partes aéreas de *S. angustifolia* al 1 % y se evaluó el efecto terapéutico y la tolerabilidad en pacientes con osteoartritis administrado tópicamente en las manos durante 4 semanas, el grupo experimental 55 y 58 pacientes del grupo control. La eficacia del gel fue del (89%) similar al del diclofenaco al 2 % (91.3 %), redujo los síntomas principales de la osteoartritis como el dolor, inflamación y la rigidez de las articulaciones lo que favoreció la apertura y cierre de las manos (Romero-Cerecero *et al.*, 2013).

II.4 Estudios Biotecnológicos

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en la Norma Oficial Mexicana número NOM-059-ECOL-2001, establece que *S. angustifolia* se encuentra en peligro de desaparecer, por lo que su recolección ha sido restringida. Esto generó la búsqueda de una alternativa, como es la Biotecnología, para resolver el problema, tanto para la regeneración de la especie como para la producción de los compuestos activos (Nicasio-Torres *et al.*, 2016).

Para tal propósito, se establecieron líneas de cultivo de tejido desdiferenciado (callo) utilizando explantes de hoja. Posteriormente, se planteó el manejo de cultivo de células en suspensión como una estrategia que ofrece un gran potencial para la producción de escopoletina, metabolito citado como antiinflamatoria en la planta silvestre. Con la finalidad de estimular la producción de esta cumarina en las

suspensiones celulares, se modificó el balance de los nutrientes carbono:nitrógeno al reducir el contenido de nitrato en el medio de cultivo; estas condiciones promovieron la producción de otros compuestos no detectados en la planta. Los compuestos aislados y purificados (Figura 2) fueron ácido sphaerálcico (97% pureza) y una cumarina conocida como tomentina (88% pureza), (Pérez-Hernández *et al.*, 2014).

La actividad antiinflamatoria del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH (100 mg/kg) de biomasa y ambos compuestos (45 mg/kg vía i.p.) se determinó en los modelos de edema plantar inducido con λ-carragenina en ratones y en el modelo de edema auricular inducido por TPA. En el modelo de edema plantar el extracto CH₂Cl₂:CH₃OH inhibe la inflamación 24 % a las 3 h y el modelo de edema auricular inhibe la inflamación un 78 % a una dosis de 2 mg por oreja (Pérez-Hernández *et al.*, 2014).

El ácido sphaerálcico y la tomentina presentaron una actividad similar a la indometacina (medicamento antiinflamatorio) en la inhibición del edema plantar empleando la misma dosis. En cambio, en el modelo de edema auricular (1 mg por oreja) el ácido sphaerálcico fue más activo que la tomentina y los fármacos antiinflamatorios (indometacina y naproxeno) presentó un efecto dosis dependiente con una DE₅₀ = 0.54 mg/oreja (Pérez-Hernández *et al.*, 2014).

Con base en su estructura química y ruta de biosíntesis, la escopoletina, tomentina y el ácido sphaerálcico se encuentran clasificados en el grupo químico de los compuestos fenólicos, los dos primeros son una cumarina y el tercero un derivado

naftoico, diversos compuestos de estos han sido mencionados con actividad antiinflamatoria (Figura 2).

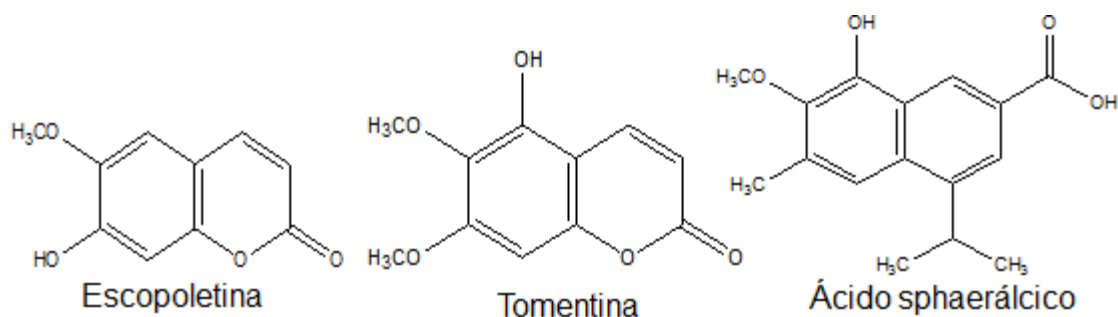


Figura 2. Estructuras químicas de los compuestos con actividad antiinflamatoria aislados del cultivo de células en suspensión de la especie *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don

El extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de cultivos celulares de *S. angustifolia*, en el modelo de artritis experimental a dosis de 100 mg/kg, al día 9 de tratamiento, inhibió el edema articular; además, mostró un efecto inmunomodulador al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y FNT- α) e incrementando los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

La administración del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH no modificó el efecto inducido por Caolin/Carragenina, sobre el tamaño del bazo, éste es estadísticamente similar al de los del grupo control negativo. No obstante, los niveles de citocinas en este órgano se modularon favorablemente, al disminuir la concentración de las citocinas proinflamatorias FNT- α e IL-1 β e incrementar los niveles de las antiinflamatorias; la IL-10 y la IL-4 alcanzaron niveles estadísticamente superiores a los del grupo (ratones sanos) control de daño (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

Al extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ de cultivos celulares reducido en nitratos de *S. angustifolia* se le realizó un estudio de toxicidad aguda por clases, midiendo los parámetros conductuales con base a la prueba de Irwin, el extracto fue seguro hasta la dosis de 2.00 g/kg al no inducir efectos tóxicos ni causar la muerte (Serrano-Román, 2015).

II.5 Actividad antiartrítica de la escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico

La actividad antiartrítica de la escopoletina fue evaluada en un modelo de artritis en ratas inducida con el ACF. Los resultados revelan que las ratas tratadas con la escopoletina aumentaron de peso y el índice de inflamación articular disminuyó de manera dosis-dependiente. Las ratas tratadas con dosis altas de escopoletina (100 mg/kg), mostraron una arquitectura histológica casi normal en las articulaciones y redujeron la formación de los vasos sanguíneos en el tejido sinovial. Además, la escopoletina fue capaz de regular la sobreproducción de importantes inductores angiogénicos endógenos como la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), el Factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), IL-6 en el tejido sinovial en las ratas con artritis inducida (Pan *et al.*, 2010).

Tomentina y ácido sphaerálcico también se evaluaron en un modelo de artritis experimental administrando intrarticularmente caolín/ λ -carragenina, el efecto antiinflamatorio de la administración oral de ambos compuestos resultó dosis-dependiente tomentina ($\text{DE}_{50}=10.32$ mg/kg/día; Nicasio-Torres *et al.*, 2017) y ácido sphaerálcico ($\text{DE}_{50}=7.8$ mg/Kg/día); enfatizando que en el último día del ensayo (día 9) con la dosis de 20 mg/Kg/día de ácido sphaerálcico revirtió totalmente el edema.

Los ratones tratados con tomentina y ácido sphaerálcico recuperan el peso perdido a causa del daño generado con caolín/ λ -carragenina. Además, la administración oral de los compuestos evita el desarrollo de una esplenomegalia en el bazo causada por la administración de caolín/ λ -carragenina (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017). En este mismo modelo, la administración oral de ácido sphaerálcico y/o tomentina mostró un efecto inmunomodulador sobre los niveles de las citocinas, en las articulaciones y en el bazo de ratones, sobre los niveles de las citocinas proinflamatorias (FNT- α e IL-1 β) y los niveles de las antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) (Serrano-Román, 2015; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

II.6 Farmacocinética

La farmacocinética es la rama de la farmacología que se ocupa del estudio de los procesos que determinan la concentración de un fármaco en el organismo (Aguilera, 2008; Moltó-Marhuenda, 2008). La farmacocinética se define como el estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo o eliminación del fármaco (ADME). La farmacocinética se basa en el estudio matemático de los procesos que permiten cuantificar y definir las velocidades de absorción (constante de absorción), su cantidad (biodisponibilidad), la eliminación (constante de eliminación, vida media, aclaramiento), el volumen en que se distribuye el fármaco (volumen de distribución) o la cantidad total de fármaco (Área bajo la curva) presente en el organismo (Moltó-Marhuenda, 2008). El estudio proporciona datos de dosis y periodicidad de la administración de los fármacos para alcanzar en los sitios blancos, la concentración adecuada para un efecto farmacológico determinado (Hinderliter & Saghir, 2014).

II.6.1 Absorción

La absorción es el proceso mediante el cual un fármaco se desplaza desde su sitio de aplicación al torrente sanguíneo. Este proceso se presenta en todas las formas de administración de los fármacos. Cuando un fármaco se administra vía oral para llegar a la sangre debe absorberse desde el tracto gastrointestinal. En la administración intravenosa, el fármaco se administra directamente en la sangre y por lo tanto esta vía tiene varias propiedades farmacocinéticas especiales (Philip-Rowe, 2012).

Aplicación tópica: el fármaco se aplica directamente al sitio de acción previsto y la absorción en el torrente sanguíneo es innecesaria. Sin embargo, también es importante recordar que, si bien la absorción no puede ser premeditada, en muchos casos se presenta y el fármaco puede tener efectos en todo el cuerpo (Philip-Rowe, 2012).

Se podría pensar que no se requiere la etapa de absorción cuando un fármaco es administrado por inyección intramuscular o subcutánea debido a que el fármaco se ha depositado en el cuerpo, debe considerarse la etapa de absorción desde el músculo o debajo de la piel a la sangre (Philip-Rowe, 2012).

La absorción de un fármaco se lleva a cabo a través de las membranas biológicas (Figura 3). El mecanismo más común es la difusión pasiva, para que este proceso se produzca de manera eficiente el fármaco requiere solubilidad acuosa y lipídica. Otra forma de absorción es la difusión facilitada o transporte activo, a través de una proteína transportadora que se une a la molécula del fármaco y lo transporta a través de la membrana. En ambos tipos de difusión, se requiere un gradiente de

concentración para su transferencia. Por el contrario a la difusión pasiva, el transporte activo requiere energía para bombear el fármaco en una dirección definida. Las moléculas transportadoras que realizan la difusión facilitada son muy selectivas, sólo se unirán y transportarán grupos de moléculas bien definidos (Philip-Rowe, 2012).

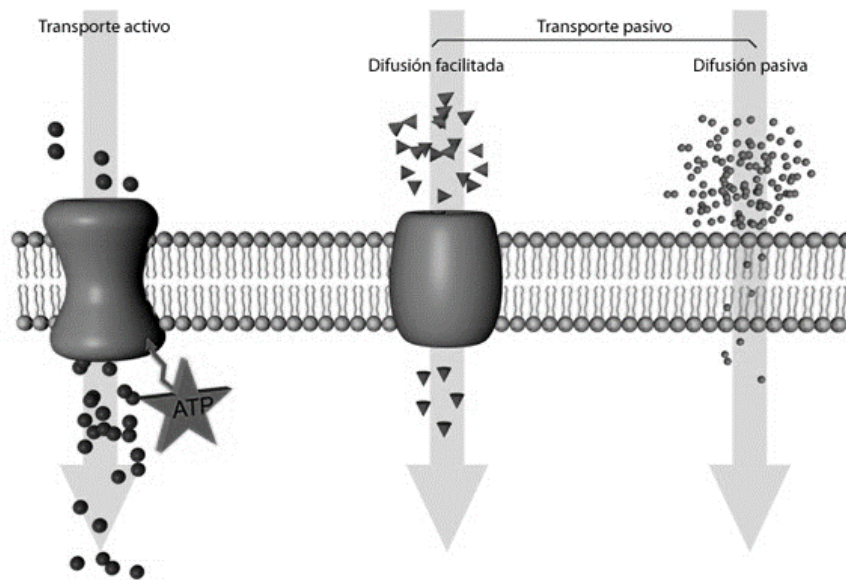


Figura 3. Tipos de transporte celular (<http://refuerzabiologia.blogspot.mx>)

Cuando un fármaco liposoluble entra en la célula epitelial por difusión pasiva, la glicoproteína-P del revestimiento epitelial se une al fármaco y lo expulsa de nuevo al contenido del intestino, inhibiendo así su absorción. De esta manera, las moléculas liposolubles que se esperaba que fueran fácilmente absorbidas, podrían ser tomadas de manera mucho menos eficiente (Philip-Rowe, 2012).

II.6.2 La distribución

La distribución se refiere al movimiento del fármaco entre la sangre y los diversos tejidos del cuerpo (Figura 4). Se asume que la transferencia de un fármaco de un

tejido a otro se produce exclusivamente a través de la sangre; por lo tanto, si el fármaco se transfiere del músculo al hígado, lo hará pasando del músculo al torrente sanguíneo, la sangre viaja al hígado y descarga el fármaco en ese órgano. En ocasiones hay excepciones, por ejemplo, los fármacos lipídicos administrados vía oral pueden ser absorbidos directamente en el sistema linfático (Philip-Rowe, 2012).

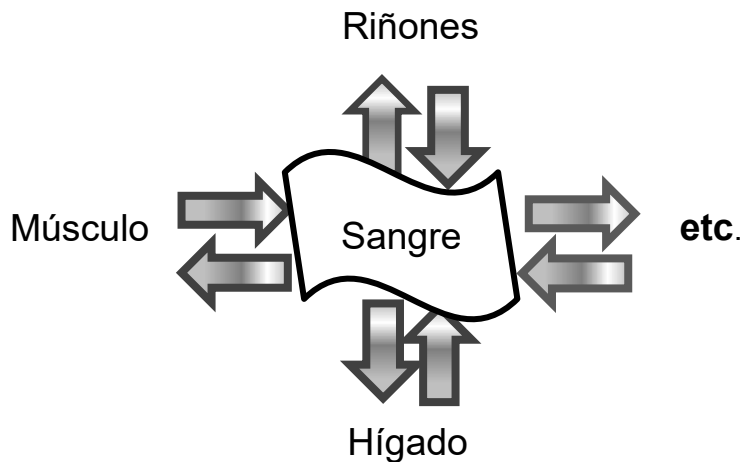


Figura 4. Proceso de distribución de un fármaco (modificado de Philip-Rowe, 2012)

II.6.3 La eliminación

Es el término general referente a la eliminación del fármaco del cuerpo por cualquier de los dos mecanismo excreción y/o metabolismo (Philip-Rowe, 2012). **Excreción:**

Es la simple eliminación de la molécula intacta del fármaco del cuerpo.

Metabolismo: Es el proceso por el cual el fármaco es modificado químicamente y los metabolitos generados se eliminan en la orina o en la bilis.

II.6.3.1 La eliminación renal y biliar

La eliminación de un compuesto es una de las fases más importantes de los análisis farmacocinéticos, define el comportamiento de la concentración de compuestos activos en el plasma con respecto al tiempo (Haberer, 2016). El poder identificar los compuestos activos ya sea en heces u orina ayuda a saber cómo estos se absorben y cuál es su vía de eliminación preferente.

La mayor parte de la excreción de los fármacos se lleva a cabo mediante excreción renal. Aproximadamente un quinto del plasma que llega a los glomérulos es filtrado a través de los poros del endotelio glomerular, casi toda el agua y gran parte de los electrolitos son reabsorbidos de forma pasiva y activa hacia el torrente circulatorio en los túbulos renales. Sin embargo, los compuestos polares, entre los que se encuentran la mayoría de los metabolitos de los fármacos, no pueden difundir de nuevo hacia la sangre y son excretados, a no ser que existan mecanismos específicos de transporte para su absorción (Aleixandre & Puerro, 2010).

El manejo renal de los fármacos se rige por los principios del paso transmembrana. Los que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas permanecen en el torrente circulatorio; el filtrado glomerular sólo contiene fármaco libre. Las formas no ionizadas de los fármacos y de sus metabolitos tienden a ser reabsorbidas con facilidad a partir de los líquidos tubulares. La cantidad final de la mezcla de cumarinas excretadas en la orina es el resultado de la filtración glomerular y la secreción tubular, menos reabsorción tubular (Aleixandre & Puerro, 2010).

El cuerpo elimina los fármacos a través de las heces de tres maneras diferentes: la primera es a través de la excreción biliar relacionada con los procesos de biotransformación de sustancias y productos de biotransformación (Flórez-Beledo *et al.*, 2013); La segunda modalidad de eliminación fecal es a través de la circulación enterohepática. En este proceso, durante el tránsito intestinal el compuesto se absorbe pasivamente en el intestino, a favor de un gradiente de concentración. De esta manera, el compuesto activo puede detectarse en el torrente sanguíneo y eventualmente transportarse al hígado, en principio mediante circulación sistémica o un proceso de circulación hepática completo. De esta manera, la disposición final del compuesto es mediante la eliminación activa en la luz intestinal a través de la bilis o el epitelio intestinal. La diferencia de tiempo entre el proceso de absorción intestinal y la disposición final corresponde al tiempo de residencia, que retrasa la caída de las concentraciones plasmáticas y prolonga la duración del efecto. La tercera forma es a través de la excreción intestinal, el compuesto pasa directamente a través del tracto gastrointestinal y sin ninguna alteración se eliminaría en las heces (Flórez-Beledo *et al.*, 2013).

II.6.4 Modelos compartimentales

La naturaleza y evolución en el tiempo del efecto de un fármaco son procesos complejos, útiles para identificar los factores que caracterizan el comportamiento del fármaco. Se necesita la representación mediante modelos (basadas en ecuaciones que contienen variables y parámetros) que permiten describir cómo se distribuye un compuesto en un compartimiento (Aguilera, 2008; Philip-Rowe, 2012).

II.6.5 Modelo monocompartimental

Es el modelo más sencillo, tras la administración, el fármaco se comporta como si se “disolviera” en un compartimento único (Figura 5), donde el organismo representa una sola unidad homogénea (Aguilera, 2008; Philip-Rowe, 2012; Hinderliter & Saghir, 2014). Este modelo es particularmente importante para el análisis de la concentración de sustancias en la sangre, plasma o suero. Al asumir que el organismo se comporta como un compartimento, no significa necesariamente que en todos los tejidos se alcanza la misma concentración a un tiempo. Sin embargo, el modelo monocompartimental define que cualquier cambio que ocurre en la concentración plasmática refleja cambios en los niveles del fármaco en los tejidos (Philip-Rowe, 2012; Hinderliter & Saghir, 2014).

Para utilizar un modelo monocompartimental es necesario que la eliminación del fármaco del organismo ocurra en una modalidad de primer orden, esto es, la constante de la velocidad de eliminación del fármaco en cualquier momento es proporcional a la cantidad del fármaco en el organismo. La constante de proporcionalidad entre la tasa de eliminación y la cantidad del fármaco es una constante de velocidad de eliminación de primer orden la cual tiene unidades del inverso de la unidad de tiempo (min^{-1} , hr^{-1}) (Hinderliter & Saghir, 2014).



Figura 5. Representación del modelo monocompartimental

El organismo obviamente no es homogéneo a pesar de que la concentración plasmática y la excreción urinaria represente a un modelo monocompartimental. La concentración de fármaco difiere en hígado, riñón, corazón, pulmón, articulaciones y cerebro, entre otros tejidos, respecto a la plasmática. La fijación de la sustancia activa a los diferentes tejidos es independiente de la concentración del fármaco, entonces la proporción de la concentración de la droga en los diferentes tejidos y la concentración en el fluido es constante (Gibaldi y Terrier, 1982).

II.6.6 Modelo bicompartimental

Los compartimientos en este modelo se denominan central y periférico (Figura 6). El compartimiento plasmático representa al central y el sitio blanco del efecto farmacológico corresponde al compartimiento periférico (Philip-Rowe, 2012; Hinderliter & Saghir, 2014). El compartimiento central es aquél en el que se coloca el fármaco y del que se toman las muestras para análisis. El compartimiento periférico es el que no tiene comunicación con el exterior e intercambia fármaco con el central. El modelo bicompartimental permite estimar los volúmenes del compartimiento central, el del compartimiento periférico y el volumen de distribución en estado estacionario. Además se puede calcular, otros volúmenes de distribución, definibles matemáticamente y de escasa utilidad práctica. Si un compuesto se administra por vía oral o vía intramuscular, la cinética bicompartimental solamente puede observarse si la constante de absorción es mayor en el compartimiento central ($k_a > \alpha$), de lo contrario, la fase α no llega a observarse, que es la duración de acción (Philip-Rowe, 2012).

