



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA**

P R E S E N T A

ARMANDO DANIEL RAMÍREZ HERNÁNDEZ

CODIRECTORES DE TESIS:

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO
DRA. ANGÉLICA FLORES FLORES

Cuernavaca,
2023

Morelos



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 17 de mayo de 2023
Folio: FF/M/SI/CIP/MF/087/2023

L.F. ARMANDO DANIEL RAMÍREZ HERNÁNDEZ
ALUMNO DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 17 de mayo de 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora de tesis y jurado para la tesis titulada **“Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”**.

Sinodal

Presidente	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez* ^{NA}
Secretario	Dr. Sergio Alcalá Alcalá* ^{NA}
Vocal 1	Dr. Rafael Villalobos Molina
Suplente 1	Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Suplente 2	Dra. Angélica Flores Flores

NA = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Adscripción

Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
FES IZTACALA, UNAM
CEIB-UAEM
INER

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Por una humanidad culta
una Universidad de Excelencia”

e-firma UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

ccp: archivo.

Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez; Sergio Alcalá Alcalá; Rafael Villalobos Molina; Dra. Irene de la Concepción Perea Arango; Dra. Angélica Flores Flores



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-05-18 09:46:34 | Firmante

ZLxXhalsCNoKZHV9B8OwkJzAUyqEF1m2+iFsTduLgy61KVxo3FOhaOW4WpNVHFmqxvtsMQNILvRe2+GxWIKtVvJCZtux+i7N7ArGRm07RMbAKQ0PQBnWbhqIm0mxEXosTf3RCdU01XjciXfXSX/AZmCPn9XYE5Jy4x/wgPJk0Uola9QYZt4KlwjM58NvKFRsYrIDHKVg/jvjBcHOXQA2skqDsSCq8lznFlfidd5wIEkxwnVpht23QUyozxc7M1O7WuquYh+iwV3NVTwaVNjmiS8fAG/tPB4aOwdHCkFnL3vV0UfKXO6ph+/uc6c2hH6kINSKY0Dau71OlvuLoXfQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[wcFkdE698](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/hWrQR60YZrswSBKpr4KxC2VjAMajlsx9>



“Aunque no tengamos el poder de elegir de dónde venimos, todavía podemos elegir a dónde vamos”

- Stephen Chbosky

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma de Morelos, por brindarme las instalaciones para poder desarrollar todo este proyecto.

A CONACYT por la beca otorgada con Número de CVU 1037856 y el financiamiento proporcionado a través del proyecto CONACYT FORDECYT-PRONACES (Ciencia de Frontera 377882/2020).

A los codirectores del proyecto Dr. Samuel Enoch Estrada Soto y la Dra. Angélica Flores Flores, por sus enseñanzas durante estos 2 años, y las facilidades para la realización de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Germán Bernal Fernández, Dra. Angélica Flores Flores y Dr. Samuel Enoch Estrada Soto. Por sus correcciones en estos dos años, cuestionamientos, pero, sobre todo gracias por sus grandes aportaciones a este proyecto.

Al M. en F. Emmanuel Gaona Tovar y la L. en F. Paulina Batalla Roldán. Por la elucidación de los compuestos, y por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A la M. en F. Monserrat Hernández Morales, por todo el apoyo incondicional a lo largo de mi estancia en la maestría, y por ayudarme en el análisis de datos.

DEDICATORIAS

A mi familia, por todo su apoyo y comprensión, ya que sin ellos no habría logrado nada de esto.

A los amigos que siempre estuvieron presentes, ustedes saben quiénes son.

Al Dr. Samuel, por su amistad, por haberme aceptado en su laboratorio, y por siempre confiar en mí.

A la Dra. Angélica Flores, por aceptar formar parte de este proyecto, y aunque gran parte de este estuvimos en pandemia, se pudo continuar trabajando aun a la distancia.

A todos mis compañeros del L-10 que siempre estuvieron ahí para hacer más agradables los días de trabajo.

ÍNDICE

I. Lista de abreviaturas	7
II. Lista de figuras	9
III. Lista de gráficas.....	10
IV. Lista de tablas	11
V. RESUMEN	14
VI. ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1.1. Sistema respiratorio.....	18
2.1.2. Asma	19
2.1.3. Musculatura lisa de las vías aéreas	21
2.1.4. Fisiopatología del asma.....	22
2.1.5. Tratamientos del asma.....	24
2.2.1. Medicina Tradicional	26
2.2.2. Familia <i>Papaveracea</i>	26
2.2.3. Composición fitoquímica.....	28
2.2.4. <i>Bocconia arborea</i>	32
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVO GENERAL	34
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. METODOLOGÍA.....	35
6.1.1. Recolección del material vegetal	35
6.1.2. Obtención de los extractos orgánicos.....	35
6.1.3. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de <i>Bocconia arborea</i>	36
6.2. Preparación del reactivo: Dragendorff.....	36
6.3. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta	36
6.4. Evaluación farmacológica en modelo <i>ex vivo</i>	37
6.4.1. Obtención de la tráquea.....	37
6.4.2. Sistema de determinación del efecto tráqueo-relajante, registro de datos..	37
6.4.3. Evaluación del sistema tráqueo-relajante.....	38
6.4.4. Análisis estadístico	38

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1. Obtención de los extractos orgánicos de <i>Bocconia arborea</i>	39
7.2. Determinación cualitativa por cromatografía en capa fina (CCF)	40
7.3. Curvas concentración respuesta de los extractos orgánicos de corteza de <i>B. arborea</i>	41
7.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto diclorometánico corteza de <i>Bocconia arborea</i>	43
7.5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto diclorometánico de fruto <i>Bocconia arborea</i>	45
7.6. Determinación del efecto tráqueo-relajante de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del ED de corteza.	50
7.7. Determinación del efecto tráqueo-relajante de las moléculas obtenidas de <i>B. arborea</i>	51
7.8. Determinación del efecto tráqueo-relajante de Angolina.	54
7.9. Determinación del mecanismo de acción de Angolina.....	55
7.9.1. Participación de los receptores muscarínicos.	55
7.9.2. Participación de los receptores β_2 -adrenérgicos.	57
7.9.3. Participación de las Fosfodiesterasas.....	59
7.9.4. Participación de los canales de K^+	62
7.9.5. Participación de los canales de Ca^{2+} activados por KCl.....	63
7.9.6. Participación de los canales de Ca^{2+}	64
8. CONCLUSIONES.....	66
9. BIBLIOGRAFÍA	67