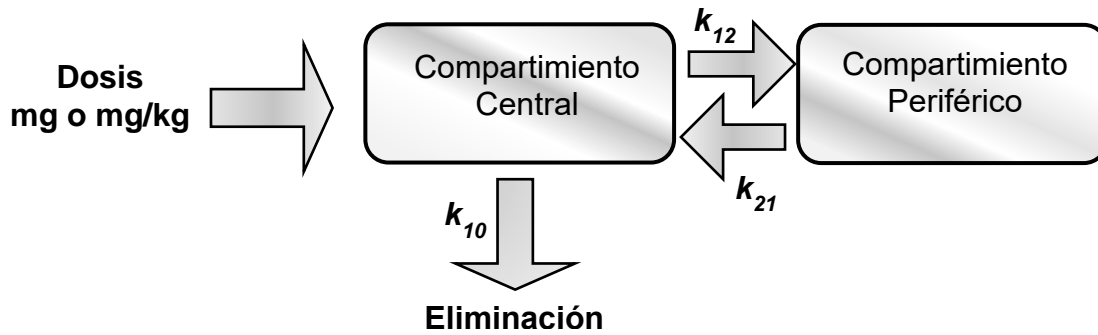


Figura 6. Representación del modelo bicompartmental

II.6.7 Estudios farmacocinético de productos naturales

En la actualidad se han realizado estudios farmacocinéticos de extractos, fracciones y fitomedicamentos estandarizados en sus compuestos activos. Los extractos estandarizados en la terapia con fitomedicamentos son mezclas de compuestos, en el que se presentan por arriba de los 300 componentes, por lo que las concentraciones de un solo compuesto en los productos finales se encuentran en niveles muy por debajo de los μg por dosis, resultando en concentraciones plasmáticas en el orden de los μg hasta de pg por litro (Atul-Bhattaram *et al.*, 2002).

Por ello, la farmacocinética de multicomponentes se establece como un reto. Tales estudios son complicados por la baja concentración de los compuestos y por la diversidad de estructuras químicas, esto último resulta en diferentes propiedades químicas y perfiles farmacocinéticos entre los propios componentes. Respecto a la variación del contenido resulta en una diversidad en la dosificación de componentes (Liu *et al.*, 2009).

De tal forma que las metas en los estudios farmacocinéticos de un fitomedicamento son: 1). Medición sistémica a la exposición que deriva de la administración de éstos;

2). Identificación factible de los marcadores farmacocinéticos, indicativos de la exposición al fitomedicamento; 3). Farmacocinética comparativa de los componentes del fitomedicamento; 4). Dilucidar las vías metabólicas que transforman los fitofármacos después de la exposición sistémica al fitomedicamento; 5). Análisis de la relación estructura-farmacocinética para los fitofármacos y los productos de la metabolización (Liu *et al.*, 2009).

Una característica que se debe destacar de la diversidad de la composición del fitomedicamento, es que varios de los componentes pueden estar relacionados estructuralmente y éstos se pueden clasificar. Siendo el análisis cuantitativo de la relación de la estructura y el comportamiento farmacocinético de los fitofármacos, lo que permitirá determinar las propiedades del grupo químico al que pertenece dicho fitofármaco y predecir con ello el comportamiento de compuestos homólogos (Lu *et al.*, 2008).

Cuando los fitofármacos o los productos de su metabolización son detectables en plasma o en orina, pueden ser utilizados para determinar el comportamiento de la mezcla de componentes de un fitomedicamento, cuando se realiza la administración de éste. Los componentes que pueden ser monitoreados después de la administración del fitomedicamento se les conocen como marcadores farmacocinéticos (Lu *et al.*, 2008). La identificación de dichos marcadores es muy importante para el diseño de la forma farmacéutica del mismo, además de los ensayos clínicos, así como para definir las interacciones entre los fitofármacos y otras sustancias que pudieran ser de origen sintético (Lu *et al.*, 2008).

III. Justificación

La artritis reumatoide es un cuadro fisiopatológico complejo multifactorial, que en conjunto favorecen la progresión de la enfermedad provocando la destrucción del tejido sinovial, cartílago y hueso, provocando un estado de incapacidad de los individuos. El desequilibrio funcional de diferentes mediadores químicos como los antioxidantes, las citocinas, y adenosinas, son clave en el progreso de la inflamación crónica. Los tratamientos generales e incluso los ya especializados para bloquear células o citocinas proinflamatorias, presentan limitaciones respecto a la mejoría y el retardo en el daño articular, en algunos casos el tratamiento podría comprometer al paciente por inmunosupresión y otros efectos tóxicos a largo plazo. Por ello, es necesario contar con alternativas de tratamiento para artritis reumatoide.

El cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia* bajo condiciones de estrés nutricional produce los compuestos antiartríticos e inmunomoduladores escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico. Abordar el estudio farmacocinético sobre la absorción y eliminación de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, contenidos en una fracción activa (fracción SaTES) estandarizada proveniente del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de suspensiones celulares de *S. angustifolia*, es una alternativa factible para generar las bases en el diseño de un fitomedicamento de administración oral para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide.

IV. Pregunta de Investigación

¿Los parámetros farmacocinéticos de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico biodisponibles en plasma de ratón, explicarán el efecto antiartrítico de la administración oral de una sola dosis de la fracción SaTES estandarizada?

V. Hipótesis

Los compuestos antiartríticos (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) administrados vía oral en la fracción SaTES estandarizada, estarán biodisponibles en el ratón alcanzando concentraciones plasmáticas que expliquen el efecto farmacológico.

VI. Objetivos

VI.1 Objetivo general

Analizar la biodisponibilidad plasmática de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico presentes en la fracción SaTES estandarizada de *S. angustifolia* administrada por vía oral en ratones ICR y hacer el análisis farmacocinético de los compuestos activos.

VI.2 Objetivos específicos

1. Validar los métodos analíticos por CLAR para la cuantificación de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.
2. Obtener una fracción activa (SaTES) estandarizada en el contenido de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.

3. Establecer los parámetros farmacocinéticos de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico determinados en plasma, posterior a la administración única vía oral y/o intravenosa de la fracción SaTES estandarizada.
4. Determinar los parámetros farmacocinéticos de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico en los productos de excreción (heces y orina), posterior a la administración de una sola dosis vía oral de la fracción SaTES estandarizada.

VII. Materiales y Métodos

VII.1. Material vegetal

VII.1.1 Cultivo de células en suspensión de *S. angustifolia*

Los cultivos de células en suspensión provienen de explantes de hoja de *S. angustifolia* inducidos a callo (Nicasio-Torres *et al.*, 2016). Se emplearon cultivos de células en suspensión tipo lote de *S. angustifolia* utilizando un inóculo del 5 % en medio MS líquido con 27.4 mmol de nitratos totales (NH_4NO_3 15.9 mmol y KNO_3 11.5 mmol), complementado con 30 g/L de sacarosa, 1.0 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 0.1 mg/L de cinetina (CN) a pH 5.7. Los cultivos se incubaron a $26\pm 2^\circ\text{C}$ en un agitador orbital a 110 rpm (New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA), bajo fotoperiodo de 16 h luz (intensidad luminosa de $32 \mu\text{mol}/\text{seg}.\text{m}^2$) por 8 h de oscuridad. Las suspensiones celulares se cambiaron a medio fresco en condiciones de esterilidad cada 16 días utilizando el mismo inóculo (Murashige & Skoog, 1962; Pérez-Hernández *et al.*, 2014).

VII.1.2 Inducción y producción de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico

Los cultivos celulares de *S. angustifolia* se transfieren usando un inóculo del 5 %, a matraces de 1 L con 500 mL de medio MS, con el contenido de nitrato reducido a 2.74 mmoles de nitratos totales y complementado con 30 g/L de sacarosa, 1.0 mg/L de ANA y 0.1 mg/L de CN a pH 5.7. A los 16 días de incubación, se detuvo el desarrollo de los cultivos y las suspensiones celulares se filtraron al vacío en un embudo Büchner (papel Whatman No. 1, 10 cm de diámetro) y se recuperaron las biomásas celulares para su extracción y obtención de la fracción enriquecida en los compuestos escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres *et al.*, 2016; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

VII.1.3 Extracción y obtención de suspensiones celulares

Las biomásas secas (100 g) fueron extraídas por maceración a temperatura ambiente con una mezcla de CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) en una proporción 1:20 (p/v), repitiendo el proceso de extracción 3 veces cada 24 h. Los extractos se filtraron, reunieron y concentraron a sequedad a presión reducida en un rotaevaporador (Büchi R-124), y se determinó el rendimiento de extracción. (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres *et al.*, 2016; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

El extracto de CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) se disolvió en metanol y analizó por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice, utilizando el sistema de elución CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1), el revelador específico para compuestos fenólicos productos naturales-polietilenglicol (NP/PEG) y se observaron a la lámpara de UV en la longitud de onda larga (365 nm).

VII.2 Preparación de la fracción activa SaTES

El extracto de CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) se disolvió en columna abierta de gel de sílice (9x28 cm, 70-230 mesh, Merck) utilizando un sistema de gradientes con hexano: acetato de etilo: metanol (Cuadro 1) con incrementos en la polaridad del 5-10 % (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres *et al.*, 2017).

Se colectaron alícuotas de 500 mL con cada sistema y se concentraron a sequedad a presión reducida en un evaporador rotatorio. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) en placas con gel de sílice y se observaron con una lámpara UV a $\lambda=365$ nm y finalmente se aplicó el revelador NP/PEG; las fracciones en las que se identificaron los compuestos escopoletina, tomentina (Sistema 50:50) y ácido sphaerálcico (sistema 60:40) con base al frente de referencia (rf) y fluorescencia emitida se reunieron para conformar la **fracción SaTES**. Esta fracción (1mg/mL) se disolvió en metanol de alta pureza para su análisis por CLAR y se estandarizó con base al contenido de la mezcla de las cumarinas (escopoletina y tomentina) y ácido sphaerálcico.

Este procedimiento se realizó varias veces hasta que se obtuvo la cantidad necesaria de tomentina, ácido sphaerálcico y fracción SaTES para realizar la validación del método analítico y los experimentos farmacocinéticos.

Cuadro 1. Condiciones de fraccionamiento en columna del extracto de CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) de biomásas celulares de *S. angustifolia*.

Sistema de elución	Proporción
Hexano	100
Hexano: acetato de etilo	95:5
Hexano: acetato de etilo	90:10
Hexano: acetato de etilo	80:20
Hexano: acetato de etilo	70:30
Hexano: acetato de etilo	60:40
Hexano: acetato de etilo	50:50
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:10
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:25
Hexano: acetato de etilo: metanol	50:50:50
Metanol	100

VII.3 Purificación de tomentina y ácido sphaerálcico

Paralelamente y de manera independiente, la purificación de tomentina y ácido sphaerálcico se realizó, a partir de las fracciones ricas en tomentina (50:50) o ácido sphaerálcico (60:40) a través de una columna abierta de gel de sílice RP-18 (1,5 x 28 cm, 40 -63 malla; Merck) con un sistema de elución H₂O:CH₃CN (solventes de alta pureza; Merck) con una polaridad creciente del 10% (Cuadro 2). Se obtuvieron alícuotas de 20 mL, tomentina se aisló a partir de la subfracción 80:20-H₂O:CH₃CN y ácido sphaerálcico a partir de la subfracción 50:50-H₂O:CH₃CN. Los compuestos se analizaron por CLAR y su pureza se confirmó comparando sus tiempos de retención y los espectros de absorción (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres *et al.*,

2017). Este procedimiento se realizó varias veces hasta que se obtuvo la cantidad suficiente de tomentina y ácido sphaerálcico.

Cuadro 2. Condiciones de separación cromatográfica en columna para la obtención de la fracción SaTES, escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.

Sistema de elución	Proporción
Agua	100
Agua: acetonitrilo	90:10
Agua: acetonitrilo	80:20
Agua: acetonitrilo	70:30
Agua: acetonitrilo	60:40
Agua: acetonitrilo	50:50
Agua: acetonitrilo: metanol	50:50:10
Metanol	100

VII.4 Condiciones de análisis de CLAR

Los análisis de CLAR se llevaron a cabo en un equipo Waters (módulo de separación 2695) acoplado a un detector de matriz de diodos (2996) con un rango de detección de 190-600 nm y operado por el sistema de software Manager Millennium (Empower 1; Waters Corporation, México). Las separaciones se realizaron en una columna Spherisorb-ODS RP-18 (250 x 4.6 mm, 5 µm, Waters Corporation, México) empleando una temperatura constante de 25 °C durante los análisis. Las muestras (20 µL) se eluyeron con un flujo de 1.0 mL/min y un gradiente de fases móviles de (A) H₂O de alta pureza con ácido trifluoroacético al 0.5% v/v (TFA, Sigma-Aldrich, México) y (B) CH₃CN de alta pureza.

La fase móvil se inició con 100% de A y se mantuvo durante 1 min, en seguida, el disolvente B se incorporó gradualmente al 5% (a los 2 min), al 30 % (a los 4 min) y al 50 % (a los 16 min). Durante los siguientes 4 min, el solvente B se incrementó al 100 %, y esta proporción se mantuvo durante 2 min. Finalmente, los siguientes 3 min se utilizaron para devolver la fase móvil a la condición inicial. El método cromatográfico tuvo un tiempo de ejecución de 25 min (Cuadro 3). Los compuestos se detectaron registrando la absorbancia a $\lambda=343$ nm para tomentina y escopoletina y a $\lambda=357$ nm para ácido sphaerálcico, mediante la comparación de sus tiempos de retención (tomentina-11.288 min, escopoletina-11.349 min, mezcla de cumarinas-11.457 min, y ácido sphaerálcico-23.319 min) y espectros de absorbancia (Pérez-Hernández *et al.*, 2014)

Cuadro 3. Sistema de elución para análisis por CLAR de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico.

Tiempo (min)	A Agua acidulada (TFA al 0.5 %)	B Acetonitrilo 100 %
0	100	0
1	100	0
2	95	5
3	95	5
4	70	30
15	70	30
16	50	50
18	50	50
19	20	80
20	0	100
21	0	100
22	100	0
25	100	0

VII.5 Curvas de calibración por CLAR de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico

Se realizaron curvas de calibración con los estándares de escopoletina (99% de pureza, Sigma-Aldrich, México), tomentina (98% de pureza), ácido sphaerálcico (99% de pureza) utilizando el sistema de CLAR a partir de soluciones de 1.0 mg/mL en metanol de alta pureza (Merck, México). Se realizaron diluciones en serie a concentraciones de 1.25-20 µg/mL para escopoletina, 0.625-20 µg/mL para tomentina y 2.5-40 µg/mL para ácido sphaerálcico. Cada curva de calibración se construyó trazando la relación del área de pico del compuesto (y) versus a las concentraciones de analito (x) y se ajustaron usando un modelo de cuadrados lineales $(y) = m(x) + b$ usando el software Microsoft Office Excel 2010 con valores de correlación de ≥ 0.9995 .

VII.6 Animales

Se usaron 160 ratones hembra ICR con un peso de 30-35 g (Envigo, Ciudad de México) y se mantuvieron en grupos de 10 animales por jaula en condiciones de bioterio a 25 °C, con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad, con agua y alimento (compactado virutas *Harlan rodent lab diet*) acceso libre. El tiempo de adaptación a las condiciones de laboratorio antes de los experimentos fue de 3 semanas. Todos los estudios son realizados observando la normatividad establecida en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y uso de Animales de Laboratorio). El uso ético de los animales fue aprobado a través del Comité Local de Investigación y Ética en investigación en

Salud (CLIES 1702) del Instituto Mexicano del Seguro Social, que asignó el número de registro R-2016-1702-10 al protocolo.

VII.6.1 Obtención de plasma de ratón

Los ratones se anestesiaron previamente con pentobarbital sódico (PiSA Agropecuaria), enseguida se obtuvo sangre del seno retro orbital usando capilares heparinizados y se distribuyó en tubos heparinizados, los cuales se centrifugaron a 3500 g durante 7 min. El plasma obtenido se almacenó a -4 °C hasta su uso.

VII.7 Soluciones stock de estándares y de patrón interno para perfil cromatográfico

Las soluciones stock de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico se prepararon a una concentración nominal de 1 mg/mL de metanol de alta pureza (Merck, México), a partir de estas soluciones stock a través de diluciones seriadas se obtuvieron diferentes concentraciones de cada compuesto. El patrón interno dopamina se preparó a una concentración nominal de 2 mg/mL de metanol de alta pureza, el cual se añadió (5 μ L) a las diferentes soluciones de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico con una concentración final y constante de 10 μ g/mL de dopamina.

VII.8 Curvas de concentración de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasma

Se prepararon muestras de plasma a partir de la adición de un volumen determinado de las soluciones stock de cada analito. Se realizó el proceso de extracción a partir de las concentraciones determinadas por análisis de CLAR, se construyeron curvas

de concentración en un rango de 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ para tomentina, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ para escopoletina y 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ para ácido sphaerálcico. Cada determinación se comparó con un doble blanco muestras con y sin patrón interno.

VII.9 Extracción de los compuestos activos en plasma

Las muestras de plasma se extrajeron con CH_3CN : TFA al 20% (1:1); posteriormente, los viales se mezclaron 30 segundos y se centrifugaron a 14,000 g durante 10 min, el sobrenadante se transfirió a otro vial y se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió con 1 mL de metanol de alta pureza (Merk, México) y se filtró a través de una membrana de Teflón (13 mm, 0.45 μm , Life Science). Cada muestra filtrada en el equipo se inyectó en el equipo de CLAR y las concentraciones de tomentina y escopoletina a $\lambda = 343 \text{ nm}$, y de ácido sphaerálcico a $\lambda=357 \text{ nm}$ se determinaron con base en las curvas de calibración pre-construidas con los estándares.

VII.10 Eficiencia de la extracción (Recuperación)

La eficiencia de extracción de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico se determinó mediante el análisis de una serie de repeticiones ($n = 5$) de muestras de 0.625-20 $\mu\text{g/mL}$ para tomentina, de 1.25-20 $\mu\text{g/mL}$ para escopoletina y de 2.5-40 $\mu\text{g/mL}$ para ácido sphaerálcico en plasma de ratón. La recuperación se calculó comparando las áreas de los picos de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en solución (blanco) y áreas de cada analito extraído en plasma.

VII.11 Validación de los métodos analíticos

La validación de los métodos analíticos se realizó de acuerdo a los lineamientos de la Food and Drug Administration (FDA, 2015).

VII.11.1 Linealidad y sensibilidad

Para determinar la linealidad de las curvas de concentración de los compuestos activos, se realizaron determinaciones en muestras de plasma en 6 días independientes usando muestras recién preparadas. Cada curva de calibración se construyó trazando la relación del área del pico del compuesto (y) contra las concentraciones de analito (x). Las curvas se ajustaron utilizando un modelo lineal de regresión de mínimos cuadrados $(y) = m(x) + b$ utilizando el software Microsoft Office 2010, con valores de correlación lineal de $\geq 0,9995$. La sensibilidad del método analítico se determinó con base en la mínima concentración de cada analito que fue posible detectar.

VII.11.2 Prueba de especificidad

La prueba de especificidad se definió por dos condiciones: 1) la ausencia de interferencia cruzada entre tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico con el patrón interno, utilizando el procedimiento de extracción propuesto y las condiciones de CLAR y 2) que los componentes endógenos del plasma no retuvieran a la tomentina, la escopoletina y el ácido sphaerálcico. Se usaron tres muestras de plasma diferentes como blancos (plasma libre de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico), se extrajeron y se analizaron por CLAR con y sin patrón interno para u

VII.11.3 Prueba de exactitud y precisión

La exactitud intra- e inter-ensayo se expresó como el porcentaje de diferencia entre la concentración medida y la concentración nominal. La precisión y la exactitud intra-ensayo se calcularon usando determinaciones repetidas (n= 6) para cada concentración de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico que se añadieron a las muestras de plasma durante una sola serie analítica. La precisión y la exactitud inter-ensayo se calcularon usando determinaciones repetidas (n= 6) para cada concentración de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en 6 días separados. La exactitud se calculó utilizando la siguiente ecuación: $\%Bias = (Cobs - Cnom) / Cnom \times 100$. La precisión se calculó a partir de las concentraciones observadas de la siguiente manera: $\%RSD = Desviación\ estándar (SD / Cobs) \times 100$. Los valores de exactitud (Bias) y precisión (RSD) estuvieron dentro del $\pm 15\%$, cubriendo un rango de concentraciones experimentales reales que se consideraron aceptables.

VII.11.4 Estudio de estabilidad

La estabilidad de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasma de ratón se evaluó mediante el análisis de las réplicas (n = 5) de las muestras de control de calidad en tres concentraciones diferentes (2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$), que incluye las condiciones de manipulación esperadas durante todos los periodos de almacenamiento y procesamiento de las muestras, como los procesos de congelación/descongelación, periodos en el automuestreador a temperatura ambiente y estabilidad a largo plazo. Para todos los estudios de estabilidad se evaluaron nuevas muestras de control de calidad, utilizando una curva estándar

recién preparada para las mediciones. Las condiciones analizadas fueron 0, 8 y 24 h a temperatura ambiente, 8 h a 4°C y 30 días a -70 °C. Las concentraciones obtenidas de todos los estudios de estabilidad se compararon con las muestras de control de calidad recientes y se calculó el porcentaje de desviación de la concentración. Tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico se consideraron estables en el plasma de ratón cuando la diferencia de concentración entre las muestras recién preparadas y las muestras de estabilidad eran inferior al 15% de exactitud y estabilidad.

VII.12 Análisis farmacocinético

VII.12.1 Administración oral e intravenosa

Con el fin de evaluar la idoneidad del ensayo para estudios farmacocinéticos, se administró a los ratones 400 mg/kg de la fracción activa SaTES estandarizada en una mezcla de tomentina y escopoletina (17.19 mg/g) y ácido sphaerálcico (86.4 mg/g) vía oral o intravenosa. Para la farmacocinética oral se utilizaron diez animales por tiempo a evaluar: 0, 1.3, 3.3, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120 y 240 min. Para la farmacocinética intravenosa, se utilizaron tres animales en cada tiempo: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 y 60 min. Posteriormente, los animales fueron anestesiados, se obtuvo sangre del seno retro-orbital y se separó el plasma por centrifugación. Las muestras de plasma fueron extractadas con CH₃CN y TFA (p/v) al 20% (1: 1), los extractos se secaron a temperatura ambiente y se disolvieron en metanol de alta pureza (Merck, México) y analizaron por CLAR para la cuantificación de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico.

Los parámetros farmacocinéticos se determinaron utilizando los valores observados. Los datos se procesaron utilizando el programa de complemento PKSolver para Microsoft Excel escrito en Visual Basic para Aplicaciones. Todos los valores obtenidos se expresaron en media \pm desviación estándar (SD). El análisis farmacocinético, se realizó a partir de un modelo de uno o dos compartimentos, empleando el Criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de Schwarz (SC; Ludden *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2010). Con base en estos criterios, se selecciona el modelo farmacocinético que muestra los valores más bajos de AIC o SC, lo que significa que el modelo elegido tiene un mejor ajuste.

VII.12.2. Productos de excreción

Para el análisis farmacocinético de los productos de excreción se utilizaron 2 grupos de 10 animales, los cuales se pusieron en jaulas metabólicas con libre acceso a agua y alimento. Los ratones se administraron oralmente con 400 mg/kg de la fracción activa SaTES estandarizada, y las heces y la orina se recolectaron al comienzo del estudio y después de 4, 8, 12 y 24 h; se registró el peso fecal fresco y el volumen de orina y en seguida las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

Muestras de heces (100 mg) y orina fueron disueltas en 300 μ L de CH₃OH y sonicadas por 10 minutos (Branson ultrasonics 2800 H); posteriormente, a cada muestra se añadió 2 mL de CH₃CN:TFA-20% (1:1), se mezclaron por 5 min (IKA MS1 Minishaker) y dejaron en maceración durante 5 h a temperatura ambiente. Cada muestra extraída fue aclarada a través de papel de filtro (Whatman, 1001-055), los extractos se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se disolvieron en 1

mL de metanol de alta pureza y se filtraron a través de membrana de Teflón (13 mm, 0.45 µm, Life Science) para su análisis por HPLC. Los cálculos farmacocinéticos se realizaron procesando los datos observados utilizando el programa de complemento PKSolver para Microsoft Excel escrito en Visual Basic para Aplicaciones. El análisis farmacocinético, se realizó a partir de un modelo no compartimental.

VIII. Resultados

VIII.1 Validación del método analítico por CLAR

VIII.1.1 Curvas de calibración de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico

La validación del método analítico se realizó con los compuestos puros de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, e identificación de los mismos con base en el tiempo de retención y espectro de absorción (Figura 7).

VIII.1.2 Linealidad y sensibilidad

Los valores de tomentina fueron lineales en un rango de concentración de 0.62-20 µg/mL con una ecuación de regresión $y = 162940 (x) + 1268.2$, $r^2 = 0.9994$, para escopoletina entre 1.25-20 µg/mL y una ecuación de regresión $y = 165407 (x) - 16720$, $r^2 = 0.9993$ y para ácido sphaerálcico en 2.5-40 µg/mL y la siguiente ecuación $y = 7381.9 (x) + 1362.2$ con un $r^2 = 0.9998$ (Figura 8).

Los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) mencionados en el Cuadro 4. Se calcularon mediante las ecuaciones $LOD = 3.3\sigma/s$; $LOQ = 10\sigma/s$ (donde s es la pendiente de la curva de calibración y σ es la desviación estándar (SD) de la pendiente). Los valores de RSD <15 % se consideraron aceptables.

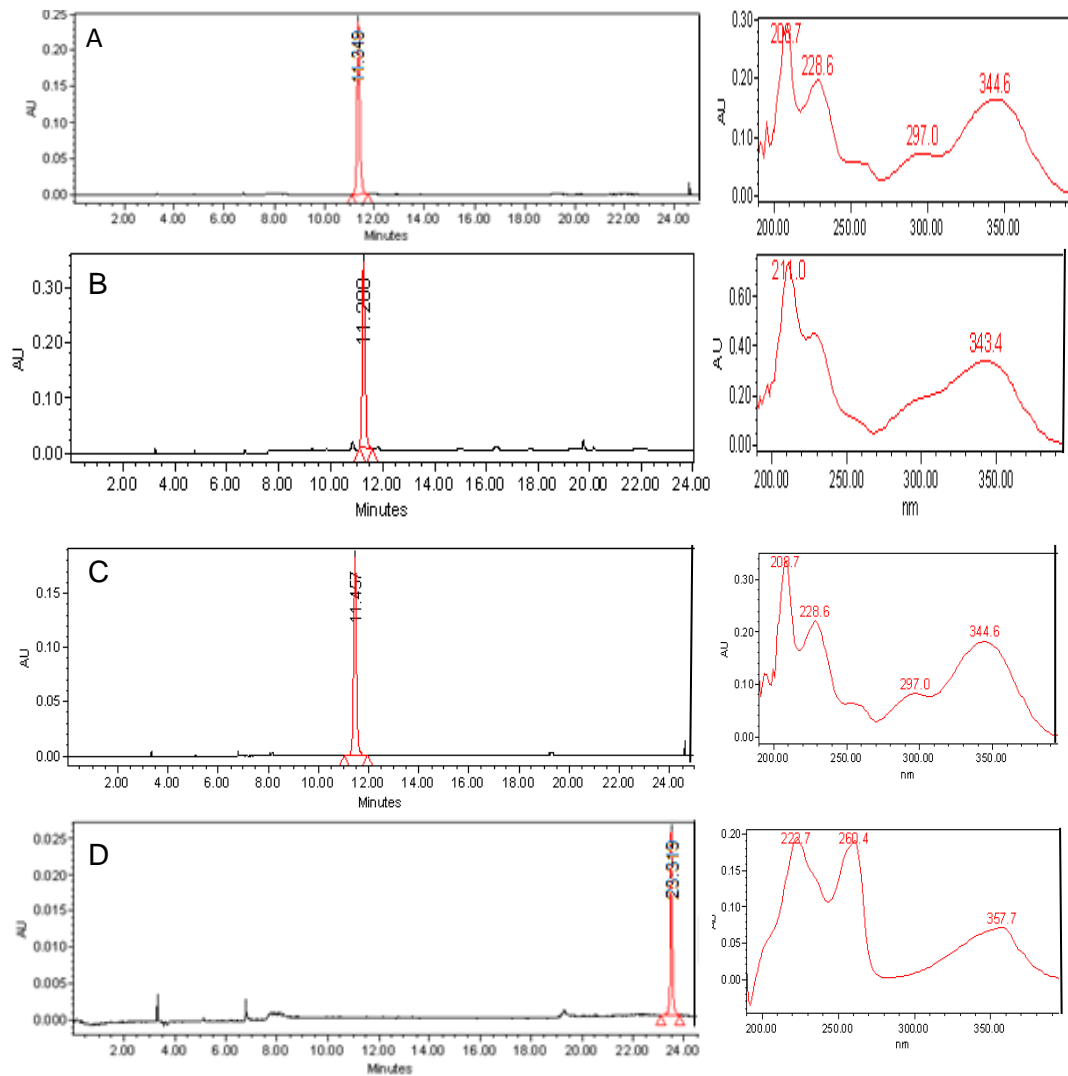


Figura 7. Cromatogramas y espectro de absorción de A) escopoletina $t_r=11.349$ min y $\lambda_{max}= 344.6$ nm (Sigma), B) tomentina $t_r=11.288$ y $\lambda_{max}= 343.4$ nm y D) ácido sphaerálcico $t_r=23.319$ y $\lambda_{max}= 357.7$ nm; aislados de células en suspensión de *S. angustifolia*. C) Mezcla de escopoletina y tomentina $t_r=11.457$ min y $\lambda_{max}= 344.6$ nm a una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ de cada compuesto.

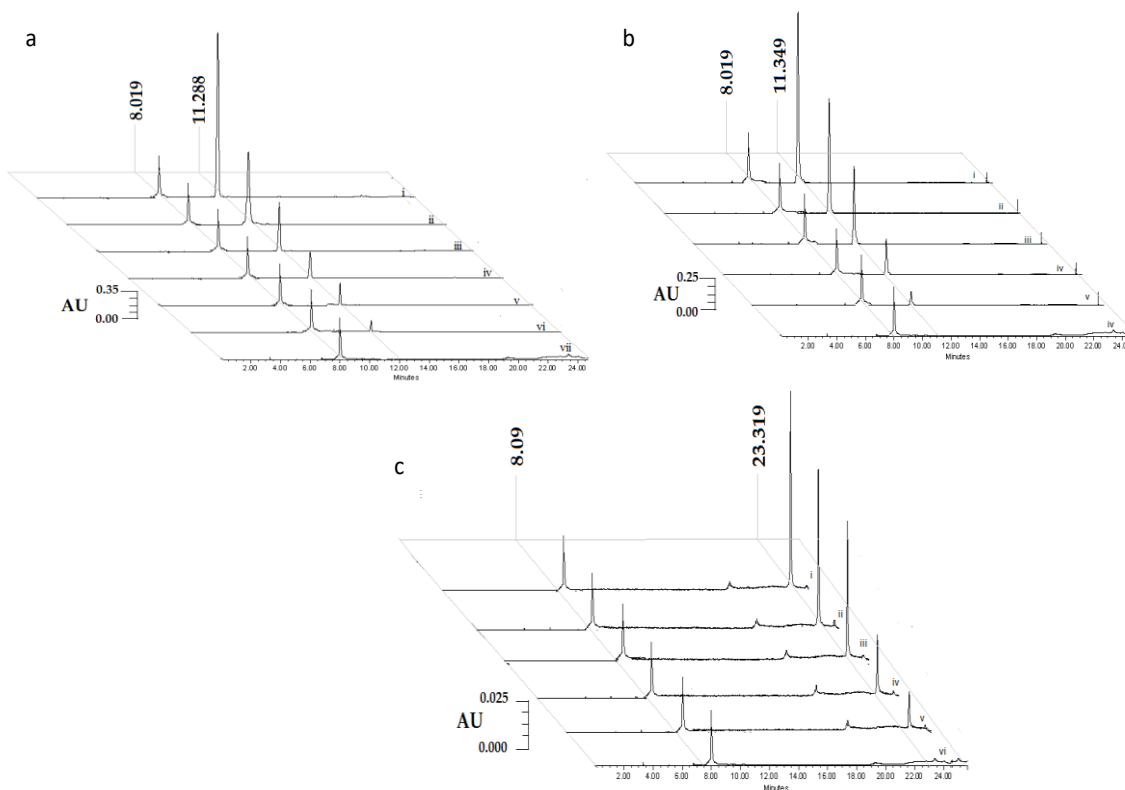


Figura 8. Perfiles cromatográficos de las curvas de concentración de (a) tomentina $tr=11.288$ (20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 $\mu\text{g/mL}$), (b) escopoletina $tr= 11.349$ min (20, 10, 5, 2.5 y 1.25 $\mu\text{g/mL}$) y (c) ácido sphaerálcico $tr= 23.319$ min (40, 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$) con el patrón interno de dopamina ($tr = 8.019$ min).

Cuadro 4. Parámetros de detección y cuantificación de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico

Compuesto	Pendiente de la curva (s)	Desviación estándar (σ)	Límite de detección (LOD)= $3.3\sigma/s$	Límite de cuantificación (LOQ)= $10\sigma/s$
Tomentina	162940	3385.90	0.068	0.207
Escopoletina	165407	6976.26	0.139	0.421
Ácido sphaerálcico	7381.9	133.30	0.059	0.180

Los valores son el promedio de 6 repeticiones

VIII.2 Validación del proceso de extracción de compuestos activos en plasma

Por primera vez, se reporta una técnica de extracción en plasma simultánea e individual para los tres compuestos activos: tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico empleando CH₃CN: TFA (p/v) 20 % (1:1).

VIII.2.1 Eficacia de extracción

La capacidad de recuperación de los activos del plasma con el proceso de extracción establecido fue superior al 96 % con coeficientes de variación inferiores al < 3.09 %, lo cual indica una adecuada capacidad de recuperación de los compuestos activos durante los procesos de extracción (Cuadro 5), parámetros que permitieron establecer los rangos de concentración para la validación del método.

Cuadro 5. Capacidad de recuperación de los compuestos activos extractados en plasma en diferentes días (n=5).

Compuesto	Concentración nominal (µg/mL)	Área del pico del compuesto en solución	Área del pico del compuesto en plasma	Recuperación (%)	Media (%)±SD	RSD (%)
Tomentina	2.5	362298	360010	99.4	99.4±0.40	0.40
		370018	369902	100.0		
		376789	372806	98.9		
		367656	364397	99.1		
		362132	360406	99.5		
	5	846586	811858	95.9	96.3±2.44	2.53
		829876	799616	96.4		
		859980	800692	93.1		
		840096	808335	96.2		
		824215	823877	100.0		
	10	1699392	1568996	92.3	96.7±2.99	3.09
		1679123	1626145	96.8		
		1652019	1650051	99.9		
		1640822	1622143	98.9		
		1680087	1602613	95.4		
		3131575	3109042	99.3		

	20	3279579	3265492	99.6	98.2±1.22	1.24
		3300225	3200110	97.0		
		3198001	3103140	97.0		
		3311856	3248992	98.1		
Escopoletina	2.5	350166	338010	96.5	97.4±2.00	2.06
		365288	348912	95.5		
		358065	342806	95.7		
		355689	354397	99.6		
		354537	352406	99.4		
	5	835755	811858	97.1	99.2±1.26	1.27
		829366	829616	100		
		820465	820662	100		
		828338	828335	100		
		838300	828877	98.9		
	10	1584170	1568996	99.0	97.3±1.92	1.97
		1681460	1626145	96.7		
		1669683	1596451	95.6		
		1699245	1622143	95.5		
		1599539	1592613	99.6		
		3219863	3122042	98.8		
3231392		3165492	98.0			
20	3159439	3089110	98.1	98.1±1.63	1.66	
	3454103	3303140	95.6			
	3194902	3194881	100			
Ácido sphaerálcico	5	38974	38121	97.81	97.4±1.48	1.52
		39033	37286	95.52		
		37454	36048	96.25		
		39049	38557	98.74		
		38391	37926	98.79		
	10	75604	75066	99.3	99.6±0.35	0.35
		74391	74197	99.7		
		74276	74202	99.9		
		75007	74955	99.9		
		74503	73900	99.2		
	20	152030	149335	98.2	99.0±0.80	0.80
		149202	148925	99.8		
		149976	149296	99.5		
		150973	148029	98.0		
		147103	146033	99.3		
	40	289536	287123	99.2	98.8±1.03	1.04
299976		296883	99.0			
299264		298637	99.8			
298727		289892	97.0			
290051		286889	98.9			

VIII.2.2 Especificidad

La comparación de los perfiles cromatográficos del plasma (blanco) con el patrón interno (dopamina) y los de los compuestos extraídos del plasma, indica que no existe interferencia entre los constituyentes del plasma, el patrón interno y los compuestos activos (Figura 8).

Bajo estas condiciones cromatográficas, el número de platos teóricos de la columna para los compuestos activos se encontraban entre 26700 <N> 18760, lo que es aceptable en términos de eficiencia de separación.

VIII.2.3 Precisión y exactitud

Los valores de exactitud $\% \text{ Bias} = (\text{Cobs} - \text{Cnom}) / \text{Cnom} \times 100$ y precisión $\% \text{RSD} = \text{desviación estándar relativa} = (\text{SD} / \text{Cobs}) \times 100$ determinados en los intra- e inter-ensayos (<15) indican que los procesos de extracción y análisis son confiables y reproducibles (Cuadro 6).

Cuadro 6. Parámetros de exactitud y precisión determinados en los análisis intra- e inter- ensayos de tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasma de ratón (matriz).

Compuesto	Prueba	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración medida µg/mL±SD	Exactitud (% Bias)	Precisión (% RDS)
Tomentina	Intra-ensayo	2.5	2.41±0.07	-3.4	2.8
		5	4.94±0.06	-1.2	1.1
		10	9.95±0.13	-0.5	1.3
		20	19.94±0.22	-0.3	1.1
	Inter-ensayo	2.5	2.39±0.09	-4.6	3.6
		5	4.93±0.11	-1.5	2.3
		10	9.96±0.30	-0.4	3.0
		20	19.77±0.19	-1.1	1.0
Escopoletina	Intra-ensayo	2.5	2.33±0.08	-6.6	3.5
		5	5.06±0.06	1.1	1.1
		10	9.98±1.27	-0.2	2.7
		20	19.26±0.25	-3.7	1.3
	Inter-ensayo	2.5	2.20 ± 0.04	-12.0	1.9
		5	5.08 ± 0.05	1.6	0.9
		10	9.78 ± 0.14	-2.2	1.4
		20	19.38 ± 0.45	-3.1	2.3
Ácido sphaerálcico	Intra-ensayo	2.5	2.33±0.17	-6.8	7.2
		5	5.06±0.09	1.3	1.7
		10	9.96±0.12	-0.4	1.2
		20	20.23±1.31	1.2	6.5
		40	39.52±1.19	-1.2	3.0
	Inter-ensayo	2.5	2.18 ± 0.13	-13.0	6.1
		5	4.91± 0.13	-1.9	2.7
		10	9.90± 0.7	-1.0	0.7
		20	19.91±0.19	-0.5	0.9
		40	39.36± 0.75	-1.6	1.9

Media ± Desviación estándar de la Media; n = 6

VIII.2.4 Estabilidad

Con base en los parámetros de exactitud y precisión (<15 %) se determinó que los compuestos tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico son estables en los procesos de extracción, análisis y almacenamiento a los que se ven sometidos las muestras de plasma. Estos procedimientos pueden ser aplicables en los estudios farmacocinéticos en ratones (Cuadro 7).