I. Lista de abreviaturas

Ang	Angolina
ATP	Adenosina trifosfato
<i>B. arborea</i>	<i>Bocconia arborea</i>
<i>B. frutescens</i>	<i>Bocconia frutescens</i>
BA	Bocconarborina A
CCF	Cromatografía en capa fina
CE₅₀	Concentración efectiva media
CNK	Células <i>natural killer</i>
DHS	Dihidrosanguinarina
ED	Extracto Diclorometánico
EH	Extracto Hexánico
EM	Extracto Metanólico
E_{max}	Efecto Máximo
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
GINA	Global Initiative for Asthma
GMP	Guanosina monofosfato
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
HRB	Hiperreactividad bronquial
ICS	Corticoesteroides inhalados (Por sus siglas en inglés: Inhaled Corticosteroids)
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
LTH2	Linfocitos T-CD4 positivos tipo 2

MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
NO/GCs	Óxido nítrico/Guanilato ciclasa soluble
NOS	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OQ	Oxiqueleritrina
OS	Oxisanguinarina
v/v	Volumen/volumen
VA	Vías aéreas

II. Lista de figuras

Fig.1. Clasificación anatómica de las vías aéreas.....	¡Error! Marcador no definido.8
Fig.2 Esquema de la sensibilización y reexposición a los alérgenos.....	23
Fig.3. <i>Bocconia arborea</i> , y sus partes aéreas.....	28
Fig.4. Estructura base de los alcaloides tipo benzofenantridina.	29
Fig.5. Alcaloides identificados por cromatografía de gases en la corteza de <i>B. arborea</i>	31¡Error! Marcador no definido.
Fig.6. Estabilización, sensibilización y evaluación del efecto tráqueo-relajante en anillos de tráquea aislada de rata contraídos con carbacol.	37
Fig.7. Placas comparativas de los extractos orgánicos de corteza y fruto de <i>B. arborea</i> en un sistema 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol v/v.....	40
Fig. 8. Fraccionamiento primario del ED de corteza de <i>B. arborea</i>	43
Fig. 9. Placas comparativas del fraccionamiento de corteza de <i>B. arborea</i> en un sistema 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol.....	44
Fig.10. Fraccionamiento primario del ED de fruto de <i>B. arborea</i>	46
Fig.11. Obtención del alcaloide Oxisanguinarina a partir del ED de fruto de <i>B. arborea</i>	48
Fig. 12. Identificación de oxisanguinarina con reactivo Dragendorff.....	49
Fig.13. Punto de fusión de Oxisanguinarina (>300°C).....	50
Fig.14. Cromatografía de los compuestos aislados del EDC de <i>B. arborea</i> y su estructura. 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol.	52

III. Lista de gráficas

Gráfica 1. Efecto tráqueo-relajante de los extractos orgánicos de corteza de <i>B. arborea</i> vs. Teofilina en anillos de tráquea aislada de rata, sobre la contracción inducida por carbacol [1µM].	42
Grafica 2: Efecto tráqueo-relajante de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de corteza de <i>B. arborea</i> en anillos de tráquea aislada de rata, sobre la contracción inducida por carbacol [1µM].	51
Grafica 3: Efecto traqueorelajante de los compuestos aislados de <i>B. arborea</i> a 150 (µM) en anillos de tráquea aislada de rata, sobre la contracción inducida por carbacol [1µM].	53
Grafica 4: Efecto tráqueo-relajante de los compuestos aislados de <i>B. arborea</i> a 50 (µM) en anillos de tráquea aislada de rata, sobre la contracción inducida por carbacol [1µM].	54
Gráfica 5: Efecto tráqueo-relajante de Angolina en anillos de tráquea aislada de rata pre-contráidos con carbacol [1µM].	55
Gráfica 6: Efecto de la CE ₅₀ [160.76± 7.15 µM] de Angolina en la contracción inducida por carbacol, sobre anillos de tráquea aislada de rata.	57
Gráfica 7: Efecto del Isoproterenol en la relajación de Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.	59
Gráfica 8: Efecto de la Teofilina en la relajación de Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.	60
Gráfica 9: Efecto de L-NAME y ODQ en la relajación de Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.	62
Gráfica 10: Efecto del TEA en la relajación de Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.	63
Gráfica 11: Efecto tráqueo-relajante de Nifedipina y Angolina posterior a la contracción inducida por KCl sobre anillos de tráquea aislada de rata.	64
Gráfica 12: Efecto de la CE ₅₀ [160.76± 7.15 µM] de Angolina en la contracción inducida por CaCl ₂ [80 mM], sobre anillos de tráquea aislada de rata.	65
Gráfica 13: Efecto de Angolina a 50 y 90 µM en la contracción inducida por CaCl ₂ [80 mM], sobre anillos de tráquea aislada de rata.	66

IV. Lista de tablas

Tabla 1. Tratamiento escalonado para el asma. Recuperado y modificado de (Global Initiative for Asthma, 2022).	24
Tabla 2. Pesos y rendimientos de los extractos orgánicos de <i>B. arborea</i>.	39
Tabla 3. Fracciones finales y pesos obtenidos del fraccionamiento primario del ED de corteza de <i>B. arborea</i>	43
Tabla 4. Compuestos obtenidos por precipitación espontánea del fraccionamiento primario en columna abierta del ED de corteza de <i>B. arborea</i>.	44
Tabla 5. Fracciones finales y pesos obtenidos del fraccionamiento primario del ED de fruto de <i>B. arborea</i>.	45-46

V. RESUMEN

Las enfermedades respiratorias representan una carga económica de gran peso para la sociedad en general. El asma, figura como una de las más comunes. Esta es caracterizada por diferentes signos y síntomas entre ellos sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos. Es una de las enfermedades más difíciles de diagnosticar, ya que la mayoría de los pacientes asmáticos son infantes. Dicha patología posee tratamiento farmacológico, pero debido a los efectos adversos de los fármacos, la complejidad del padecimiento e incluso factores económicos, la población se inclina por el uso de la medicina herbolaria, por su disponibilidad, fácil acceso, etc. Dada la alta demanda de la medicina tradicional, y al uso indiscriminado de esta, es importante estudiar las plantas medicinales, con el fin de darles un sustento científico que garantice su uso, además de poder obtener moléculas con actividad farmacológica de interés.

Tal es el caso de *Bocconia arborea*, la cual tiene uso etnomédico para tratar afecciones de la piel, contrarrestar picaduras de araña, y como antidiabético. Además, el equipo de trabajo del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto ha estudiado esta planta. Gaona-Tovar, obtuvo los extractos de corteza y hoja, además demostró que poseen un efecto tráqueo-relajante sobre la musculatura lisa. Adicionalmente, Martínez-Cuevas determinó el efecto antidiabético y toxicológico de los extractos de *B. arborea* y pudo identificar a dihidrosanguinarina por difracción de rayos X. Posteriormente, en un estudio fitoquímico del extracto metanólico de corteza, se aisló dihidrosanguinarina y angolina, este último tuvo efecto relajante sobre la musculatura lisa.