Cuadro 7. Perfil de estabilidad de los compuestos activos tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico en plasmas de ratón (matriz) bajo diferentes condiciones de manejo.

Condición	Compuesto	Concentración nominal (µg/mL)	Concentración observada (µg/mL)			Exactitud Bias (%)			Precisión RSD (%)		
			0 h	8 h	24 h	0 h	8 h	24 h	0 h	8 h	24 h
Temperatura ambiente 24 – 35 °C	Tomentina	2.5	2.39±0.09	2.31±0.08	2.35±0.09	-4.59	-7.60	-5.93	3.57	3.30	3.90
		5	4.93±0.11	4.96±0.14	4.91±0.17	-1.48	-0.86	-1.73	2.31	2.88	3.42
		10	9.96±0.30	9.84±0.40	9.55±0.19	-0.41	-1.64	-4.52	2.97	4.10	1.99
	Escopoletina	2.5	2.49±0.12	2.38±0.08	2.38±0.08	-0.48	-4.63	-4.63	4.83	3.15	3.15
		5	5.02±0.08	4.99±0.14	5.02±0.10	0.39	-0.17	0.43	1.53	2.82	2.07
		10	10.00±0.37	9.80±0.40	9.34±0.27	0.04	-2.02	-6.61	3.65	4.05	2.89
	Ácido sphaerálcico	2.5	2.48±0.03	2.25±0.13	2.27±0.11	-0.60	-9.98	-9.03	1.10	5.97	5.01
		5	5.01±0.06	4.59±0.06	4.56±0.10	0.17	-8.10	-8.73	1.11	1.27	2.09
		10	9.95±0.11	9.35±0.11	9.26±0.07	-0.49	-6.48	-7.37	1.12	1.21	0.75
Estabilidad en almacenamiento	Tomentina	Concentración nominal (µg/mL)	Automuestreador (4°C, 8 h)	Periodo largo (-70°C, 1 mes)	Automuestreador (4°C, 8 h)	Periodo largo (-70°C, 1 mes)	Automuestreador (4°C, 8 h)	Periodo largo (-70°C, 1 mes)			
		2.5	2.43±0.11	2.31±0.09	-2.64	-7.61	4.47	3.92			
		5	4.92±0.14	4.85±0.18	-1.65	-2.90	2.82	3.75			
	Escopoletina	10	9.93±0.62	9.63±0.65	-0.65	-3.74	6.28	6.71			
		2.5	2.52±0.09	2.32±0.08	0.75	-7.05	3.65	3.57			
		5	4.95±0.14	4.89±0.17	-0.94	-2.27	2.76	3.48			
	Ácido sphaerálcico	10	9.90±0.61	9.95±0.38	-1.05	-0.46	6.21	3.79			
		2.5	2.40±0.04	2.38±0.08	-3.89	-4.82	1.82	3.39			
		5	4.92±0.08	4.87±0.10	-1.69	-2.61	1.61	2.10			
			10	9.67±0.12	9.65±0.08	-3.34	-3.50	1.22	0.79		

Media ± desviación estándar (DE) de la media; n =5

VIII.3 Obtención de la fracción SaTES estandarizada en tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico.

La fracción SaTES (7.13 g) obtenida a partir del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de células en suspensión de *S. angustifolia*, se analizó por CLAR (Figura 9) y se estandarizó en el contenido de 86.4 mg/g de ácido sphaerálcico y 17.19 mg/g de la mezcla de las cumarinas (escopoletina y tomentina).

La mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico fueron cuantificables en un rango 25-400 µg/mL de la fracción SaTES.

No se observó interferencia entre los constituyentes del plasma, dopamina y el perfil químico de la fracción estandarizada SaTES.

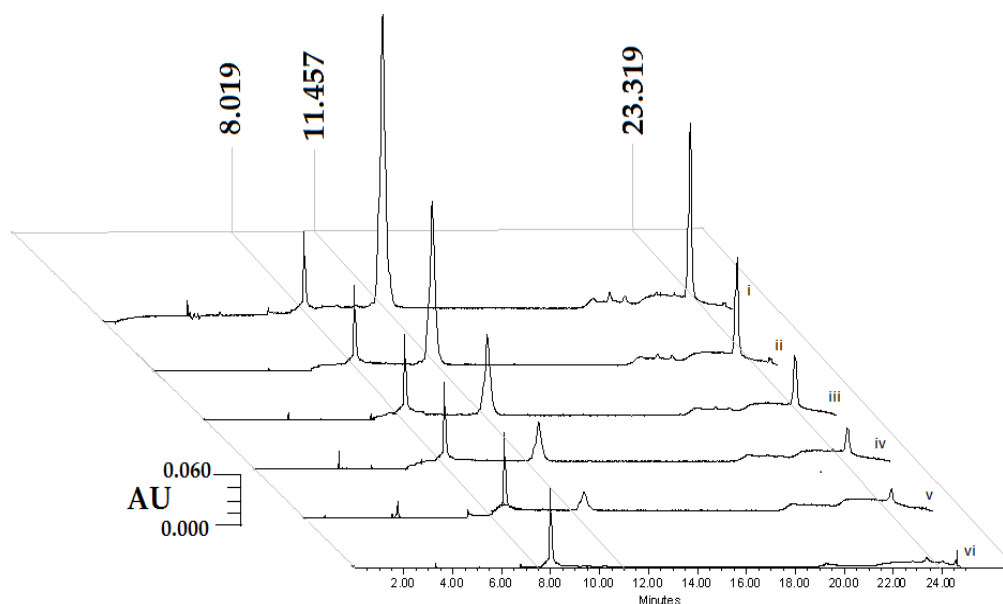


Figura 9. Perfil cromatográfico de la fracción SaTES obtenida de células en suspensión de *Sphaeralcea angustifolia* y estandarizada en la mezcla de las cumarinas (tomentina y escopoletina) tr=11. 457 min y ácido sphaerálcico tr= 23.319 con patrón interno dopamina.

VIII.4 Análisis farmacocinético

VIII.4.1 Farmacocinética de la administración oral

Las determinaciones en plasma de escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico posterior a la administración oral o intravenosa única de la fracción SaTES estandarizada (400 mg/kg), se expresaron como la media del grupo de ratones (Cuadro 8). La cuantificación de tomentina y escopoletina se dio como un valor único, debido que no fue posible resolver la separación de los picos cromatográficos en la fracción SaTES.

Después de la administración oral de 400mg/kg de fracción SaTES, la mezcla de cumarinas y ácido sphaerálcico alcanzaron una concentración máxima a los 3.30 y 5 min, respectivamente después de ese tiempo se observó un decaimiento en su concentración hasta los 80 min; posteriormente los contenidos de los compuestos estuvieron por debajo del LOQ (Figura 10 y 11).

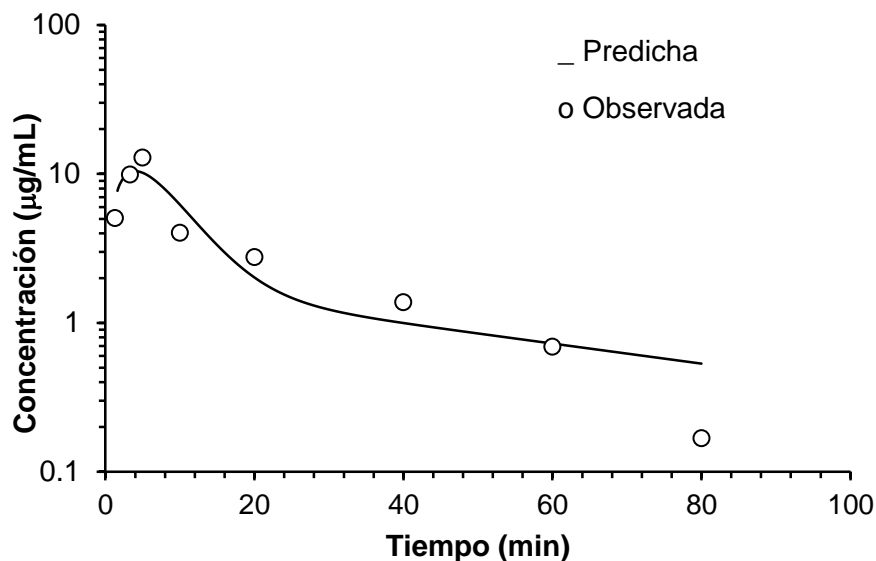


Figura 10. Análisis de las variaciones de concentración de ácido sphaerálcico en plasma con respecto al tiempo en minutos después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.

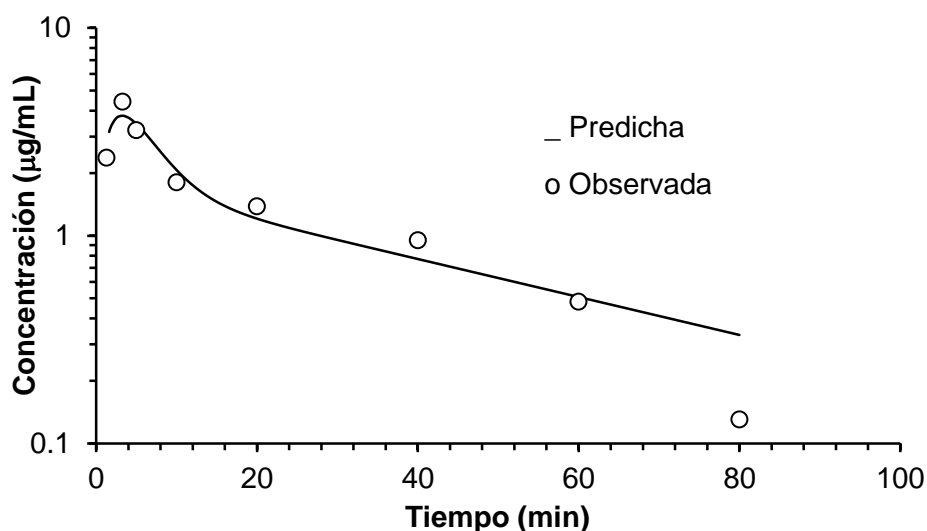


Figura 11. Análisis de las variaciones de la concentración en plasma de tomentina y escopoletina (mezcla de cumarinas) con respecto al tiempo, después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.

Cuadro 8. Variaciones en la concentración en plasma de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico después de la administración oral e intravenosa de una dosis única (400 mg/kg) de la fracción de SaTES estandarizada en ratones ICR.

Administración oral			Administración intravenosa		
Concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$)			Concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$)		
Tiempo (min)	Cumarinas en mezcla (tomentina y escopoletina)	Ácido sphaerálcico	Tiempo (min)	Cumarinas en mezcla (tomentina y escopoletina)	Ácido sphaerálcico
1.3	2.37 \pm 0.05	5.04 \pm 0.05	2.0	30.50 \pm 0.12	40.88 \pm 0.21
3.3	4.41 \pm 0.07	9.92 \pm 0.41	4.0	23.54 \pm 0.47	36.28 \pm 0.11
5	3.21 \pm 0.15	12.84 \pm 0.54	6.0	22.11 \pm 0.85	33.90 \pm 0.24
10	1.80 \pm 0.09	4.03 \pm 0.11	8.0	20.97 \pm 0.40	31.78 \pm 0.75
20	1.38 \pm 0.05	2.77 \pm 0.08	10	18.49 \pm 0.41	28.71 \pm 0.65
40	0.95 \pm 0.03	1.38 \pm 0.12	15	15.33 \pm 0.18	24.43 \pm 0.33
60	0.48 \pm 0.01	0.69 \pm 0.03	20	12.76 \pm 0.19	21.16 \pm 0.51
80	0.12 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03	30	8.46 \pm 0.21	15.79 \pm 0.57
120	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	60	0.68 \pm 0.04	3.81 \pm 0.09
240	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0			

Media \pm desviación estándar (DE) de la media; n = 10 para administración oral y n = 3 para administración intravenosa.

El gráfico construido a partir de los datos Cuadros 9 y 10 analizados con el programa PKSolver (Zhang *et al.*, 2010) de la concentración plasmática de la mezcla de cumarinas y ácido sphaerálcico versus el tiempo, se ajustan a un modelo de dos compartimientos (Cuadro 9). Los parámetros farmacocinéticos calculados se mencionan primero para el ácido sphaerálcico y luego para la mezcla de cumarinas.

Los compuestos presentaron concentraciones más altas en el compartimento central (A), 413.6 $\mu\text{g/mL}$ de ácido sphaerálcico y 71.47 $\mu\text{g/mL}$ de cumarinas en mezcla. Las constantes de tasa de absorción aparente de primer orden (k_a), fueron 0.27 y 0.39 min^{-1} , respectivamente. En el mismo orden que la anterior, las constantes de la velocidad de eliminación de primer orden (k_{10}) fueron 0.13 y 0.08 min^{-1} , respectivamente.

La constante de transferencia del compartimento central al compartimento periférico presentó una constante de velocidad aparente de primer orden (k_{12}) de 0.114 min^{-1} para el ácido sphaerálcico, menor que la observada para la mezcla de cumarinas (0.201 min^{-1}). En la dirección opuesta a la transferencia de masas, la constante de velocidad aparente de primer orden para el paso desde el compartimento periférico al central (k_{21}) fue 0.031 min^{-1} y 0.086 min^{-1} en el mismo orden mencionado para k_{12} .

Las vidas medias en el compartimento central ($t_{1/2\alpha}$) de 2.70 y 1.96 min, respectivamente, fueron menores que en el compartimento periférico ($t_{1/2\beta}$) a 44.65 y 32.95 min, y la constante de velocidad de absorción ($t_{1/2 k_a}$) 2.53 y 1.77 min, en el mismo orden que los anteriores. Los valores del volumen de distribución (V) y el aclaramiento (CL) con respecto a la constante de biodisponibilidad (F) fueron 1.31 y 0.80 $(\text{mg}) \cdot (\mu\text{g/mL})^{-1}$ para V y 0.17 y 0.07 $(\text{mg})/(\mu\text{g/mL})/\text{min}$ para CL siguiendo el mismo orden que los anteriores.

Los valores del tiempo máximo (T_{max}) y la concentración máxima (C_{max}) fueron 4.00 y 3.23 min, respectivamente, para el primero, y 10.44 y 3.77 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para el segundo parámetro, también se informaron en el mismo orden como los anteriores. Las áreas bajo la curva calculados para el intervalo de inicio definido ($0 \rightarrow t$), al final de la evaluación (240 min) y para la dilución infinita ($0 \rightarrow \infty$), fueron (1) 173.72 y 84.20 ($\mu\text{g/mL}$) \cdot min para el primer parámetro y (2) 208.06 y 100.02 ($\mu\text{g/mL}$) \cdot min para el otro parámetro, con el mismo orden de reportar. Para el tiempo medio de residencia (MRT), los valores resultantes fueron 40.16 min para el ácido sphaerálcico y 41.39 min para la mezcla de cumarinas (Cuadro 9).

Con base a las curvas de concentración versus el tiempo generadas y valores menores determinados por el Criterio de información de Akaike (AIC) y el Criterio de Schwarz (SC), se determinó que el ácido sphaerálcico y la mezcla de cumarinas presentaron un comportamiento farmacocinético que se ajusta al modelo de dos compartimentos (Ludden *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2010), (Figuras 10 y 11, Cuadro 9).

Cuadro 9. Parámetros farmacocinéticos después de la administración oral de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico presentes en la fracción SaTES estandarizada de *Sphaeralcea angustifolia* en el plasma de ratones ICR; n=10. Los analitos se ajustan a un modelo de dos compartimentos.

	Ácido sphaerálcico	Cumarinas (tomentina y escopoletina)	Unidades	
A	413.646	71.468	µg/mL	
B	1.845	1.791	µg/mL	
k_a	0.273	0.390	1/min	
k₁₀	0.127	0.085	1/min	
k₁₂	0.114	0.201	1/min	
k₂₁	0.031	0.086	1/min	
t_{1/2α}	2.698	1.963	min	
t_{1/2β}	44.653	32.946	min	
t_{1/2ka}	2.537	1.774	min	
α	0.256	0.353	1/min	
β	0.015	0.021	1/min	
V/F	1.309	0.802	(mg)/(µg/mL)	
CL/F	0.166	0.068	(mg)/(µg/mL)/min	
T_{max}	4.004	3.234	min	
C_{max}	10.447	3.775	µg/mL	
AUC_{0→240}	173.724	84.198	µg/mL·min	
AUC_{0→∞}	208.058	100.020	µg/mL·min	
MRT	40.167	41.397	min	
Diagnósticos				
	Ácido sphaerálcico		Cumarinas (tomentina y escopoletina)	
	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental
SS	18.469	15.62	1.918	0.835
R²	0.941	0.950	0.953	0.979
AIC	37.739	32.245	11.862	8.379
SC	35.726	32.836	12.453	9.365

Los datos fueron analizados por el programa Pk Solver en los modelos de uno y dos compartimentos. Para establecer el comportamiento de la variación de concentración de los compuestos analizados, se utilizaron las siguientes funciones: $C_p = Ae^{-k_{dt}} + Ce^{-k_{at}}$ (modelo de un compartimento) y $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{-k_{dt}}$ (modelo de dos compartimentos). C_p es la

concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$); A, B y C son la concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$) de ácido sphaerálcico y cumarinas (tomentina y escopoletina) en los compartimentos central y periférico, respectivamente; k_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden; k_{12} es la constante de velocidad de transferencia aparente de primer orden desde el compartimento central al compartimento periférico; k_{10} es la constante de velocidad de eliminación aparente de primer orden desde el compartimento central; k_{21} es la constante de velocidad de transferencia aparente de primer orden desde el compartimento periférico al compartimento central; $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ es el tiempo medio de absorción para el compartimento central y periférico respectivamente; α y β son las constantes empíricas correspondientes a los coeficientes de los exponentes de los valores de A y B; $t_{1/2ka}$ es el tiempo medio de absorción; V/F es el volumen aparente de distribución relacionado con la biodisponibilidad de la sustancia activa; T_{\max} es el tiempo para la concentración máxima; C_{\max} es la concentración máxima; CL/F es el aclaramiento aparente relacionado con la biodisponibilidad de la sustancia activa; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ y $AUC_{0-240 \text{ min}}$ son las áreas bajo la curva de plasma (AUC) de 0 al infinito y de 0 a 240 min, respectivamente, y MRT es el tiempo medio de residencia. La bondad del ajuste se evaluó con el criterio de información de Akaike (AIC), la suma de cuadrados (SS), el criterio de Schwarz (SC) y con el coeficiente de determinación (R^2). El mejor modelo ajustado según los valores de los Criterios de información de Akaike (AIC), la Suma de cuadrados (SS), los Criterios de Schwarz (SC) y el coeficiente de determinación (R^2) fue el modelo de dos compartimentos.

VIII.4.2 Farmacocinética de la administración intravenosa

La mezcla de cumarinas y ácido sphaerálcico posterior a la administración intravenosa, se detectaron en plasma desde los 2 min hasta los 60 min (Figuras 12 y 13). El Cuadro 10 muestra los parámetros farmacocinéticos del comportamiento

dependiente de la concentración de ácido sphaerálcico y la mezcla de cumarinas después de la administración intravenosa de la fracción SaTES estandarizada.

Los valores calculados para los compuestos se comparan bajo dos tipos de distribución: (1) modelos de un compartimento y (2) de dos compartimentos. El modelo de dos compartimentos se describió y discutió más ampliamente porque el diagnóstico derivado de AIC, SC (Ludden *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2010) SS y R^2 se ajusta mejor a dicho modelo.

El ácido sphaerálcico se encuentra más concentrado en el compartimento periférico (B) 40.46 $\mu\text{g/mL}$ que en el compartimento central (A) 18.03 $\mu\text{g/mL}$, lo contrario sucedió para la mezcla de escopoletina y tomentina, la cual estaba más concentrada en (A) 63.57 $\mu\text{g/mL}$ que en (B) 27.86 $\mu\text{g/mL}$. La constante de velocidad de eliminación aparente de primer orden (k_{10}) fue 2.6 veces mayor para la mezcla de cumarinas en comparación con los mismos parámetros determinados para el ácido sphaerálcico.