Con estos antecedentes, el presente trabajo tiene como objetivo continuar estudiando las partes aéreas de *B. arborea*, y encontrar compuestos bioactivos que sirvan como prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos con mecanismo de acción novedoso. Por ello, se determinó el efecto tráqueo-relajante de los extractos orgánicos de corteza de *B. arborea*. Los extractos diclorometánico ($E_{max}= 100.00 \pm 1.12 \%$, $CE_{50}= 77.20 \pm 6.65 \mu\text{g/mL}$) y metanólico ($E_{max}= 100.00 \pm 5.23 \%$, $CE_{50}= 78.14 \pm 5.68 \mu\text{g/mL}$) alcanzaron el 100% de relajación. Posterior

a ello, se hizo un fraccionamiento primario del extracto diclorometánico, para aislar las moléculas responsables de esa actividad. A partir del fraccionamiento se obtuvieron 6 fracciones finales, además de dihidrosanguinarina, bocconarborina A, y angolina. A partir del fraccionamiento secundario de la fracción 4, se obtuvieron 2 compuestos más, oxisanguinarina, y oxiqueleritrina, en colaboración con Batalla-Roldán. A los 5 compuestos se les determinó el efecto tráqueo-relajante dictaminando a angolina como el más activo. Además de que se estableció el mecanismo de acción del compuesto, el cual actúa a través de un bloqueo de los canales de calcio.

Asimismo, para corroborar si los compuestos estaban presentes en otras partes de la planta, se decidió evaluar los frutos de *B. arborea*. Se implementó un fraccionamiento primario y se evidenció la presencia de oxisanguinarina. Finalmente, los resultados sugieren que los compuestos son dependientes de la concentración, y podrían tener sinergismo al encontrarse en el extracto integro.

VI. ABSTRACT

Respiratory diseases represent an economic burden for society in general, and asthma is listed as one of the most common. This pathology is characterized by different signs and symptoms including wheezing, shortness of breath, chest tightness and cough. It is one of the most difficult diseases to diagnose because most asthmatic patients are infants. Currently, asthma has pharmacological treatment, but due to the side effects of the drugs, complexity of the condition and even economic factors, population prefer the use of herbal medicine, due to its availability, easy access, etc. Because of the high demand of traditional medicine, and its indiscriminate use, it is important to study medicinal plants, to give them scientific support that guarantees their use, and obtain molecules with pharmacological activity of interest.

That is the case of *Bocconia arborea*, which has ethnomedical use to treat skin conditions, counteract spider bites, and as an antidiabetic. In addition, the Lab-team of Dr. Samuel Enoch Estrada Soto has studied this plant. Gaona-Tovar obtained the bark and leaf extracts and demonstrated their trachea-relaxant effect on the smooth muscle. Additionally, Martínez-Cuevas determined the antidiabetic and toxicological effect of the extracts of *B. arborea* and was able to identify dihydrosanguinarine through X-ray diffraction analysis. Subsequently, in a phytochemical study of the methanolic extract of the bark, it was possible to isolate dihydrosanguinarine, and angoline, this latter compound shown relaxant effect on the smooth muscle.

With this background, this present work aims to continue studying the aerial parts of *B. arborea* and isolate bioactive compounds that can be use as prototypes for the development of new drugs with novel mechanism(s) of action. Therefore, the trachea-relaxant effect of the organic bark extracts of *B. arborea* was determined. The dichloromethane ($E_{max}= 100.00 \pm 1.12\%$, $EC_{50}= 77.20 \pm 6.65 \mu\text{g/mL}$), and methanolic ($E_{max}= 100.00 \pm 5.23\%$, $EC_{50}= 78.14 \pm 5.68 \mu\text{g/mL}$) extracts reached 100% relaxation. After that, a primary fractionation of the dichloromethane extract was carried out, to isolate the molecules responsible of the activity mentioned.

From this fractionation, it was possible to obtain 6 final fractions, and 3 compounds: dihydrosanguinarine, bocconarborine A, and angoline. From the secondary fractionation of the F4, it was possible to obtain 2 compounds, oxysanguinarine, and oxychelerythrine, in collaboration with Batalla-Roldán. The trachea-relaxant effect of the 5 compounds was determined, where angoline was the most active. In addition to establish the mechanism of action of the mentioned compound, several experiments were carried out, and the results showed that angoline acts through a blockade of calcium channels.

Also, to corroborate if the compounds were present in other parts of the plant, it was decided to evaluate the fruits of *B. arborea*. A primary fractionation was implemented and showed the presence of oxysanguinarine.

Finally, the results suggest that the compounds dependent of the concentration and could have synergism when found in the whole extract.

1. INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad heterogénea, frecuentemente caracterizada por inflamación crónica de las vías aéreas (VA). Es definida por los síntomas que se presentan, tales como: sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y tos. Esos síntomas son muy variables, puesto que la intensidad y el tiempo en el que ocurren dependen de cada paciente. Asimismo, se observa hiperrespuesta bronquial, obstrucción variable al flujo aéreo que puede ser total o parcial, y que se da de manera reversible (Global Initiative for Asthma, 2022) (Guía española para el manejo del asma, 2020).

En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que hay 235 millones de personas con asma en el mundo (OMS, 2020). Aunque el asma es una enfermedad que no tiene cura, podemos mencionar el tratamiento existente para disminuir la sintomatología. Existen 2 tipos de tratamientos: farmacológico y no farmacológico (Larenas-Linnemann et al, 2017). Primordialmente se debe seguir el tratamiento no farmacológico, el cual incluye la evaluación exhaustiva de los factores de riesgo que son prevenibles y estrictamente evitados, para impedir las crisis y/o agravar el asma en los pacientes, así como evitar las visitas no planificadas al hospital (Núñez, 2010). El tratamiento farmacológico incluye broncodilatadores y medicamentos antiinflamatorios, además de las medidas educativas y ambientales efectivas para muchos pacientes asmáticos. Sin embargo, algunos pacientes con asma grave o que no tienen control adecuado de su enfermedad, responden mal a estos medicamentos, y por lo tanto la búsqueda de fármacos es imprescindible (Camoretti-Mercado, 2009).

Una fuente importante de donde se obtienen moléculas bioactivas son las plantas medicinales. Además, en zonas rurales de países en desarrollo, o en lugares de difícil acceso a los medicamentos modernos, la población confía en la medicina tradicional herbolaria, ya que también es parte del conocimiento etnomédico transmitido de generación en generación (Azman, 2021).

“Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”

Por ello, es imprescindible la búsqueda de fármacos a partir de plantas medicinales, para su sustento científico; además de poder encontrar moléculas bioactivas con mecanismo de acción novedoso. Dadas las razones anteriores, el objetivo del proyecto es enriquecer el conocimiento sobre la especie medicinal *Bocconia arborea* (*B. arborea*), así como establecer la actividad farmacológica de algunos de sus metabolitos.

2. ANTECEDENTES

2.1.1. Sistema respiratorio

El aparato respiratorio tiene como función principal la homeostasis entre el dióxido de carbono y el oxígeno, este último es utilizado por las células para las reacciones metabólicas que liberan energía y producen adenosina-trifosfato (ATP). Además de intervenir en el intercambio gaseoso, también participa en la regulación del pH sanguíneo. El aparato respiratorio está conformado por la nariz, la faringe (garganta), la laringe (caja de resonancia u órgano de la voz), la tráquea, los bronquios y los pulmones (Tortora, 2002).

Además, el aparato respiratorio también se subdivide en vía aérea alta: cavidad nasal, faringe y laringe, y vía aérea baja: tráquea, bronquios y alvéolos (Fig. 1) (Sánchez, 2018).

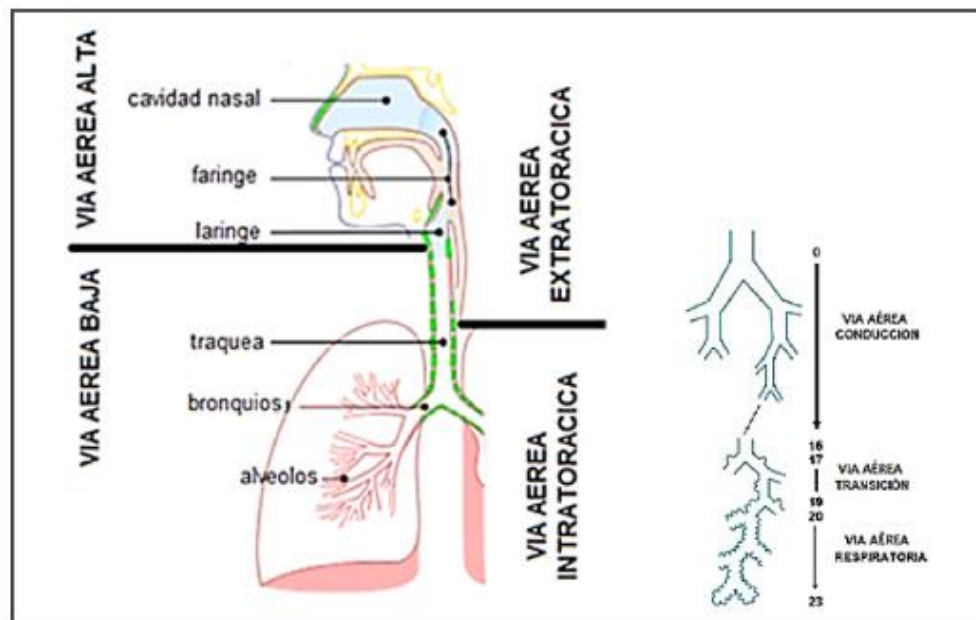


Fig.1. Clasificación anatómica de las vías aéreas. Tomado de (Sánchez, 2018).

La tráquea es parte de las vías aéreas bajas, representa la entrada del árbol tráqueo-bronquial, y se caracteriza por sus anillos de cartílago en forma de “C”, que otorgan rigidez y evitan su colapso al momento de respirar (Sánchez, 2018).

La tráquea, componente principal del sistema respiratorio, está conformada en su mayoría por células del músculo liso, las cuales pueden contraerse, generar fuerza, y ser excitados eléctricamente. Algunas de estas pueden permanecer contraídas durante tiempos prolongados ya que poseen proteínas como actina, desmina, integrina, etc. (Bordoni, 2019).

2.1.2. Asma

Existe una gran variedad de enfermedades que afectan al sistema respiratorio, como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma y actualmente, COVID-19 (Palacios-Cruz, 2021). Sin embargo, la principal enfermedad respiratoria que afecta de manera indiscriminada en todas las edades es el asma, especialmente a infantes, donde se reportan la mayoría de los casos, además el estudio de Global Burden of Disease Study estimó que en 2019 había 262 millones de personas que padecían asma, equivalente a 3416 casos por cada 100,000 habitantes (The Global Asthma Report., 2022).

Esta enfermedad es causa de ausencia escolar infantil, hospitalizaciones cuando no se lleva un control adecuado, y en casos extremos, la muerte. Este padecimiento respiratorio conlleva signos y síntomas notorios, como lo son jadeos (respiración cansada), sibilancias (sonido silbante durante la respiración), opresión torácica y tos. Los cuales son intensidad variada y en diferentes momentos del día. (Global Initiative for Asthma, 2022). Además, el asma tiene estrecha relación con la inflamación de las VA, ocasionando que el músculo liso de las VA se vuelva “inestable” y responda de forma exagerada a estímulos diversos como el aire frío, el ejercicio, el estrés, los agonistas colinérgicos, e histamina, que disminuyen el calibre bronquial y dificultan el flujo del aire (INER, 2017). La inflamación involucra una compleja interacción de células con la proliferación y activación de los linfocitos T-CD4 positivos tipo 2 (LTH2), las cuales secretan numerosas interleucinas importantes en la fisiopatología del asma, como la IL-4 e IL-13 que aumentan la hiperreactividad bronquial (HRB).

Asimismo, se ha descubierto que la inflamación crónica en el asma conlleva a un remodelado de las VA, y posiblemente también del parénquima (tejido encargado del intercambio gaseoso), que finalmente termina en pérdida progresiva de la función pulmonar. Se ha encontrado que la IL-5, provoca metaplasia en el tejido bronquial, siendo responsable de la remodelación (Roldán-Bretón, 2015) (Martínez-Ramírez, 2006) . La HRB, también es causa de los cambios estructurales en las VA y, junto con la inflamación crónica, generan la remodelación de estas vías, en donde se engrosan de esta y provocan la disminución permanente de su calibre, es decir, habrá limitación irreversible al flujo de aire (Cobos, 2003) (Díaz, 2006).

Debido a que es una enfermedad multifactorial, hay diferentes causantes que predisponen o son los responsables de provocarla, entre los que destacan:

- Genéticos
- Sexo
- Alérgenos
- Dieta
- Contaminación ambiental
- Tabaco
- Obesidad
- Infecciones (Sanchez-Cuellar, 2013).

Sin embargo, hoy en día se sabe que los genes son importantes en el asma, pero es necesaria la participación de otros detonantes para determinar el tipo de asma desarrollada, así como el pronóstico y el tratamiento (Aguilar, 2009).

Indagando entre los factores genéticos, el asma se relaciona con cromosomas y genes que generan esta enfermedad; aunque no existe un patrón hereditario que se pueda definir por completo, ya que se han reportado más de 100 genes asociados al asma en diferentes *loci* (Aguilar, 2009).

Esta patología resulta ser muy heterogénea, ya que abarca diferentes fenotipos (características derivadas de la combinación de diversos factores ambientales y

hereditarios) y endotipos (definidos por mecanismos fisiopatológicos) del asma. No obstante, debemos resaltar el factor alérgico, ya que el asma de mayor prevalencia es la del tipo alérgica, donde hay alta concentración de LTH2, además de inmunoglobulina E (IgE) específica (Lacoba-Garrido, 2022).