El ácido sphaerálcico mostró una velocidad de transferencia desde el compartimento central al compartimento periférico (k_{12}) 0.249 min^{-1} , menor a la de las cumarinas en mezcla (0.787 min^{-1}); en contraste, la constante de velocidad aparente de primer orden desde el compartimento periférico hasta el compartimento central (k_{21}) fue de 0.624 min^{-1} para el ácido sphaerálcico y 0.424 min^{-1} para la mezcla de cumarinas. Para ambos, ácido sphaerálcico y cumarinas en mezcla, se observó una vida media promedio más corta en el compartimento central ($t_{1/2\alpha}$) de 0.781 min y 0.534 min,

respectivamente, en comparación con la vida media en el compartimento periférico ($t_{1/2\beta}$) 20.634 min y 16.70 min, respectivamente.

La concentración inicial (C_0) es mayor para la mezcla de escopoletina y tomentina 91.44 $\mu\text{g/mL}$ que para el ácido sphaerálcico 58.49 $\mu\text{g/mL}$, el volumen de distribución (V) para ácido sphaerálcico $0.591 \text{ (mg)} \cdot (\mu\text{g/mL})^{-1}$ es superior a las cumarinas en mezcla $0.068 \text{ (mg)} \cdot (\mu\text{g/mL})^{-1}$ esto se relaciona con la menor eliminación de ácido sphaerálcico debido a que el compuesto se distribuye más que las cumarinas. El aclaramiento (CL) para el ácido sphaerálcico (0.028) fue tres veces mayor al valor CL de las cumarinas en mezcla (0.009). El AUC para el ácido sphaerálcico y la mezcla de cumarinas (en el intervalo de inicio definido (0 min) al final de la evaluación (60 min) y para la dilución infinita ($0 \rightarrow \infty$) proporcionó valores de 1064.3 y 1224.8 $\mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ para el primero de los parámetros, respectivamente, 665.02 y 720.77 $\mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$ para el otro parámetro, en el mismo orden.

El período de tiempo en que el contenido total de los compuestos activos permanece en el sistema, determinado con el área bajo la curva desde el momento inicial (AUMC), fue superior para el ácido sphaerálcico (35,880.3) en comparación con la mezcla de cumarinas (16,230.3) medida en $\mu\text{g} \cdot (\text{mL} \cdot \text{min})^2$. Esto determina el valor del tiempo medio de residencia (MRT), el cual es más alto para el ácido sphaerálcico (29.29 min) que para la mezcla de escopoletina/tomentina (22.52 min). Y finalmente, el volumen aparente de distribución en el estado estacionario (V_{ss}), para el ácido sphaerálcico (0.826) fue cuatro veces mayor con respecto a la mezcla de cumarinas (0.195) cuantificados en $\text{mg}/(\mu\text{g/mL})$.

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento tanto del ácido sphaerálcico, como el de las cumarinas en mezcla después de la administración intravenosa, se ajustó mejor al modelo de dos compartimentos ya que los parámetros de diagnóstico de Criterio de información de Akaike (AIC) y Criterio de Shawn (SC) fueron más bajos para el modelo de dos compartimentos para ácido sphaerálcico: $AIC_{2-compartimentos} 20.33 < AIC_{1-compartimento} 34.13$, $SC_{2-compartimentos} 21.12 < SC_{1-compartimento} 34.52$. Para la mezcla de cumarinas, los valores fueron, $AIC_{2-compartimentos} 19.49 < AIC_{1-compartimento} 28.12$, $SC_{2-compartimentos} 20.28 < SC_{1-compartimento} 28.5$. Los resultados anteriores también se pueden apreciar en el gráfico que se muestra en las Figuras 12 y 13 y Cuadro 10.

Cuadro 10. Parámetros farmacocinéticos después de la administración intravenosa de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico presentes en la fracción SaTES estandarizada de *Sphaeralcea angustifolia* en el plasma de ratones ICR; n=3. El análisis se realizó en los modelos de uno y dos compartimientos.

	Ácido sphaerálcico		Mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina)		Unidades
	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental	
A	-----	18.027	-----	63.570	µg/mL
B	-----	40.461	-----	27.862	µg/mL
k₁₀	0.032	0.048	0.047	0.126	1/min
k₁₂	-----	0.249	-----	0.787	1/min
k₂₁	-----	0.624	-----	0.424	1/min
t_{1/2α}	-----	0.781	-----	0.534	min
t_{1/2β}	-----	20.634	-----	16.701	min
t_{1/2}	21.245	-----	14.641	-----	min
α	-----	0.880	-----	1.297	1/min
β	-----	0.034	-----	0.041	1/min
C₀	41.726	58.489	30.773	91.438	µg/mL
V	0.828	0.591	0.220	0.068	(mg)/(µg/mL)
CL	0.027	0.028	0.010	0.009	(mg)/(µg/mL)/min
AUC₀₋₆₀	1098.375	1064.322	612.085	665.022	µg/mL*min
AUC_{0-inf ∞}	1278.978	1224.828	650.047	720.770	µg/mL*min
AUMC	39202.118	35880.304	13731.187	16230.343	µg/mL*min ²
MRT	30.651	29.294	21.123	22.518	min
V_{ss}	0.828	0.826	0.220	0.195	mg/(µg/mL)
Diagnósticos					
	Ácido sphaerálcico		Mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina)		
	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental	Modelo mono-compartimental	Modelo bi-compartimental	
SS	28.440	3.937	14.580	3.587	
R²	0.996	0.999	0.995	0.999	
AIC	34.131	20.333	28.116	19.497	
SC	34.520	21.122	28.511	20.285	

Los datos fueron analizados por el programa Pk Solver en los modelos de uno y dos compartimientos. Para establecer el comportamiento de la variación de concentración de los

compuestos analizados, se utilizaron las siguientes funciones: $C_p = Ae^{-kdt} + Ce^{-kat}$ (modelo de un compartimento) y $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Ce^{kdt}$ (modelo de dos compartimentos). C_p es la concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$); A, B y C son la concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$) de ácido sphaerálcico y mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) en los compartimentos central y periférico, respectivamente; ka es la constante aparente de velocidad de absorción de primer orden; k_{12} es la constante de velocidad de transferencia aparente de primer orden desde el compartimento central al compartimento periférico; k_{10} es la constante de velocidad de eliminación desde el compartimento central aparentemente de primer orden; k_{21} es la constante de velocidad de transferencia aparente de primer orden desde el compartimento periférico al compartimento central; $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ es el tiempo medio de absorción para el compartimento central y periférico; α y β son las constantes empíricas correspondientes a los coeficientes de los exponentes de los valores de A y B. C_0 es la concentración inicial del compuesto en el tiempo cero; V es el volumen de distribución aparente; CL es el aclaramiento aparente total del cuerpo; $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ y $AUC_{0-60 \text{ min}}$ son las áreas bajo la curva de plasma (AUC) de 0 a infinito y de 0 a 60 min, respectivamente, AUMC es el área bajo el primer momento de la curva; MRT es el tiempo medio de residencia y V_{ss} es el volumen aparente de distribución en estado estacionario. La bondad del ajuste se evaluó con los criterios de información de Akaike (AIC), la suma de cuadrados (SS), los criterios de Schwarz (SC) y el coeficiente de determinación (R^2) como un modelo de dos compartimentos.

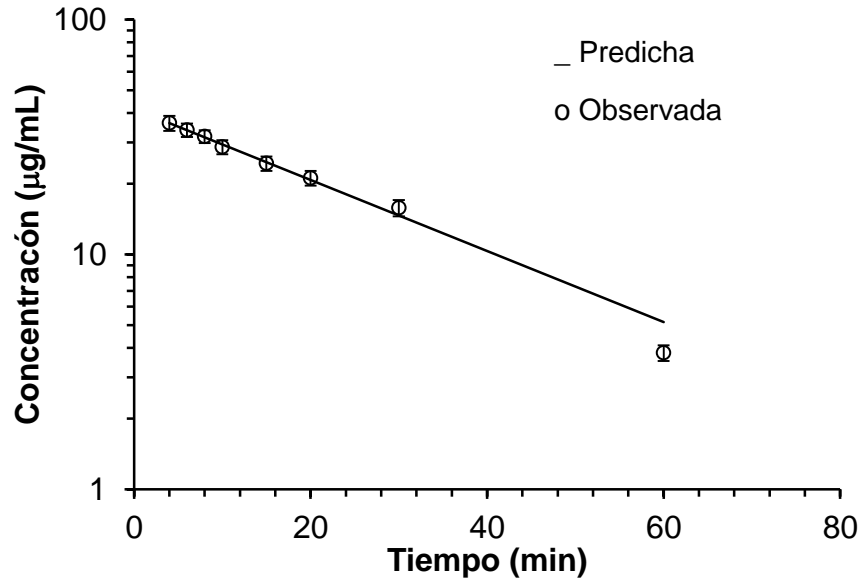


Figura 12. Análisis de las variaciones de concentración de ácido sphaerálcico en plasma con respecto al tiempo en minutos, después de la administración intravenosa de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.

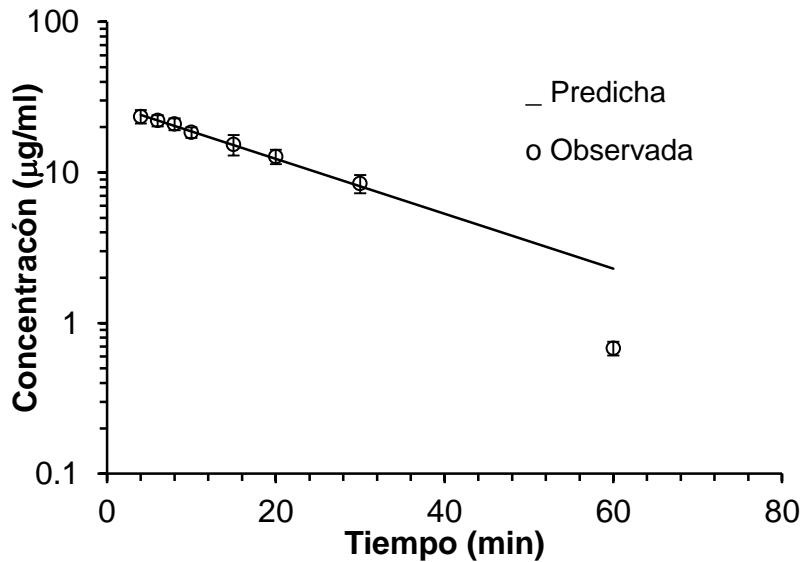


Figura 13. Análisis de la variación de las concentraciones de la mezcla de tomentina y escopoletina en plasma con respecto al tiempo después de la administración intravenosa de la fracción SaTES estandarizada. La línea representa la predicción del comportamiento dependiente de la concentración siguiendo un modelo de dos compartimentos.

VIII.4.3 Farmacocinética de productos de excreción

Después de la administración oral de 400 mg/kg de fracción activa SaTES, la mezcla de tomentina y escopoletina se detectó en orina desde las primeras 4 h hasta las 24 h (Figura 14); en las heces, se detectaron niveles bajos de 4 a 12 h, a las 24 h se observó una concentración acumulativa de ellas. Este comportamiento sugiere que la eliminación de cumarinas es principalmente renal (Cuadro 11, Figura 15). Al contrario, las concentraciones de ácido sphaerálcico en orina fueron más bajas entre las 12 y 24 h; Los mayores contenidos de este compuesto se detectaron en heces a partir de 4 h. Por lo tanto, la principal vía de eliminación del ácido sphaerálcico es la hepatobiliar (Cuadro 11, Figura 16).

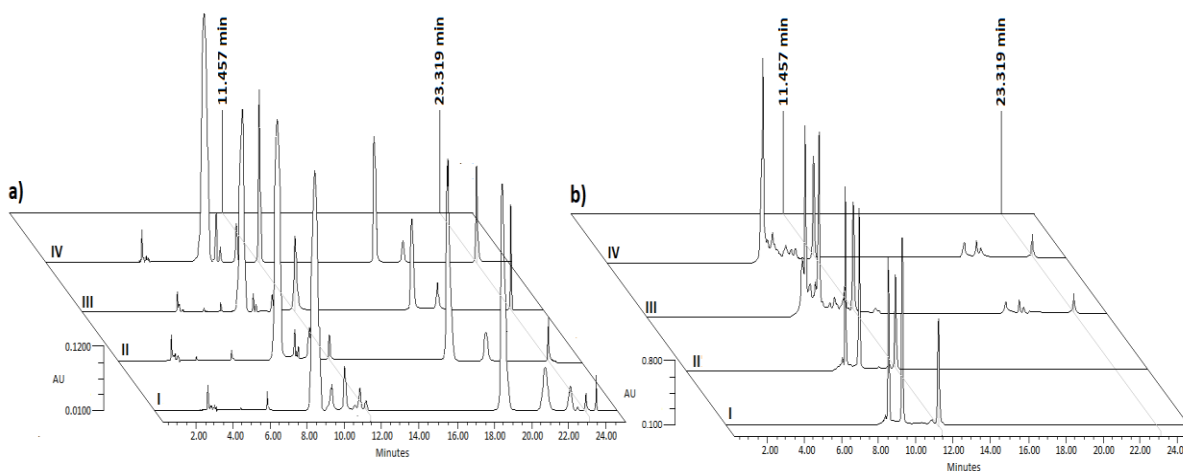


Figura 14. Perfiles cromatográficos de la mezcla de tomentina y escopoletina ($rt = 11.457$ min), y ácido sphaerálcico ($rt = 23.319$ min) detectados en extractos de heces (a) y orina (b) recolectados a las (I) 4, (II) 8, (III) 12 y (IV) 24 horas, después de una administración oral única de fracción SaTES estandarizada.

Cuadro 11. Excreción de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico por orina y heces durante las primeras 24 horas, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada.

Tiempo (h)	Orina total	Heces totales	µg/orina total		µg/heces totales	
	mL	(mg)	Cumarinas	Ácido sphaerálcico	Cumarinas	Ácido sphaerálcico
0	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4	2.05	131.8	70.75±0.12	0.00±0.00	0.30±0.03	25.97±0.13
8	1.00	193.5	39.69±0.09	0.00±0.00	1.97±0.03	64.99±0.10
12	0.65	139.7	28.30±0.10	3.15±0.04	2.42±0.09	42.49±0.14
24	4.00	630.2	15.87±0.11	1.25±0.06	11.46±0.14	20.55±0.11

Dos grupos de 10 ratones.

El análisis no compartimental del ácido sphaerálcico y la mezcla de escopoletina y tomentina después de la administración única de la fracción SaTES estandarizada, no asume ningún modelo farmacocinético, si no que analiza la concentración de los compuestos en heces y orina con respecto al tiempo con ecuaciones algebraicas.

Las constantes de velocidad de eliminación terminal de primer orden (λ_z), calculadas a partir de la fase de desintegración en las curvas semi-logarítmicas de las concentraciones versus tiempo, fueron similares para ambos tipos de compuestos (Cuadro 12): mezcla de cumarinas en orina y ácido sphaerálcico en heces (0.064 y 0.066 h⁻¹, respectivamente).

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de la mezcla de escopoletina/tomentina en orina y de ácido sphaerálcico en heces también fue similar (10.909 y 10.506 h⁻¹, respectivamente). El $t_{1/2}$ de la eliminación está influenciado por los volúmenes de

distribución (V_z/F) y aclaramiento, el ácido sphaerálcico se distribuyó 81.16 % más que las cumarinas en mezcla; el aclaramiento total aparente después de la administración oral (Cl/F) de ácido sphaerálcico es mayor al de las cumarinas en mezcla, por lo tanto, para una mayor clarificación, la vida media es menor. Por el contrario, si el aclaramiento es menor, como es el caso de las cumarinas, su $t_{1/2}$ será mayor (Cuadro 12). Este parámetro es esencial para conocer los intervalos de dosificación de los compuestos.

El T_{max} es el tiempo en el cual se obtiene la concentración máxima (C_{max}), esto ocurre cuando la velocidad de absorción es igual a la velocidad de eliminación. La C_{max} está relacionada con la vía de eliminación, la vía fecal implica un proceso más complejo, por lo que cualquier factor que influya en las constantes de absorción y la velocidad de eliminación influirá en el valor del T_{max} . Con base en que el ácido sphaerálcico alcanzó la $C_{máx}$ a las 8 h, se propone que se eliminó por excreción biliar o por vías enterohepáticas, y no tanto por la vía gastrointestinal. Mientras tanto, la eliminación renal de cumarinas mostró una C_{max} a las 4 h (Cuadro 12). El aclaramiento total aparente de compuestos (Cl/F) como un indicador de la capacidad del organismo para la eliminación de compuestos indican que el hígado eliminó el ácido sphaerálcico a través de la bilis; El valor de aclaramiento de la mezcla de cumarinas fue casi 6 veces menor que el del ácido sphaerálcico, lo que indica que su eliminación es más eficiente por vía renal.

El área bajo la curva (AUC) es una medida de biodisponibilidad que relaciona las variaciones de concentración en un tiempo determinado ($AUC_{0 \rightarrow t}$) y en el infinito ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$). Los valores de $AUC_{0 \rightarrow t/0 \rightarrow \infty}$ para ácido sphaerálcico fueron más bajos que los determinados para las cumarinas en mezcla, probablemente debido a su preferente vía de eliminación, que depende de su absorción en el tracto gastrointestinal, puesto que alcanzar la T_{max} para el ácido sphaerálcico requirió más tiempo (Cuadro 12).

Los valores de la última concentración observada en relación con la concentración máxima (C_{last_obs}/C_{max}), fueron similares para la mezcla de cumarinas y el ácido sphaerálcico (Cuadro 12). AUMC indica la cantidad de compuesto que ingresa en el primer momento de la curva (biodisponibilidad), que ha alcanzado el interior del compartimiento en el primer momento del cálculo, AUMC para cumarinas mixtas es mayor que la del ácido sphaerálcico (Cuadro 12).

El tiempo medio de residencia ($MRT_{0 \rightarrow \infty}$) es el tiempo que los compuestos necesitan salir del organismo (Cuadro 12). El valor de MRT indicó que ácido sphaerálcico necesita 1 h más que las cumarinas en mezcla, debido su gran distribución (V_z/F), el valor de MRT de ácido sphaerálcico es mayor al de las cumarinas.

Cuadro 12. Parámetros farmacocinéticos en el modelo no compartimental de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) y ácido sphaerálcico en orina y en heces de ratones ICR, después de la administración oral de la fracción SaTES estandarizada.

No-compartimental	Mezcla de cumarinas	Ácido sphaerálcico	Unidades
	Orina	Heces	
$(\lambda.z)$	0.064	0.066	1/h
$t_{1/2}$	10.909	10.506	h
T_{max}	4	8	h
C_{max}	73.08	65.235	$\mu\text{g/mL}$
C_{last_obs}/C_{max}	0.279	0.297	
$AUC_{0 \rightarrow t}$	759.082	693.001	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	1080.345	986.321	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$
$AUC_{0-t}/AUC_{0 \rightarrow \infty}$	0.702	0.703	
$AUMC_{0 \rightarrow \infty}$	20112.986	19457.701	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^2$
$MRT_{0 \rightarrow \infty}$	18.617	19.728	h
V_z/F	0.100	0.531	$(\text{mg})/(\mu\text{g/mL})$
Cl/F	0.006	0.035	$(\text{mg})/(\mu\text{g/mL})/\text{h}$

Los datos fueron analizados con el programa Pk Solver en el modelo no compartimental. Para establecer el comportamiento de la variación de concentración de la mezcla de cumarinas y el ácido sphaerálcico en orina y heces, se utilizaron las siguientes funciones: $\lambda.z$ es la constante de velocidad de primer orden de las curvas de eliminación (log-lineal) (1/h); $t_{1/2}$ es el tiempo medio de eliminación (h); T_{max} es el tiempo de concentración máxima (h); C_{max} es la concentración máxima ($\mu\text{g/mL}$); C_{last_obs}/C_{max} es la última concentración observada/concentración máxima; $AUC_{0 \rightarrow t}$ y $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ son las áreas bajo curva (AUC) de 0 a 24 h y de 0 a infinito ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$); $AUMC_{0 \rightarrow \infty}$ área bajo el primer momento de la curva (AUMC) de 0 a infinito ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^2$); $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ es el tiempo de residencia promedio observado de 0 a infinito (h); V_z/F es el volumen aparente de distribución durante la fase

terminal después de la administración no intravenosa ((mg)/(μg/mL)); Cl/F_{obs} es el aclaramiento total aparente del compuesto en el organismo después de la administración oral ((mg)/(μg/mL)/h).