2.1.3. Musculatura lisa de las vías aéreas

El músculo liso de las vías aéreas (MLVA) se ubica en la porción posterior de las vías respiratorias, en las centrales cartilaginosas y en las más pequeñas ubicadas en el pulmón distal, es decir, este tejido está distribuido a lo largo del aparato respiratorio. El mecanismo del MLVA es de suma importancia, ya que enfermedades respiratorias como el asma, se asocian con la desregulación de su función. El aumento de la reactividad del MLVA a los agonistas contráctiles se denomina hiperreactividad de las vías respiratorias, 2 moléculas importantes para la hiperreactividad son la histamina y la metilcolina, ya que obstruyen los conductos aéreos, que es un síntoma característico del asma (Bolton, 2018) (Lam, 2019).

Asimismo, el MLVA tiene un tono intrínseco que puede alterarse por la liberación de agonistas como la acetilcolina, que lo mantiene estable a través de los receptores muscarínicos (Lam, 2019). El tono o grosor de la tráquea y los bronquios es controlado por el nervio vago, que hace que los nervios parasimpáticos provoquen la apertura base, que es estable pero fácilmente reversible (Abad-Santos, 2003).

La acetilcolina es un neurotransmisor endógeno que se une a 2 receptores, los muscarínicos y los nicotínicos (Martínez-Sánchez, 2014). Para este proyecto abordaremos los receptores muscarínicos de acetilcolina. Existen 5 receptores: M1, M2, M3, M4, M5, y los M3 regulan músculo liso y se localizan de manera abundante en las células de las vías respiratorias (Kruse, 2012).

El mecanismo de contracción de la musculatura lisa está dado por la unión de un agonista (como la acetilcolina y análogos), a los receptores muscarínicos, esa unión induce la contracción del músculo liso de las vías respiratorias que dependen de Ca^{2+} . A través de las subunidades α de las proteínas G asociadas, el receptor muscarínico M3 activa la fosfolipasa C (PLC), que libera inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Posteriormente el IP_3 se une al receptor de IP_3 , induciendo la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático. El Ca^{2+} se une a calmodulina, conduciendo a la activación de la quinasa de cadena ligera de miosina, que fosforila la cadena ligera de la miosina, y en conjunción con actina forman el puente cruzado, generando la contracción. Por lo tanto, el bloqueo de estos receptores es importante en ciertas patologías como el asma y el EPOC, ya que se interviene directamente en el proceso contráctil (Gosens, 2006) (Renna, 2013).

2.1.4. Fisiopatología del asma

En la fisiopatología (estudio del funcionamiento de un organismo o de un tejido durante el curso de una enfermedad) del asma alérgica, se produce inflamación en las VA, en la que participan diferentes células inflamatorias, incluidos mastocitos, eosinófilos activados, células *natural killer* (CNK) y LTH2, que a su vez producen y liberan ~100 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, los cuales son responsables de la respuesta inflamatoria, y que se asocia con la HRB de la vía aérea, sin embargo, no ha sido aclarado completamente (Sanchez-Cuellar, 2013). En la Fig. 2 se muestra un esquema de la sensibilización y la re-exposición a los alérgenos. El primer proceso puede ocurrir durante la infancia. Las células presentadoras de antígeno de la mucosa bronquial capturan a los alérgenos y los presentan a los LTH2. Estas células producen diferentes interleucinas (IL), como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que a su vez promueven la producción de IgE por los linfocitos B. La IgE se une a su receptor de alta afinidad en los mastocitos, basófilos, eosinófilos y macrófagos. Durante la

fase de re-exposición, el alérgeno interactúa de forma muy rápida con las moléculas de IgE ya unidas a la membrana celular, induciendo la liberación de mediadores inflamatorios. (Sanchez-Cuellar, 2013) (Rodríguez, 2017).

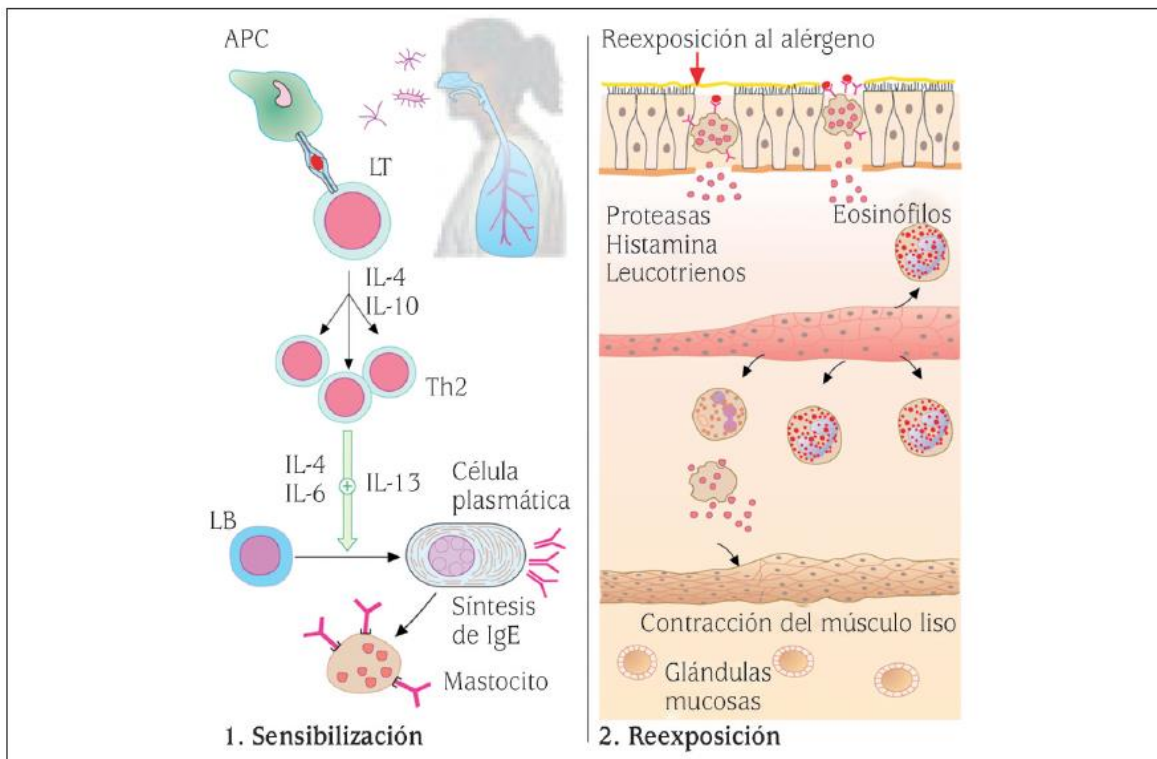


Fig.2 Esquema de la sensibilización y re-exposición a los alérgenos. Recuperado de (Sanchez-Cuellar, 2013).

Entre los mediadores inflamatorios más importantes está la histamina, ya que produce inflamación y estimula la constricción bronquial, la producción excesiva de moco, además de la atracción de otras células pro-inflamatorias (Martínez-Ramírez & Aviles-Salas, 2006).

Algunos tratamientos modernos, como los anti-IgE, enfocados en regular el proceso inflamatorio, permiten aliviar el asma de manera eficaz, además que han demostrado tener un mejor costo-beneficio en pacientes con asma no controlada; sin embargo, estos son costosos y se debe continuar buscando alternativas más asequibles (Sullivan, 2008).

2.1.5. Tratamientos del asma

En la actualidad, la OMS estima que hay ~235 millones de personas con asma en el mundo, lo cual la vuelve una enfermedad de importancia económica (OMS, 2020). Aunque el asma es una enfermedad que no tiene cura, existen tratamientos para disminuir la sintomatología, como el farmacológico y el no farmacológico (Larenas-Linnemann et al, 2017).

El objetivo principal de tratar el asma es: tener control adecuado, disminuir los síntomas, y evitar las exacerbaciones (episodios agudos de la enfermedad). Se recomienda a los pacientes seguir el tratamiento no farmacológico, ya que, aun cuando el tratamiento farmacológico es el principal método de alivio y control del asma, evitar la exposición a alérgenos y a los factores ambientales como el frío y la contaminación, reducirá las exacerbaciones (Núñez, 2010).

Adicionalmente, existen técnicas de rehabilitación respiratoria que ayudan al control, a reducir la hiperventilación y a fortalecer los pulmones, sin embargo, la literatura no permite recomendarlas sistemáticamente debido a la falta de evidencia científica (Everard, 2017).

Los fármacos empleados en tratar el asma se administran de manera escalonada, dependiendo del control y exacerbaciones en los pacientes. El siguiente cuadro representa los tratamientos utilizados para el control del asma (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamiento escalonado para el asma. Recuperado y modificado de (Global Initiative for Asthma, 2022) .	
Paso 1	Dosis bajas de Corticoesteroides inhalados (ICS) con formoterol según sea necesario.
Paso 2	Dosis bajas de ICS-formoterol según sea necesario.

Paso 3	ICS-formoterol de mantenimiento a dosis bajas.
Paso 4	Dosis intermedia de ICS-formoterol.
Paso 5	Tratamiento adicional: antagonista muscarínico de acción prolongada (anticuerpos monoclonales para neutralizar las IgE)

Para poder definir la gravedad del asma se toma en cuenta el tratamiento para mantener el asma controlada, es decir, si es el paso 1 es asma leve, ya que en promedio hay 1 o 2 síntomas por semana. De igual forma, aun es asma leve, cuando se encuentra en los pasos 2 y 3, aunque hay diferencia en la dosis para alcanzar dicha estabilidad. El paso 4 es asma moderada, y el paso 5 asma grave, siendo este el que se debe evitar por sus complicaciones (Larenas-Linnemann & Salas-Hernández, 2021).

El tratamiento, de acuerdo con la Global Initiative For Asthma (GINA), tiene que ajustarse al control y futuros riesgos que puedan ocurrir, además se evalúa que el tratamiento sea suficiente para que los pacientes hagan sus actividades diarias. Actualmente se recomienda el uso en conjunto con fármacos B₂-agonistas y ICS, ya que han mostrado mejor eficacia en el control del asma y menor riesgo de exacerbaciones (Global Initiative for Asthma, 2022). Los tratamientos más empleados son budesónida-formoterol y la dosis diaria máxima es 72 µg de formoterol, aunque esta dosis cambia cuando se usa formoterol con otro ICS, como ejemplo beclometasona-formoterol donde su dosis desciende a 48 µg de formoterol (Larenas-Linnemann & Salas-Hernández, 2021).

Debido a que el asma es una enfermedad crónica, el uso frecuente de estos fármacos es esencial su control adecuado. Sin embargo, hay factores que provocan el desapego al tratamiento, como, la complejidad del tratamiento, su costo, la percepción de efectos secundarios, la falta de supervisión parental (en pacientes pediátricos), aspectos emocionales, entre otros (Mackeeney, 2017).

2.2.1. Medicina Tradicional

Las personas se inclinan por el uso de plantas medicinales, con el amplio uso de extractos, tinturas, resinas, etc. Empleadas para tratar diferentes patologías, enfocadas en el bienestar individual y colectivo (Valdés-Cobos, 2013).

Actualmente la medicina tradicional es una opción importante para aliviar las distintas enfermedades que padece la población. Prieto-González 2004, menciona que la base de la medicina tradicional son las plantas medicinales. Estos productos vegetales han aumentado su uso en las terapias, debido al regreso hacia lo natural que la sociedad ha experimentado de forma general. Además, el uso frecuente se debe a la creencia errónea de que las plantas medicinales carecen de efectos adversos, que son adecuadas para cualquier tipo de paciente y que no requieren de una cuidadosa dosificación y seguimiento durante su utilización. Aunado a esto, el descubrimiento de efectos adversos dañinos en fármacos sintéticos ha propiciado el uso de plantas medicinales, sin embargo, no hay que olvidar que, aunque las drogas vegetales y sus derivados tienen un margen terapéutico amplio, aun así, hay efectos adversos, interacciones y contraindicaciones (Bucciarelli, 2014) (Prieto-González, 2004).

Asimismo, debido a que están en constante estudio, se posee un mejor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las moléculas obtenidas de plantas medicinales, ya hay métodos analíticos que facilitan el control de la calidad, nuevas formas de preparación y administración de los medicamentos fitoterapéuticos (Prieto-González, 2004).

2.2.2. Familia *Papaveraceae*

Las plantas medicinales son un pilar de la medicina tradicional para tratar diferentes patologías. Existen muchas familias de plantas en la medicina

herbolaria, una de gran importancia es la familia *Papaveraceae*, que ha sido ampliamente estudiada, además de ser conocida por la biosíntesis de metabolitos secundarios, específicamente alcaloides (Hernández-Martínez, 2020).