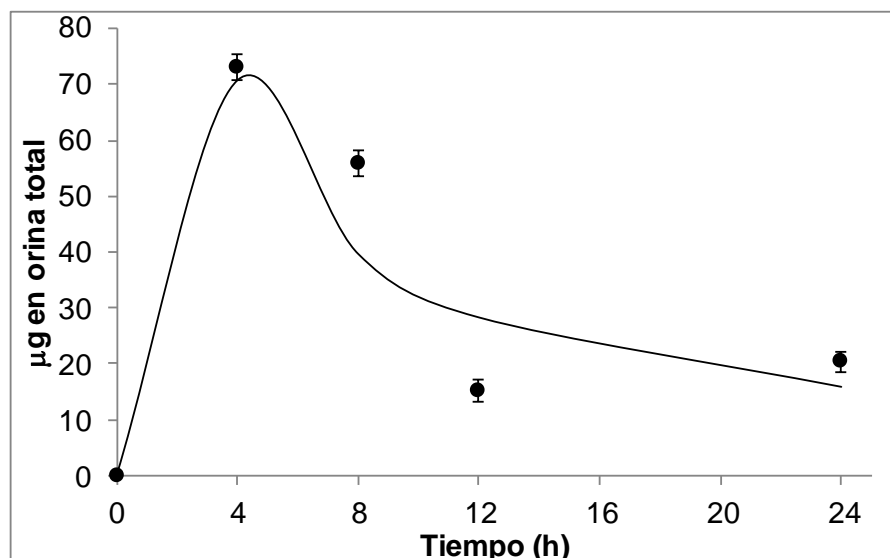


Figura 15. Excreción de la mezcla de cumarinas (tomentina y escopoletina) en orina con respecto al tiempo, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada.

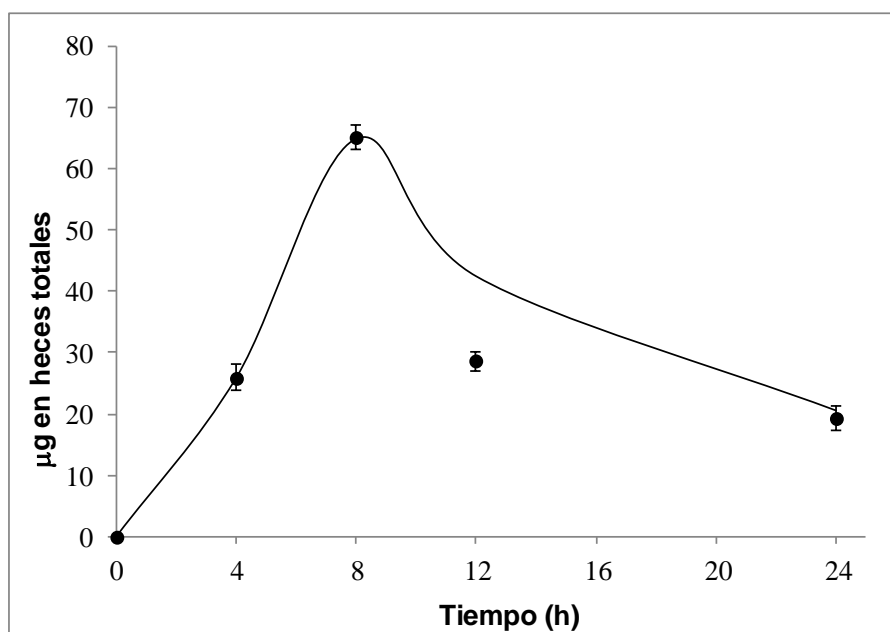


Figura 16. Excreción de ácido sphaerálcico en heces con respecto al tiempo, después de una administración oral única (400 mg/kg) de fracción SaTES estandarizada.

IX. Discusión

Sphaeralcea angustifolia es una planta usada tradicionalmente en México para tratar enfermedades inflamatorias. Los compuestos identificados responsables del efecto antiartrítico e inmunomodulador son el ácido sphaerálcico, escopoletina y tomentina (Pan *et al.*, 2010; Pérez -Hernández *et al.*, 2014; Nicasio-Torres *et al.*, 2016 y 2017). Este antecedente apoya el desarrollo de un nuevo fito-medicamento de administración oral estandarizado en estos compuestos activos.

La vía de administración mencionada está establecida por la Norma Oficial Mexicana (NOM-248-SSA1-2011) y el Reglamento de Suministros de Salud 2014, que indican que los medicamentos de origen vegetal deben administrarse por vía oral o tópica. Además, para su registro se requieren estudios preclínicos que incluyan estudios de seguridad, estabilidad, actividad farmacológica y análisis farmacocinéticos, entre otros, con el fin de proporcionar productos de calidad al consumidor.

Hasta donde conocemos, este es el primer estudio acerca de la validación de los métodos analíticos, desarrollado para los compuestos antiartríticos tomentina, escopoletina y ácido sphaerálcico, el cual fue útil para la evaluación farmacocinética. La cuantificación de tomentina y escopoletina se dio como un solo valor ya que no fue posible resolver los picos cromatográficos resultantes ($rt = 11.457$ min); ambos compuestos tienen estructuras químicas muy similares y tienen tiempos de retención muy cercanos. La fracción de SaTES se estandarizó en una mezcla de tomentina y escopoletina 17.19 mg/g y ácido sphaerálcico 86.4 mg/g.

La fracción contiene (tomentina y escopoletina) ya que de esta fracción, se purificaron los tres compuestos activos, sin embargo, para la validación del método analítico se decidió evaluar escopoletina (Sigma-Aldrich) debido a su pureza y disponibilidad.

Las concentraciones de la mezcla de cumarinas ($71.47 \mu\text{g/mL}$) y de ácido sphaerálcico ($413.64 \mu\text{g/mL}$) fueron mayores en el compartimento central (A) que en el compartimento periférico (B). La constante de velocidad de absorción de primer orden (k_a) para la mezcla de cumarinas (0.390 min^{-1}) fue más alta que la del ácido sphaerálcico (0.273 min^{-1}), lo que indica que la mezcla de cumarinas se absorbe más rápido que el ácido sphaerálcico.

La velocidad de eliminación del compartimento central es aparentemente de primer orden (k_{10}) depende de la cantidad de compuesto presente en el compartimento central; esta constante fue mayor para el ácido sphaerálcico (0.127 min^{-1}) que para las cumarinas en mezcla (0.085 min^{-1}). Este hallazgo se correlaciona con la mayor concentración de ácido sphaerálcico en el compartimento central que en el periférico el cual es un 82.72 % más concentrado a las cumarinas. La velocidad de transferencia es aparentemente de primer orden (k_{12}) desde el compartimento central al periférico fue 46 % mayor para la mezcla de cumarinas que para el ácido sphaerálcico.

Este hallazgo se correlacionó con los valores de la velocidad de retorno del compartimento periférico al compartimento central (k_{21}), que también son superiores

para la mezcla de cumarinas. Por lo tanto, para los compuestos, la vida media en el compartimento periférico $t_{1/2\beta}$ fue mayor que la vida media en el compartimento central $t_{1/2\alpha}$.

Ácido sphaerálcico tiene un volumen de distribución (V/F) 38.73 % más alto que las cumarinas, un gran volumen de distribución revela una fuerte tendencia a la distribución fuera de la sangre para irse hacia los tejidos (Philip-Rowe, 2012). Este volumen de distribución no corresponde con el volumen real del cuerpo o sus compartimientos, sino que está relacionado con la distribución de los compuestos en el organismo. Cuando un compuesto se une demasiado a los tejidos, solo queda circulando una pequeña parte de la dosis, por lo que la concentración plasmática será baja y el volumen de distribución grande, por el contrario los compuestos como son las cumarinas en mezcla, que permanecen en el torrente circulatorio tienden a presentar volúmenes de distribución menores (Toutain y Bousquet, 2004).

El aclaramiento total aparente con respecto a la biodisponibilidad (CL/F) después de la administración oral, señala la capacidad que tiene el organismo para eliminar un compuesto, el valor del ácido sphaerálcico fue dos veces mayor que el calculado para las cumarinas en mezcla, lo que indica que más volumen de sangre o plasma es depurado de ácido sphaerálcico por unidad de tiempo (Barrett *et al.*, 2013).

El ácido sphaerálcico alcanzó la $C_{m\acute{a}x}$ de 10.45 $\mu\text{g/mL}$ a los 4.00 min, y las cumarinas en mezcla tuvo una $C_{m\acute{a}x}$ de 3.77 $\mu\text{g/mL}$ a los 3.23 min. Este último se midió por el AUC de las concentraciones plasmáticas ($AUC_{0\rightarrow\infty}$ y $AUC_{0\rightarrow240}$), lo que refleja la

cantidad total del compuesto que llega a la circulación sistémica. El MRT de ambos compuestos es muy cercano, esto se relaciona, con que el tiempo de vida media en el compartimento β ($t_{1/2\beta}$) para ambos compuestos es superior, al tiempo que pasan en el compartimento α .

Se realizó la prueba de comportamiento farmacocinético después de la administración intravenosa tanto de ácido sphaerálcico como de la mezcla de cumarinas, con lo observado de los valores de V y CL permitieron el establecimiento del parámetro **F** (Biodisponibilidad absoluta) durante la administración oral del extracto con la fracción SaTES estandarizada. El parámetro de biodisponibilidad, F, presentó valores entre el 16% y 45% para el ácido sphaerálcico y entre 8% y 13% para la mezcla de cumarinas.

Los compuestos se ajustaron a un modelo de dos compartimentos y se encuentran biodisponibles en plasma; y se pueden considerar compuestos con potencial actividad antiartrítica ya que no se detectaron productos derivados de su biotransformación.

La eliminación de un compuesto es una de las fases más importantes de los análisis farmacocinéticos, el cual define el comportamiento de la concentración de compuestos activos en el plasma con respecto al tiempo (Haberer, 2016). Los compuestos activos ácido sphaerálcico y las cumarinas en mezcla se identificaron en heces y orina; fue posible definir que después de su absorción en el organismo, tienen diferentes vías de eliminación, ya que la mezcla de escopoletina y tomentina

su eliminación fue por la vía renal y la eliminación del ácido sphaerálcico fue principalmente por la vía hepatobiliar.

No se detectaron productos derivados de la eliminación de escopoletina y tomentina, sin embargo, la eliminación renal de compuestos intactos no descarta que tales sustancias también puedan eliminarse mediante procesos de biotransformación y que finalmente una parte sustancial de sus metabolitos inactivos sean eliminados por el riñón. La concentración final de las cumarinas en mezcla excretadas en la orina son el resultado de la filtración glomerular y la secreción tubular, menos la reabsorción tubular (Aleixandre & Puerro, 2010).

Por lo tanto, es posible establecer que las cumarinas son eliminadas principalmente por vía renal, debido a que fue posible detectar estos compuestos dentro de los parámetros de LOQ y LOD en muestras de orina y no tanto en las heces, por lo que podría hacerse la evaluación del comportamiento de la concentración en un curso temporal. Por consiguiente, fue posible determinar los parámetros farmacocinéticos para la eliminación renal.

La vía de eliminación del ácido sphaerálcico fue fecal. El organismo elimina los compuestos a través de las heces de tres diferentes formas: la primera es a través de la excreción biliar relacionada con los procesos de biotransformación de sustancias y productos de biotransformación (Flórez-Beledo *et al.*, 2013); Este proceso no ocurrió para el ácido sphaerálcico debido a que no se detectaron productos de biotransformación en las heces. La segunda modalidad de eliminación

fecal es a través de la circulación enterohepática; en este proceso, durante el tránsito intestinal el ácido sphaerálcico, se absorbe pasivamente en el intestino, a favor de un gradiente de concentración. De esta manera, el compuesto activo puede detectarse en el torrente sanguíneo y eventualmente transportarse al hígado, en principio mediante circulación sistémica o un proceso de circulación hepática completo. De esta manera, la disposición final del ácido sphaerálcico es mediante la eliminación activa en la luz intestinal a través de la bilis o el epitelio intestinal. La diferencia de tiempo, entre el proceso de absorción intestinal y la disposición final corresponde al tiempo de residencia, el cual retrasa la caída de las concentraciones plasmáticas y prolonga la duración del efecto (Flórez-Beledo *et al.*, 2013).

La tercera forma es a través de la excreción intestinal. El ácido sphaerálcico pasaría directamente a través del tracto gastrointestinal y sin ninguna alteración se eliminaría en las heces. Este compuesto es absorbido porque ha sido detectado en plasma. No es posible descartar ninguna de las tres modalidades en la eliminación del ácido sphaerálcico en las heces. Sin embargo, se pueden observar los siguientes aspectos: la diferencia entre la cantidad de ácido sphaerálcico administrado (34.56 mg/kg) en 400 mg de fracción SaTES y la recuperada en las heces (C_{max} 64.99 μ g/heces totales en un T_{max} de 8 h), lo que implica una diferencia de aproximadamente tres órdenes de magnitud, lo que nos hace pensar que en algún lugar se debe distribuir una gran cantidad de ácido sphaerálcico desde el organismo.

Se puede argumentar que el ácido sphaerálcico se elimina por excreción biliar o por eliminación enterohepática. La predicción se basa en el hecho de que para su

eliminación se deben considerar los siguientes puntos: entre los parámetros farmacocinéticos se puede observar que el volumen aparente de distribución durante la fase terminal después de la administración no intravenosa (V_z/F_{obs}), ácido sphaerálcico se distribuye un 81% más que la mezcla de cumarinas, por esta razón su eliminación es más lenta y su C_{max} y T_{max} se ven afectadas, lo que se alcanza a las 8 h, 4 h después de las cumarinas en la mezcla.

X. Conclusión

Se desarrolló un método analítico confiable para el análisis de los compuestos activos antiartríticos escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, el cual se utilizó en el estudio farmacocinético. Los valores farmacocinéticos de ácido sphaerálcico indican que es un compuesto que tiene la capacidad de absorberse, estar biodisponible y llegar un compartimiento periférico y pasar en este compartimiento un periodo de tiempo mayor al que pasa en un compartimiento central, se distribuye con facilidad, el aclaramiento y vida media, indican que es un compuesto fácil de ser eliminado del organismo.

Los valores farmacocinéticos de la mezcla de cumarinas muestran que son compuestos que tienen la capacidad de absorberse, pasar a un compartimiento periférico y además estar más tiempo en este compartimiento que en el central, tienen una buena biodisponibilidad plasmática, permanecen más tiempo en el organismo, debido a su lento aclaramiento plasmático y a su tiempo medio de residencia.

La eliminación de ácido sphaerálcico es primordialmente hepatobiliar ya que la presencia acumulativa de este compuesto se observa principalmente en heces, debido a que en orina se ven concentraciones muy bajas del compuesto hasta las 12 h después de su administración. La eliminación de la mezcla de escopoletina y tomentina es principalmente renal. La información proporcionada permitirá el diseño de un fito-medicamento de administración oral, efectiva y segura, útil para el tratamiento de la artritis reumatoide.

XI. Perspectivas

- ◇ Diseñar un fitomedicamento de administración oral (cápsulas) estandarizado en los antiartríticos escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico, que cumpla con los atributos de calidad establecidos, seguridad y eficacia terapéutica.
- ◇ Evaluar las propiedades de calidad físicas, químicas, biológicas y microbiológicas deseables del fitomedicamento.
- ◇ Realizar estudios de estabilidad por un tiempo determinado bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene, para definir el periodo de vida útil y fecha de caducidad.
- ◇ Realizar estudio clínico fase I del fitomedicamento para determinar su farmacodinamia y farmacocinética, a través de un protocolo aprobado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).
- ◇ Realizar estudio clínico fase II del fitomedicamento para ajustar la dosis terapéutica, seguridad y eficacia, a través de un protocolo aprobado por la

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

- ◇ Realizar estudio clínico fase III del fitomedicamento para determinar la dosis terapéutica, seguridad y eficacia, a través de un protocolo aprobado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

XII. Referencias bibliográficas

1. Aguilera L. Conceptos básicos de farmacocinética farmacodinamia en TIVA. Grupo de Anestesia Total Intravenosa. **2008**. Disponible: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/anestesiologia/tiva_conceptos_basicos.pdf
2. Aleixandre A, & Puerro M. Absorción y distribución de los fármacos. Vol. 1 Farmacología básica. México. **2010** pp. 13-35. <http://media.axon.es/pdf/69379.pdf>
3. Argueta A, Cano L, Asseleih M, Rodarte M. "Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana". Vol. III. Instituto Nacional Indigenista. México, D.F. **1994**. pp. 1786. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1263>
4. Atul-Bhattaram V, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine*. **2002**; 9:1-33. <https://doi.org/10.1078/1433-187X-00210>
5. Bao J, & Dai SM. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: Mechanism, efficacy, and safety. *Rheumatol Int* **2011**; 31:1123-1129. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-1841-y>
6. Barrera-Cruz A, Beltran-Castillo J, Blanco-Favela F, et al. Guía práctica clínica, diagnóstico y tratamiento de artritis reumatoide del adulto, México. Secretaria de salud. **2009**; IMSS 195-08 pp. 3-98. ISBN:978-607-7790-77-8.
7. Barrett KE, Brooks HL, Boitano S, Barman SM. Fisiología Médica de Ganong. Fisiología médica. Edición 23. Mc Graw Hill Interamericana Editores. **2013**; ISBN: 978-0-07-160567-0
8. Bhowmick K, Chakraborti G, Gudi NS. Free radical and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Indian J Rheumatol* **2008**; 3:8-12. [https://doi.org/10.1016/S0973-3698\(10\)60073-8](https://doi.org/10.1016/S0973-3698(10)60073-8)
9. Delgado-Vega AM, Martín J, Granados J, Anaya JM. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿qué esperar de América Latina? *Biomédica*. **2006**; 26(4);562-584 <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i4.326>
10. FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry. **2015**. 1: 1-15 <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

11. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **2003**; 423: 356-361. <https://doi.org/10.1038/nature01661>
12. Flórez-Beledo J, Armijo-Simón, Mediavilla-Martínez A. *Farmacología humana*. Edición 3. Masson, S.A. Barcelona España. **2013**. pp. 1216. ISBN: 84-458-0613-0
13. García-Rodríguez RV, Chamorro-Cevallos G, Siordia G, Jiménez-Arellanes A, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytochemistry to treat chronic inflammation. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* **2012**; 11: 454 – 463
14. Gibaldi M & Terrier D. *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker Incorporated. Vol. II. Edición 2. Informa healthcare. New York London. **1982**. pp 494. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510040213>
15. Haberer JP. *Principios de farmacocinética aplicados a la anestesia*. EMC - Anestesia-Reanimación. **2016**; 20:1-15 DOI: [10.1016/s1280-4703\(16\)79272-3](https://doi.org/10.1016/s1280-4703(16)79272-3)
16. Hinderliter P & Saghir SA. *Pharmacokinetics*. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. **2014**; 849-855 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00419-X>
17. ISSSTE. Boletín: “Aplica el ISSSTE programa para el diagnóstico temprano de la Artritis, que afecta a 1.5 millones de Mexicanos. Mexico, D.F.” B. 130-2005, 2012.
18. Jang D & Murrell GA. Nitric oxide in arthritis. *Free Radic Biol Med* **1998**; 24:1511-1519. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00459-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00459-0)
19. Juárez-Ciriaco M, Román-Ramos R, González-Márquez H, Meckes-Fischer M. Efecto de *Sphaeralcea angustifolia* sobre la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. *Lab Ciencia* **2008**; 2: 21 – 23
20. Larrarte JPM, Pineda YR, Prada-Hernández DM. Aspectos teórico-prácticos de la inflamación en las enfermedades reumáticas. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. **2007**; 23(2): 1-18. versión On-line ISSN 1561-3038
21. Liu H, Yang J, Du F, Gao X, Ma X, Huang Y, Li C. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats. *Drug Metabolism and Disposition*. **2009**; 37(12): 2290-2298. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.029819>