Esta familia está conformada por 59 géneros con ~950 especies distribuidas por las regiones templadas del hemisferio norte y algunas en el sur de África (Pino-Pérez, 2019). En esta familia se ubica el género *Bocconia*, representado en México por sus 2 especies más abundantes: *B. arborea* y *B. frutescens*. No obstante, hay otras especies como: *B. cordata*, *B. integrifolia*, *B. latisejala*, *B. laurine*, *B. microcarpa*, *B. pearcei* y *B. vulcanica* (Hernández-Almanza, 2016). *B. frutescens* se encuentra en varios estados de México: Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca (Sánchez-Arreola & al., 2006). *B. arborea* y *B. frutescens* son de gran importancia debido a su amplia distribución y a que se les ha atribuido diferentes propiedades farmacológicas, como la actividad antioxidante de *B. frutescens* (Aguirre, 2015), o para tratar la diabetes, atender problemas cutáneos, alivio de jotes y también contrarrestar la picadura de araña, la corteza y las hojas de *B. arborea* son hervidas para su uso en la medicina tradicional (Villareal, 2016). Así, se decidió buscar otros usos de *B. arborea* y se emplea para tratar la estomatitis y abscesos en la piel. En general, se utiliza el látex de la planta, de color amarillo/rojo, para aliviar esas afecciones, y además se usa para padecimientos renales (Monroy-Ortiz & Castillo-España, 2007). Entre los nombres populares de *B. arborea* están “llorasangre”, “Chicalote”, y otros. En el estado de Morelos a *B. arborea* se le nombra palo amarillo, palo de judas, palo del diablo y palo de toro, siendo así que el nombre es determinado por la zona donde crece. Es una planta en forma de arbusto o árboles de mediano tamaño (Fig. 3). Su corteza exuda látex amarillo/rojo que se libera al momento de su corte siendo característico (Monroy-Ortiz & Castillo-España, 2007).



Fig.3. *Bocconia arborea* y sus partes aéreas. Imagen propia.

2.2.3. Composición fitoquímica

La familia *Papaveraceae* produce alcaloides tipo isoquinolina, los cuales son relevantes por su estructura. Los alcaloides son moléculas de origen vegetal, nitrogenados, donde el nitrógeno está dentro de un ciclo, y puede ser primario, secundario o terciario, derivados generalmente de aminoácidos, y además poseen actividad farmacológica a dosis bajas (Robert, 2014) (Dewick, 2002). Dentro de las *Papaveraceas* hay especies como *Papaver somniferum*, que producen alcaloides de gran relevancia en el mundo, como morfina, heroína y codeína (opioides), lo que reitera la importancia de estudiar a las plantas medicinales productoras de alcaloides (Diego-Pérez, 2017).

De gran interés es el género *Bocconia* ya que, además de sus usos medicinales, antes mencionados, producen moléculas de tipo benzofenantridina, cuya base

estructural se muestra en la figura 4. Esas moléculas son derivadas de las bencilisoquinolinas (Dostál, 2002).

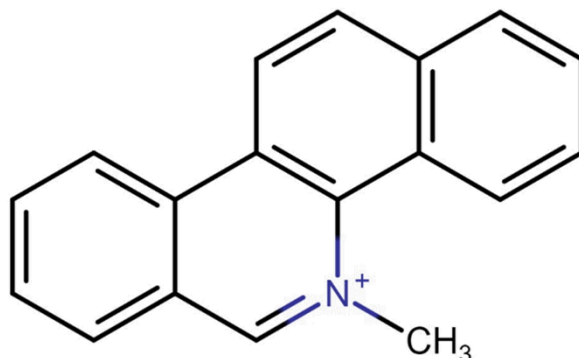
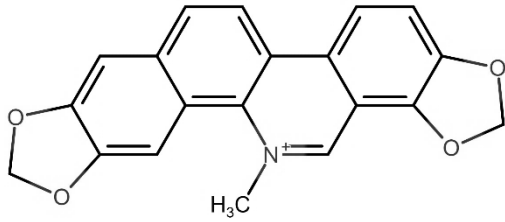
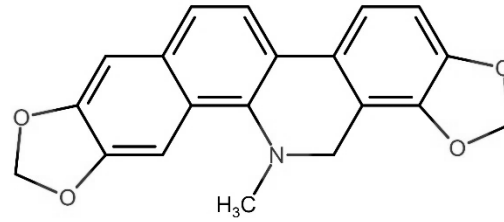


Fig. 4. Estructura base de los alcaloides tipo benzofenantridina (Dostál, 2002). Creado con Fisher Scientific.

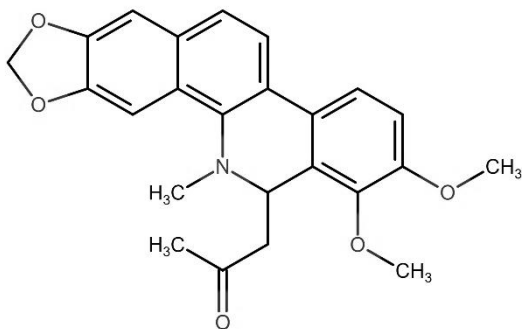
Entre las moléculas aisladas de *B. arborea* encontramos Sanguinarina, Dihidosanguinarina, Oxisanguinarina, Queleritrina, 11-Acetonildihidroqueleritrina, Dihidroqueleritrina, Queleritridimerina, Angolina, entre otras (fig. 5) (Perez-Gutierrez, 2002).



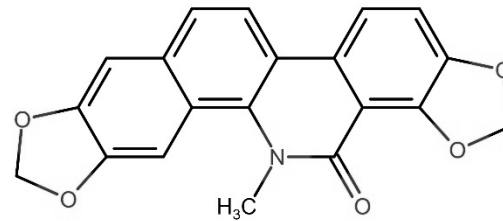
Sanguinarina



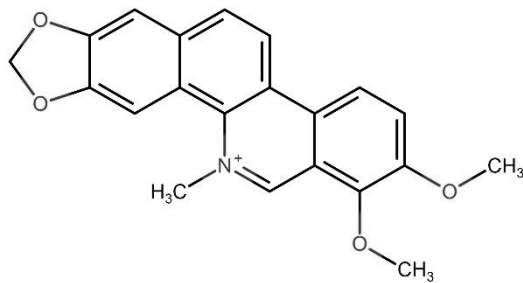
Dihydrosanguinarina



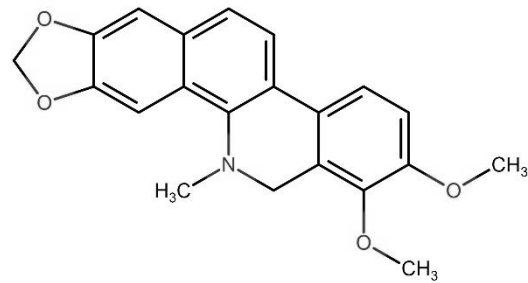
Acetonildihidroquelerrina



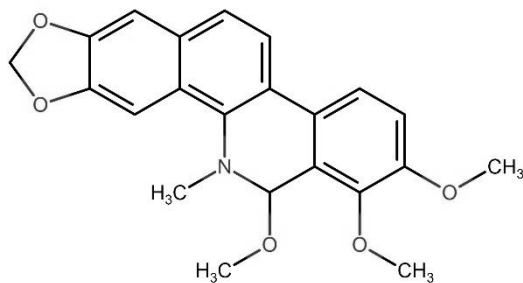
Oxisanguinarina



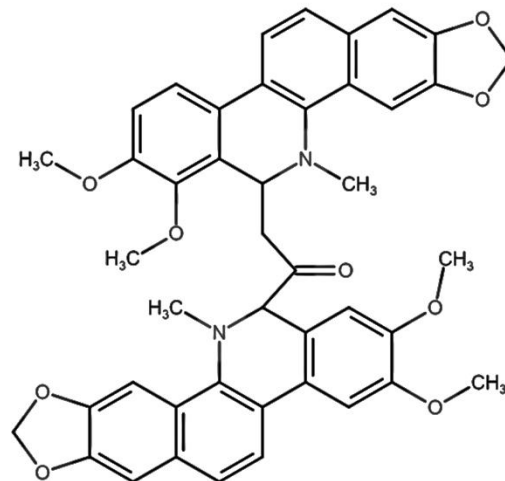
Queleritrina



Dihidroqueleritrina



Angolina



Queleritridimerina

Fig. 5. Alcaloides identificados por cromatografía de gases en la corteza de *B. arborea*. Tomado y modificado de (Perez-Gutierrez, 2002). Creado con Fisher Scientific.