22. Lu T, Yang J, Gao X, Chen P, Du F, Sun Y, Li C. Plasma and urinary tanshinol from *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiotoxic pills, a cardiovascular herbal medicine. *Drug Metabolism and Disposition*. **2008**; 36 (8): 1578-1586 DOI: <https://doi.org/10.1124/dmd.108.021592>
23. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. **1994**; **22**: 431 - 445 <https://doi.org/10.1007/BF02353864>
24. Marini V, Babini A, Moretti E. Serum levels of citrulline and nitric oxide in patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Archivos de Alergia e Inmunología clínica* **2004**; 35:39-45.
25. McInnes I, & Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* **2007**;7(10):1038-2094. <https://doi.org/10.1038/nri2094>
26. Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomed* **2004**; 11:446-451. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.06.002>
27. Ministerio de Salud, P. Artritis reumatoide. Guía de Práctica Clínica. *Dirección Nacional de Normatización*. **2016**; 10 (2): 1-8 [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(06\)70383-X](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(06)70383-X)
28. Moltó-Marhuenda J. Farmacocinética poblacional de Lopinavir y ritonavir en pacientes adultos infectados por el VIH. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra. **2008**.
29. Mould-Quevedo J, Peláez-Ballestas I, Vázquez-Mellado J, Terán-Estrada L, Esquivel-Valerio J, Ventura-Ríos L, Skinner-Taylor C. El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México. *Gac Méd Méx* **2008**; 144:225-231.
30. Murashige T, & Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiol* **1962**; 15: 473-497 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

31. Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y, Ji G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Bio Med central* **2007**; 3:8:1-13. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-8>
32. Nicasio-Torres MP, Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Meckes-Fischer M, Tortoriello J, Cruz-Sosa F. Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta Physiol Plant.* **2016**; 38:209-219. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2211-x>
33. Nicasio-Torres MP, Serrano-Román J, Jiménez-Ferrer E, Herrera-Ruiz M. Effect of Dichloromethane-Methanol Extract and Tomentin Obtained from *Sphaeralcea angustifolia* Cell Suspensions in a Model of Kaolin/Carrageenan-Induced Arthritis. *Planta Med Int Open* **2017**; 4: 35–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1055/s-0043-108760>
34. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>
35. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
36. Osti-Castillo M, Torres-Valencia JJM, Villagómez-Ibarra JR, Castelán-Pelcastre I. Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Bol Latinoam Caribe Plant Med y Aromat.* **2010**; 7(3): 1-181. ISSN 0717 7917
37. Pan R, Gao XH, Li Y, Xia YF, Dai Y. Anti-arthritic effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium. *Fundam Clin Pharmacol.* **2010**; 24: 477-490 <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00784.x>
38. Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Marquina S, Herrera-Ruiz M, Meckes-Fischer M, Tortoriello J, Cruz-Sosa F, Nicasio-Torres MP. Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Med* **2014**; 80: 209-214. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1360302>

39. Philip-Rowe. Pharmacokinetics. Philip Rowe & Ventus Publishing ApS. Vol. I. Edición 1. **2012**. pp. 1-147. ISBN 978-87-403-0090-1
40. Rodriguez-Amado J, Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Esquivel-Valerio AJ, Burgos-Vargas R, Pérez-Barbosa L, Garza-Elizondo MA. Epidemiology of rheumatic diseases. A community-based study in urban and rural populations in the state of Nuevo Leon, Mexico. *J Rheumatol* **2011**; 38 (86): 1-14. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100952>
41. Romero-Cerecero O, Meckes-Fischer M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer JE, Nicasio-Torres MP, Pérez-García D, Tortoriello J. Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis. *J. Ethnopharmacol.* **2013**; 147: 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>
42. Secretaría de Salud. *Diagnóstico y tratamiento de Artritis reumatoide del Adulto. Instituto Mexicano De Seguro Social.* **2010**; 4: 1-97 ISBN: 978-607-7790-77-8.
43. Serrano-Román J. Caracterización farmacológica de tomentina y ácido sphaerálcico, aislados de suspensiones celulares de *Sphaeralcea angustifolia* en un modelo de artritis experimental. Tesis de Maestría. Maestría en Medicina Molecular. Facultad de Medicina-UAEM, Centro de Investigación Biomédica del Sur. Xochitepec, Morelos. **2015**.
44. Tak PP & Kalden JR. Advances in rheumatology: New targeted therapeutics. *Arthritis Res and Ther.* **2011**; 13: 1-5 <https://doi.org/10.1186/1478-6354-13-S1-S5>
45. Toutain P, Bousquet-Mélou A. Volumes of distribution. *J Vet Pharmacol Ther.* **2004**; 27(6): 441–53.
46. Wang MX, Wei AQ, Yuan J, Trickett A, Knoops B, Murrell GAC. Expression and regulation of peroxiredoxin 5 in human osteoarthritis. *FEBS Letters.* **2002**; 531 (2): 359-362 [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03511-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03511-1)
47. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer Methods and Programs in Biomedicine.* **2010**; 99 (3): 306-314 <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>

XIII. Cronograma de actividades

Actividad por trimestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cultivo de células en suspensión, inducción, producción de ES, TOM y AS en el cultivo, obtención del extracto CH ₂ CL ₂ :CH ₃ OH.	X											
Seminario I	X											
Trabajo de investigación I	X											
Obtención de fracciones ricas en ES, TOM y AS.		X										
Seminario II		X										
Trabajo de investigación II		X										
Purificación de los compuestos AS, TOM y ES.			X									
Curva de calibración de ES, TOM y AS para determinación en CLAR y preparación de solución estándar y patrón interno (con Dopamina).			X									
Seminario III			X									
Trabajo de investigación III			X									
Obtención de datos de rendimiento de extracción de ES, TOM y AS.				X								
Seminario IV				X								
Trabajo de investigación IV				X								
Validación del método, linealidad, sensibilidad y especificidad de la técnica.					X							
Seminario V					X							
Trabajo de investigación V					X							
Validación del método de exactitud y precisión, recuperación (eficacia de extracción) y estudio de sensibilidad.						X						
Seminario VI						X						
Trabajo de investigación VI						X						
Determinación de la estabilidad de las muestras almacenadas en congelamiento.							X					
Análisis farmacocinético, administración de las fracciones enriquecidas en los compuestos activos (ES, TOM y AS).								X				
Obtención de productos de excreción (orina y heces) y extracción de los compuestos activos ES, TOM y AS.									X			
Trabajo de investigación VII							X					
Cuantificación de ES, TOM y AS en plasma							X	X				
Trabajo de investigación VIII								X				
Trabajo de investigación IX.									X			
Envío del artículo (comprobante de enviado).									X			
Seminario VII									X			
Trabajo de redacción de Tesis I										X		
Análisis de muestras de heces y orina										X		
Trabajo de redacción de Tesis II											X	
Examen Pre-doctoral												x
Trabajo de redacción de Tesis III												X
Examen doctoral y disertación publica												X
Redacción de tesis y actualización bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

XIV. Anexo publicación

Jade Serrano-Román, Pilar Nicasio-Torres, Elizabeth Hernández-Pérez and Enrique Jiménez-Ferrer. **“Elimination pharmacokinetics of sphaeralcic acid, tomentin and scopoletin mixture from a standardized fraction of *Sphaeralcea angustifolia* orally administered”**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol 183 (2020) 113143.



Elimination pharmacokinetics of sphaeralcic acid, tomentin and scopoletin mixture from a standardized fraction of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don orally administered



Jade Serrano-Román^{a,b}, Pilar Nicasio-Torres^a, Elizabeth Hernández-Pérez^c, Enrique Jiménez-Ferrer^{a,*}

^a Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Argentina No. 1, CP 62790, Xochitepec, Morelos, Mexico

^b Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, Ciudad de México, Mexico

^c División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, 09340, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2019

Received in revised form 30 January 2020

Accepted 2 February 2020

Available online 3 February 2020

Keywords:

Anti-arthritis

Coumarins

Immunomodulatory

No-compartmental model

ABSTRACT

Sphaeralcea angustifolia (Cav.) G. Don (Malvaceae) is a plant used in inflammatory illnesses. The scopoletin was the main responsible compound for the anti-arthritis effect in this species. The therapeutic effectiveness of a *S. angustifolia* dichloromethane extract gel standardized in scopoletin was confirmed in patients with osteoarthritis. Cells in suspension cultures from *S. angustifolia* were established for scopoletin production; in addition, tomentin, and sphaeralcic acid compounds were isolated from this culture. Tomentin and sphaeralcic acid showed also anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Validation of HPLC quantification methods for sphaeralcic acid, and scopoletin and tomentin was performed in addition to extraction efficiency and stability of the active compounds. The pharmacokinetic parameters of scopoletin and tomentin in mixture, and sphaeralcic acid after oral administration of standardized active fraction indicated that these compounds followed a two-compartment model; they were bioavailable in plasma (absorbed) and distributed to blank organs. No products derived from their biotransformation were detected. The objective of this work was to determine the pharmacokinetic constants of urinary and fecal elimination in mice of the anti-arthritis compounds, after oral administration (400 mg / kg) of a standardized active fraction (SaTES) of *S. angustifolia*. It was established that the coumarin mixture (scopoletin and tomentin) were eliminated by the urine; while, sphaeralcic acid was mainly eliminated by fecal path, following both a non-compartmental behavior. No products derived from their biotransformation were detected.

© 2020 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Sphaeralcea angustifolia (Cav.) G. Don (Malvaceae) is a plant widely used in Mexican traditional medicine to treat illnesses that involve inflammatory processes as gum infection, hurts, fractures and wounds [1]. Pharmacological researches of dichloromethane extract from *S. angustifolia* aerial tissues showed anti-inflammatory and immunomodulatory activities on pro-inflammatory interleukin IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and anti-inflammatory interleukin IL-10 production in adjuvant-induced arthritic rats [2]. The scopoletin was the main responsible

compound of anti-arthritis effect in this species. Scopoletin elevated the mean body weight of adjuvant-induced arthritic rats; rats showed a near-normal histological architecture of the joints and a reduced new blood vessel formation in the synovial tissues. Furthermore, scopoletin downregulated the overexpression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and IL-6 in the synovial tissues [3]. A topical phytomedicine in a gel prepared with 1 % of dichloromethane extract of *S. angustifolia* aerial tissues standardized in scopoletin was evaluated in patients with osteoarthritis for 4 weeks [4]. Therapeutic effectiveness (89 %) in the patients treated with *S. angustifolia* gel was similar to therapeutic effectiveness of 2 % diclofenac gel (91 %). None of the treatments presented any adverse effects [4].

The cells in suspension from *S. angustifolia* cultivated in Erlenmeyer flasks and in stirred tank bioreactor have been already used

* Corresponding author.

E-mail address: enriqueferrer.mx@yahoo.com (E. Jiménez-Ferrer).

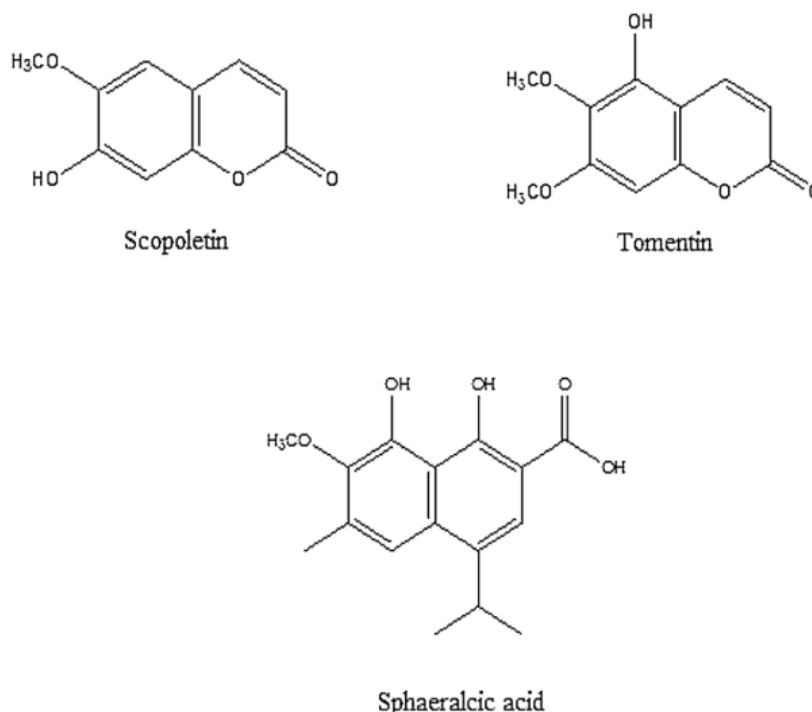


Fig. 1. Chemical structures of active compounds standardized in the SaTES fraction obtained from *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension [5] (Pérez-Hernández et al. 2014).

for scopoletin production; tomentin and sphaeralcic acid were isolated from this culture and they were also detected in the wild plant [5–7]. Dichloromethane extract from cells in suspension, tomentin and sphaeralcic acid showed anti-inflammatory activity and modulate pro-inflammatory IL-1 β , TNF- α and anti-inflammatory IL-4 and IL-10 production in kaolin/ λ -carrageenan arthritic mice. Chemical research (Fig. 1) leads to the conclusion that the main responsible for the anti-arthritic effect were scopoletin and tomentin, and sphaeralcic acid [4–6,8].

Validation of an analytical method by HPLC of active compounds for their determination in plasma was established. After a single oral administration in mice of SaTES standardized fraction from *S. angustifolia* cell suspension, and according to the pharmacokinetic behavior scopoletin, tomentin and sphaeralcic acid was adjusted to the two-compartment model, the compounds were bioavailable in plasma absorbed, and distributed to blank organs. No products derived from their biotransformation were detected (Data not reported). The elimination characteristics of a drug are important for a phytomedicine design, for that reason, it is important to identify the elimination *via* and pharmacokinetic parameters for scopoletin, tomentin and sphaeralcic acid after a single oral administration of SaTES standardized fraction in mice.

2. Material and methods

2.1. Cells in suspension culture of *Sphaeralcea angustifolia*

The *S. angustifolia* cell suspension was previously established from leaves of plants collected in the State of Hidalgo, Mexico, and botanically identified by Abigail Aguilar M.Sc. at the Mexican Institute of Social Security Herbarium IMSSM with code number 14,294 [5]. Cells in suspension in batch were cultivated in MS medium with total nitrate content reduced to 2.74 mM, supplemented with 1.0 mg/L of α -naphthaleneacetic acid plus 0.1 mg/L of kinetin, 30/L

of sucrose and growing at conditions already described for active compounds production in Erlenmeyer flasks of 1 L [5–7].

2.2. Preparation of SaTES active fraction

Dried biomasses (100 g) were extracted with 2 L of dichloromethane:methanol (1.8 L:0.2 L) for analysis (Merck, Mexico), three times by maceration at room temperature for 24 h each one. The extracts obtained were clarified through filter paper, pooled, and concentrated to dryness under reduced pressure [9].

The dichloromethane:methanol extract was fractionated by silica gel column chromatography (9 \times 28 cm, 70–230 mesh; Merck) employing a gradient system of n-hexane:ethyl-acetate grade-reactive solvents (Merck). Ten fractions of 200 mL from 50:50 and 60:40 gradient system with tomentin, scopoletin and sphaeralcic acid were integrated into SaTES active fraction [5]. SaTES fraction was analyzed by HPLC and standardized based on the content of tomentin and scopoletin in mixture and sphaeralcic acid.

2.3. Pharmacokinetic analysis

Female of ICR mice (30–35 g, Envigo, México City) were integrated in 10 animals per cage and preserved in the bioterium at 25 $^{\circ}$ C, with a 12 h light/dark cycle, and water and food (pellets from Harlan Rodent Lab Diet) *ad libitum* access. The ethical use of animals was done accordance with the Mexican Official Regulation, and the research protocol approved through the Local Committee for Research in Health, and Ethics from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) with a registration number R-2016-1702-10.

Each animal, from 2 groups of 10 mice, was put in a metabolic cage with free access to water and food. Mice were orally administered with a single dose (400 mg/kg) of SaTES active fraction standardized in tomentin and scopoletin in mixture (7 mg) and sphaeralcic acid (35 mg). The feces and urine were collected at the

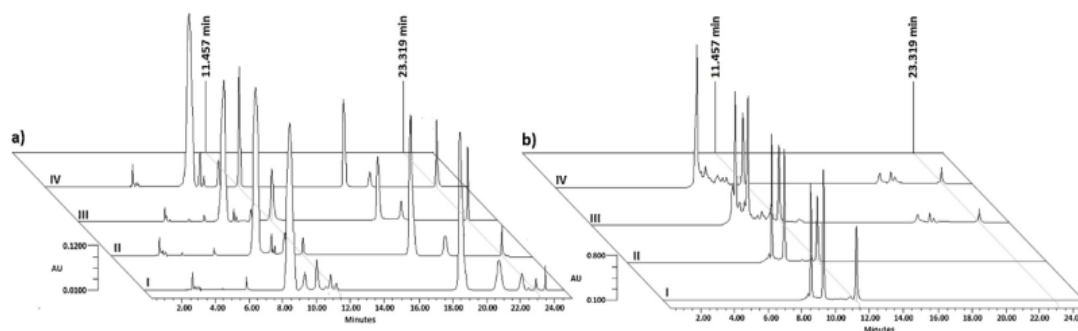


Fig. 2. Chromatographic profiles of tomentin and scopoletin in mixture ($rt=11.457$ min), and sphaeralcic acid ($rt=23.319$ min) detected in feces (a) and urine (b) extracts collected at (I) 4, (II) 8, (III) 12 and (IV) 24 h, after a single oral administration of standardized SaTES fraction obtained from *Sphaeralcea angustifolia* cell suspensions.

beginning of study and after 4, 8, 12 and 24 h, the fresh fecal weight and volume urine were recorded; subsequently, samples of feces and urine were frozen and lyophilized.

2.4. Extraction of active compounds in feces and urine

Samples of feces (100 mg) and urine were dissolved in 300 μ L of methanol and in sonication for 10 min (Branson ultrasonics 2800 H); after that, to each sample were added 2 mL of $\text{CH}_3\text{CN}:\text{TFA}-20\%$ (1:1), and shaken for 5 min (IKA MS1 Minishaker) and in maceration for 5 h at room temperature. Each sample extracted was clarified through filter paper (Whatman, 1001-055), the extracts were dry at room temperature and subsequently they dissolved in 1 mL of high purity methanol (Merck, Mexico) and filtered through Teflon membrane (13 mm, 0.45 μ m, Life Science) for HPLC analysis.

2.5. HPLC analyses

The sphaeralcic acid and tomentin and scopoletin in mixture determinations in the feces and urine extracts, were carried out according to the HPLC method and concentration curves previously established and validated according to the guidelines of analytical methods recognized by the Food and Drug Administration [10] (FDA, 2018).

Analyses of HPLC were carried out in a Waters system (2695 Separation Module) coupled to a diode array detector (2996) with a 190–600 nm detection range and operated by the Manager Millennium software system (Empower ver. 1; Waters Corporation, México). Separations were performed in a Spherisorb RP-18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; Waters Corporation) employing a constant temperature of 25 $^\circ\text{C}$ during the analyses. Samples (20 μ L) were eluted at a 1.0 mL/min flow rate with a gradient of mobile phases of (A) high-purity H_2O with TFA (0.5 %) and (B) high-purity CH_3CN (Merck), and compounds detected by monitoring absorbance for coumarins at $\lambda=340$ nm and for sphaeralcic acid at $\lambda=357$ nm. The chromatographic method had a run time of 25 min.

The identification of scopoletin (99 %; Sigma-Aldrich Química, México) and tomentin (93 %) in mixture, and sphaeralcic acid (95 %) was performed by comparing their retention times (tomentin and scopoletin mixture 11.4 min and sphaeralcic acid 23.3 min) and absorbance spectra. The concentration range for quantification of tomentin was 0.62–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, for scopoletin 1.25–20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and for sphaeralcic acid at 2.5–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The internal standard used was dopamine $rt=8.019$ min (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

The regression equation for tomentin was $(y)=162940(x)+1268.2$, $r^2=0.9994$; for scopoletin, it was $(y)=165407(x)+16720$, $r^2=0.9993$, and for sphaeralcic acid it was $(y)=7381.9(x)+1362.2$, $r^2=0.9998$, with a $r^2 > 0.99$. The LOQ

and LOD for sphaeralcic acid were 0.180 and 0.059 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a RSD 1.80 %; for tomentin they were 0.207 and 0.068 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a RSD 2.07 %; and for scopoletin were 0.421 and 0.139 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and RSD 4.21 %.

Quantification (LOQ) and detection (LOD) limits were calculated using the equations $\text{LOD}=3.3\sigma/s$; $\text{LOQ}=10\sigma/s$ (where s is the slope of the calibration curve and σ is the standard deviation of the slope), the relative standard deviation precision values (RSD < 15 %) were considered acceptable.

2.6. Pharmacokinetic parameters

The concentration values of tomentin and scopoletin in mixture and sphaeralcic acid obtained at 0, 4, 8, 12 and 24 h were expressed as the mean \pm Standard Deviation (SD). Pharmacokinetic parameters were determined using the PKSolver add-in program for Microsoft Excel written in Visual Basic for Applications [11] and selection was made either from a no-compartment model.

3. Results

3.1. Contents of tomentin and scopoletin mixture and sphaeralcic acid in mouse urine and feces

After oral administration of 400 mg/kg of SaTES active fraction containing 7 mg of coumarins mixture and 35 mg of sphaeralcic acid (Fig. 2). Tomentoin and scopoletin mixture was detected in urine from the first 4 h until 24 h; in feces, were detected at lower levels from 4 to 12 h, and at 24 h a cumulative concentration of them was seen. This behavior suggests that the coumarins elimination is primarily renal (Table 1, Fig. 3). Instead of, sphaeralcic acid concentrations in urine were lowest between the 12 and 24 h; the highest contents of this compound were detected in feces from 4 h to 24 h. Therefore, the main elimination path of sphaeralcic acid is hepatobiliary (Table 1, Fig. 4).

3.2. No-compartmental pharmacokinetic of sphaeralcic acid and coumarins

The non-compartmental analysis of sphaeralcic acid and scopoletin and tomentin in mixture after the single administration of the standardized SaTES fraction, does not assume any pharmacokinetic model, then the concentration of the compounds in feces and urine with respect to time were analyzed with algebraic equations.

The apparent elimination constants of first-order rate (λ_z), calculated from the decay phase in the semi-logarithmic curves of concentrations versus time, were similar for the compounds (Table 2): mixture of coumarins in urine and sphaeralcic acid in

Table 1

Excretion of coumarin mixture (tomentin and scopoletin) and sphaeralcic acid by urine and feces during the first 24 h, after a single oral administration (400 mg/kg) of standardized SaTES fraction.

Time (h)	Total urine mL	Total feces (mg)	µg/total urine		µg/total feces	
			Coumarins	Sphaeralcic acid	Coumarins	Sphaeralcic acid
0	0.00	0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
4	2.05	131.8	70.75 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.30 ± 0.03	25.97 ± 0.13
8	1.00	193.5	39.69 ± 0.09	0.00 ± 0.00	1.97 ± 0.03	64.99 ± 0.10
12	0.65	139.7	28.30 ± 0.10	3.15 ± 0.04	2.42 ± 0.09	42.49 ± 0.14
24	4.00	630.2	15.87 ± 0.11	1.25 ± 0.06	11.46 ± 0.14	20.55 ± 0.11

Two groups of 10 mice.

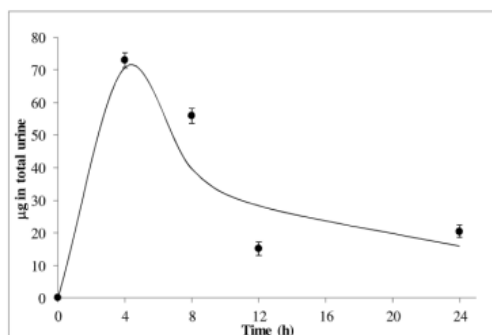


Fig. 3. Excretion of coumarin mixture (tomentin and scopoletin) in urine with respect to the time, after a single oral administration (400 mg/kg) of standardized SaTES fraction.

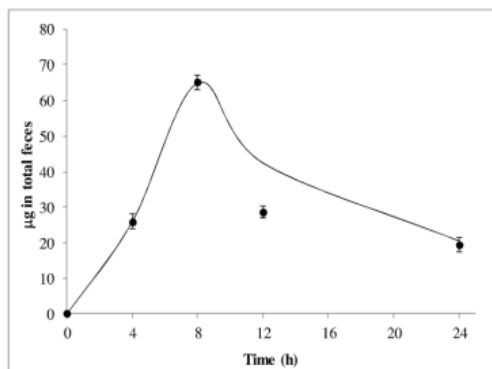


Fig. 4. Excretion of sphaeralcic acid in feces with respect to the time, after a single oral administration (400 mg/kg) of standardized SaTES fraction.

Table 2

Pharmacokinetic parameters in the non-compartmental model of coumarins mixture (tomentin and scopoletin) and sphaeralcic acid in the urine and feces of ICR mice, after oral administration of standardized SaTES fraction.

Non-compartment	Coumarin mixture Urine	Sphaeralcic acid Feces	Units
(λz)	0.064	0.066	1/h
t _{1/2}	10.909	10.506	h
T _{max}	4	8	h
C _{max}	73.08	65.235	µg/mL
C _{last,obs} /C _{max}	0.279	0.297	
AUC _{0-t}	759.082	693.001	µg/mL·h
AUC _{0-∞}	1080.345	986.321	µg/mL·h
AUC _{0-t/0-∞}	0.702	0.703	
AUMC _{0-∞}	20112.986	19457.701	µg/mL·h ²
MRT _{0-∞}	18.617	19.728	h
Vz/F	0.100	0.531	(mg)/(µg/mL)
Cl/F	0.006	0.035	(mg)/(µg/mL)/h

Two groups of 10 mice.

feces (0.064 and 0.066 h⁻¹, respectively). Median elimination times (t_{1/2}) of scopoletin/tomentin mixture in urine and of sphaeralcic acid in feces were also similar (10.909 and 10.506 h⁻¹, respectively). The half-life time is smaller because for each volume that is processed, the compound contained in that volume is eliminated. The t_{1/2} of elimination is influenced by distribution and clearance volumes (Vz / F), sphaeralcic acid was distributed 81.16 % more than the coumarins in mixture; in the same way, and the total apparent clearance (Cl/F) of sphaeralcic acid is greater than that of coumarins mixture, therefore to greater clarification. On the contrary, if the clearance is lower, as is the case with coumarins, its t_{1/2} will be higher (Table 2). This parameter is essential to know the dosing intervals of the compounds.

- "... sphaeralcic acid was distributed 81.16 % more than the coumarins in mixture" How do you explain this? Please write something for all those non accustomed to this argument.

- "in the same way, and the..." Possible writing mistake?

The T_{max} is the time at which a maximal concentration (C_{max}) is obtained, this occurs when the absorption rate is equal to the elimination rate. The C_{max} is related to the elimination route, the fecal route involves a more complex process, so any factor that influences the absorption constants and elimination rate will influence on the value of the T_{max}. According to the C_{max} of sphaeralcic acid reached at 8 h, it was proposed that sphaeralcic acid was eliminated by biliary excretion or by entero-hepatic paths, and not so much by the gastrointestinal route. Meanwhile, the renal elimination of coumarins showed a C_{max} at 4 h (Table 2). The apparent total clearances of compounds (Cl/F) as an indicative of the organism capability for compounds elimination indicate that sphaeralcic acid was removed by the liver through the bile; the clearance value of coumarin mixture was almost 6 times lower than that for sphaeralcic acid, indicating that their elimination is more efficient by the renal route.

The area under the curve (AUC) is a measure of bioavailability that relates the concentration variations at determined time (AUC_{0-t}) and at infinity (AUC_{0-∞}). The values of AUC_{0-t} / AUC_{0-∞} for sphaeralcic acid were lower than those determined for coumarins in mixture, probably due to elimination rout of sphaeralcic acid depends of its absorption in the gastrointestinal tract, beside the reached T_{max} for sphaeralcic acid was longer (Table 2).

Values of the last detectable concentration in relation to the maximal concentration (C_{last,obs}/C_{max}) were similar for coumarin mixture and sphaeralcic acid (Table 2). AUMC indicates the amount of compound that enters the first moment of the curve (bioavailability), which has reached the interior of the compartment at the first moment of the calculation, AUMC for mixed coumarins is higher than that for sphaeralcic acid (Table 2).

The median residence times (MRT_{0-∞}) is the time that the compounds need to leave from organism (Table 2). MRT value indicated that sphaeralcic acid needs 1 h more than the coumarins in mixture, since oral administration of standardized SaTES fraction and absorption of active compounds. Due to its greater distribution (Vz / F), the MRT value of sphaeralcic acid is higher than that of coumarins.

4. Discussion

This background supports the development of an oral standardized phytomedicine in scopoletin, tomentin and sphaeralcic acid active compounds. The route of administration mentioned is established by the Mexican Official Norm (NOM-248-SSA1-2011) and the Regulation of Health Supplies 2014 [4], which indicates that drugs of plant origin should be administered orally or topically. Besides, for phytomedicine registration it is necessary to perform pre-clinical studies that include studies of safety, compounds stability, pharmacological activity and pharmacokinetic analysis, among others, in order to provide quality products to the consumer. After oral administration of a standardized active fraction, scopoletin and tomentin in mixture, and sphaeralcic acid were bioavailable in plasma; the analysis of plasma extracts by UV spectra did not show products derived from their biotransformation. The active compounds' kinetics followed a two-compartment model (Data not reported).

The drug elimination is one of the most important phases of the pharmacokinetic analyses, which defines the behavior of the active compounds concentration in the plasma with respect to time [12]. The active compounds sphaeralcic acid and coumarins mixture were identified in feces and urine; it was possible to define that after their absorption and distribution in the organism, they had different elimination pathways, since the mixture of scopoletin and tomentine were eliminated by the renal route and the elimination of sphaeralcic acid was by the hepatobiliary route.

The analysis of urine and feces extracts by UV spectra did not show elimination products from scopoletin and tomentin. The renal elimination of intact drugs does not rule out that such substances can also be eliminated by biotransformation processes and that finally a substantial part of their inactive metabolites are eliminated by the kidney. The final amount of the coumarins mixture excreted in the urine are the result of glomerular filtration and tubular secretion, less tubular reabsorption [13]. Then, it is possible to establish, that coumarins were eliminated mainly by the renal route, since it was possible to detect these compounds within the parameters of LOQ and LOD in urine samples and not so much in feces, so it could be done the evaluation of concentration behavior in a temporary course. Therefore, it was possible to determine the pharmacokinetic parameters for renal elimination.

The elimination route of sphaeralcic acid was fecal. The body eliminates the drugs through feces by three different ways: the first way is through biliary excretion related to biotransformation processes of substances and biotransformation products [14]; this process not occurred for sphaeralcic acid due to it biotransformation products were not detected in feces. The second modality of fecal elimination is through the entero-hepatic circulation; in this process, during the intestinal transit of sphaeralcic acid, it is passively absorbed in the intestine, in favor of a concentration gradient. In this way, the active compound can be detected in the bloodstream and eventually transported to the liver, in principle by systemic circulation or an entire hepatic circulation process. In this way, the final disposition of sphaeralcic acid is by elimination into the intestinal lumen actively through the bile or intestinal epithelium. The time difference, between the intestinal absorption process and the final disposition corresponds to the residence time, which delays the fall in plasma concentrations and prolongs the duration of the effect [14].

The third way is through intestinal excretion. Sphaeralcic acid would pass directly through the gastrointestinal tract and without any alteration would be eliminated in feces. This compound is absorbed because it has been detectable in plasma. It is not possible to rule out any of the three modalities in the elimination of sphaeralcic acid in feces. However, it can be noted the following aspects: the difference between the amount of sphaeralcic acid adminis-

tered (34.56 mg/kg) in 400 mg of SaTES fraction and that recovered in feces (C_{max} 64.99 μg / total feces in a T_{max} of 8 h), which implies a difference of about three orders of magnitude, which makes us think that somewhere a large quantity of sphaeralcic acid must be distributed from the organism.

It can be argued that sphaeralcic acid is eliminated by biliary excretion or by entero-hepatic elimination. The prediction is based on the fact that for its elimination the following points should be considered: among the pharmacokinetic parameters it can be observed that the apparent volume of distribution during the terminal phase after non-intravenous administration (V_z/F_{obs}), sphaeralcic acid is distributed a 81 % more than the coumarins mixture, for this reason its elimination is slower and its C_{max} and T_{max} are affected which is reached at 8 h, 4 h after the coumarins in mixture.

Author contributions

As a Ph.D. student, Jade Serrano-Román, participated in all of the experimental work under the advice of the contributor's authors, in the collection, analysis and interpretation of data, and the writing the manuscript. Pilar Nicasio-Torres, performed the supervision of compound purification, standardization of the SaTES active fraction from the *S. angustifolia* cell suspension, analysis, and validation of analytical methods, as well as the writing of manuscript, and was the Thesis Co-Director of Ph.D. student. Elizabeth Hernández-Pérez, performed the analysis of the quality control process and was also the Thesis Co-Director of Ph.D. student. Enrique Jiménez-Ferrer participated in the conception and design of the study, participated in the pharmacokinetic analysis of the SaTES standardized fraction, revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript to be submitted.

Author statement

As a Ph.D. student, Jade Serrano-Román, participated in all of the experimental work under the advice of the contributor's authors, in the collection, analysis and interpretation of data, and the writing the manuscript. Pilar Nicasio-Torres, performed the supervision of compound purification, standardization of the SaTES active fraction from the *S. angustifolia* cell suspension, analysis, and validation of analytical methods, as well as the writing of manuscript, and was the Thesis Co-Director of Ph.D. student. Elizabeth Hernández-Pérez, performed the analysis of the quality control process and was also the Thesis Co-Director of Ph.D. student. Enrique Jiménez-Ferrer participated in the conception and design of the study, participated in the pharmacokinetic analysis of the SaTES standardized fraction, revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript to be submitted.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Basic Grant 286574 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México CONACyT-México for the Doctoral studies of Jade Serrano-Román at the Biological and Health Sciences Doctoral Program of UAM, and by Complementary Grant 99186328 from the IMSS. This research had financial support grants provided by the Health Research Fund of IMSS with registration number FIS/IMSS/PROT/G17/1683.

The data were analyzed by the Pk Solver in the non-compartmental model. To establish the behavior of the concen-

tration variation of coumarin mixture and sphaeralcic acid in urine and feces, the following functions were used: λz is the first order rate constant of elimination curves (log-lineal) (1/h); $t_{1/2}$ is the half time of elimination (h); T_{max} is the time of maximal concentration (h); C_{max} is the maximal concentration ($\mu\text{g/mL}$); $C_{last-obs}/C_{max}$ is the last observed concentration/maximal concentration; $AUC_{0 \rightarrow t}$ and $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ are the areas under curve (AUC) from 0 to 24 h and from 0 to infinitum ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$); $AUMC_{0 \rightarrow \infty}$ are the areas under curve (AUMC) from 0 to infinitum ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}^2$); $MRT_{0 \rightarrow \infty}$ is the average residence time observed from 0 to infinitum (h); V_z/F is the apparent volume of distribution during the terminal phase after non-intravenous administration ($(\text{mg})/(\mu\text{g/mL})$); Cl/F_{obs} is the apparent total clearance of the compound in the organism after oral administration ($(\text{mg})/(\mu\text{g/mL})/\text{h}$).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113143>.

References

- [1] A. Argueta, L. Cano, M. Rodarte, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, in: BIBLIOTICA DIGITAL de la Medicina Tradicional Mexicana, 1ra edición, 1994, <http://dx.doi.org/10.1006/excr.1995.1263>, Ciudad de México.
- [2] M. Juárez-Ciriaco, R. Román-Ramos, H. González-Márquez, M. Meckes-Fischer, Efecto de *Sphaeralcea angustifolia* sobre la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias, *Lab- Ciencia*, 2 (2008) 21–23.
- [3] R. Pan, X.H. Gao, Y. Li, Y.F. Xia, Y. Dai, Anti-arthritis effect of scopoletin, a coumarin compound occurring in *Erycibe obtusifolia* Benth stems, is associated with decreased angiogenesis in synovium, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24 (2010) 477–490, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00784.x>.
- [4] O. Romero-Cerecero, M. Meckes-Fischer, A. Zamilpa, J. Enrique Jiménez-Ferrer, P. Nicasio-Torres, D. Pérez-García, J. Tortoriello, Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis, *J. Ethnopharmacol.* 147 (2013) 467–473, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.040>.
- [5] J. Pérez-Hernández, M. González-Cortazar, S. Marquina, M. Herrera-Ruiz, M. Meckes-Fischer, J. Tortoriello, F. Cruz-Sosa, M.D.P. Nicasio-Torres, Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*, *Planta Med.* 80 (2–3) (2014) 209–214, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1360302>.
- [6] M. Nicasio-Torres, J. Pérez-Hernández, M. González-Cortazar, M. Meckes-Fischer, J. Tortoriello, F. Cruz-Sosa, Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don, *Acta Physiol. Plant.* 38 (209) (2016) 1–11, <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-016-2211-x>.
- [7] M.P. Nicasio-torres, J. Serrano-román, E. Jiménez-ferrer, M. Herrera-ruiz, Effect of dichloromethane-methanol extract and tomentin obtained from *Sphaeralcea angustifolia* cell suspensions in a model of Kaolin/Carrageenan-Induced arthritis, *Planta Med. Int. Open* 4 (2017) 35–42, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-108760>.
- [8] R.V. García-Rodríguez, G. Chamorro Cevallos, G. Siordia, M.A. Jiménez-Arellanes, M.A. Chávez-Soto, M. Meckes-Fischer, Extracto de *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don, un potencial fitofármaco para tratar la inflamación crónica, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas* 11 (5) (2012) 454–463.
- [9] J. Pérez-Hernández, Mdel P. Nicasio-Torres, L.G. Sarmiento-López, M. Rodríguez-Monroy, Production of anti-inflammatory compounds in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension cultivated in stirred tank bioreactor, *Eng. Life Sci.* 19 (2018) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201800134>.
- [10] FDA, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics – Guidance for Industry, 2015, https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf.
- [11] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie, P.K. Solver, An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel, *Comput. Methods Programs Biomed.* 99 (3) (2010) 306–314, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>.
- [12] J.-P. Haberer, Principios de farmacocinética aplicados a la anestesia, *EMC-Anestesia-Reanimación* 42 (3) (2016) 1–15, [http://dx.doi.org/10.1016/s1280-4703\(16\)79272-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1280-4703(16)79272-3).
- [13] A. Aleixandre, M. Puerro, Absorción y distribución de los fármacos, *Farmacología básica* (2004) 1–35 <http://media.axon.es/pdf/69379.pdf>.
- [14] J. Flórez Beledo, Simón Armijo, Martínez Mediavilla, *Farmacología humana*, sexta edición, Elsevier Masson, 2013.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00091

Matrícula: 2153804447

Evaluación farmacocinética de una fracción estandarizada (escopoletina, tomentina y ácido sphaerálcico) obtenida de cultivos celulares de *Sphaeralcea angustifolia*, administrada vía oral en ratón.



Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 17 del mes de julio del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ
DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ
DR. FERNANDO RIVERA CABRERA
DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER
DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JADE LEONOR SERRANO ROMAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

JADE LEONOR SERRANO ROMAN
ALUMNA

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ

VOCAL

DR. FERNANDO DIAZ DE LEON SANCHEZ

VOCAL

DR. FERNANDO RIVERA CABRERA

VOCAL

DR. JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER

SECRETARIA

M^a. del Pilar Nicasio T.
DRA. MARIA DEL PILAR NICASIO TORRES