Además, algunas de estas moléculas tienen actividad farmacológica, por ejemplo, antimicrobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Hernández-Almanza, 2016). Otra propiedad es su efecto antioxidante, antirradical y prooxidante *in vitro*, sin embargo, no se sabe su efectividad *in vivo*, por lo que las vuelve motivo de estudio (Pérez, 2003). También, la Dihidrosanguinarina (DHS) es un compuesto bioactivo antinociceptivo sin efectos sedantes, neurotóxicos, o daño gástrico. Esos

hallazgos remarcan la importancia de seguir en la búsqueda de moléculas bioactivas (Gaona-Tovar, 2022).

2.2.4. *Bocconia Arborea*

Dados los antecedentes de esta especie medicinal, su producción de metabolitos y abundancia, *B. arborea*, ha sido investigada, precisamente sus partes aéreas. En 2017 Gaona-Tovar, obtuvo los extractos de corteza y hoja, y demostró que los extractos poseen efecto tráqueo-relajante sobre la musculatura lisa, y que podrían actuar a través de diferentes mecanismos de acción, como activar los receptores muscarínicos, la vía Óxido nítrico/Guanilato ciclasa soluble (NO/GCs), o la inhibición de las fosfodiesterasas (Gaona -Tovar, 2017).

Adicionalmente, Martínez-Cuevas estudió el efecto antidiabético y toxicológico de los extractos de *B. arborea*, y concluyó que el efecto hipoglucemiante y antidiabético es similar a glibenclamida, y que el extracto no produce toxicidad sobre los órganos metabolizadores. Asimismo, el estudio permitió identificar a DHS por difracción de rayos X (Martínez-Cuevas, 2018).

Posteriormente, en un estudio fitoquímico del extracto metanólico de corteza de *B. arborea*, se aisló DHS y Angolina (Ang), donde ang relajó la musculatura lisa, independiente del endotelio (Gaona- Tovar, 2020).

Además, en un estudio estacional los extractos de corteza, hoja, y fruto se comparó si el momento de colecta de la planta afecta la cantidad de metabolitos, así como su efecto tráqueo-relajante. El estudio mostró que, en efecto, el momento de colecta afecta la actividad farmacológica, así como el rendimiento, lo cual podría deberse a diferentes factores, como la depredación de insectos, la precipitación pluvial a la que se expone antes de ser colectada, etc. (Ramírez-Hernandez, 2021).

De igual manera, al evaluarse el efecto de los extractos diclorometánicos de fruto de *B. arborea*, se demostró que producen 100% de relajación a la Concentración Efectiva media (CE₅₀) de $117 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$, muy importante ya que la colecta del

fruto es menos invasiva en comparación con las otras partes aéreas y no compromete a la especie (Ramírez-Hernandez, 2021).

Después del estudio de Gaona-Tovar, se hizo el fraccionamiento secundario de una fracción primaria para obtener mayor cantidad de moléculas del tipo benzofenantridina, así como para encontrar nuevas. En ese proyecto se fraccionó la fracción 4 obtenida del EDBa, el cual resultó en 7 fracciones finales, y permitió el aislamiento de Oxisanguinarina (OS) y Oxiqueleritrina (OQ). Posteriormente, la evaluación vasorrelajante de los alcaloides aislados de *B. arborea* (Angolina, Dihidrosanguinarina, Bocconarborina A (BA), Oxisanguinarina y Oxiqueleritrina), mostró que Ang fue la de mayor efecto farmacológico (Batalla-Roldan, 2022).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta prevalencia de asma en el mundo, los efectos secundarios, los altos costos y la poca efectividad de algunos medicamentos, la población emplea la medicina tradicional como alternativa de primera mano para tratar ciertas afecciones o aminorar los síntomas. Por ello, es de gran interés estudiar las plantas medicinales, con la finalidad de acreditar su uso etnomédico y, a partir de eso, obtener metabolitos secundarios con potencial terapéutico.

Tal es el caso de *Bocconia arborea* de la familia *Papaveraceae* ya que posee gran variedad de alcaloides del tipo benzofenantridina, mismos que son de interés por sus propiedades farmacológicas, destacando a aquellas relacionadas con procesos inflamatorios, como el asma. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar las partes aéreas de *Bocconia arborea*, y encontrar compuestos bioactivos que sirvan como prototipo para desarrollar de nuevos fármacos con mecanismo de acción novedoso.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener los compuestos con actividad tráqueo-relajante de los extractos diclorometánicos de corteza y fruto de *Bocconia arborea*.

4.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar un fraccionamiento biodirigido del extracto diclorometánico de corteza para aislar los compuestos con actividad relajante, por cromatografía en columna.
- Evaluar las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de corteza sobre anillos de tráquea aislada de rata.

- Identificar los compuestos con actividad tráqueo-relajante de las fracciones activas.
- Determinar el mecanismo de acción funcional del compuesto con mayor actividad farmacológica.

5. HIPÓTESIS

Los compuestos aislados del extracto diclorometánico de corteza de *Bocconia arborea* tendrán actividad tráqueo-relajante. Asimismo, se encontrarán en el extracto diclorometánico de fruto.

6. METODOLOGÍA

6.1.1. Recolección del material vegetal

La colecta del material vegetal fue en enero del 2021 por el grupo de trabajo del Dr. Samuel Enoch Estrada Soto. Identificada por la Dr. Irene Perea Arango del CEIB, con el voucher HUMO, No. 36808. Consecutivamente se separó el material vegetal para limpieza y secado, a temperatura ambiente y a la sombra. Una vez seco el material vegetal, se continuó con la molienda en un molino manual.

6.1.2. Obtención de los extractos orgánicos.

Los extractos orgánicos se obtuvieron por maceración exhaustiva, mezclando 1570g de corteza con 12 L de disolvente orgánico (hexano, diclorometano y metanol), por 72 horas y por triplicado. De igual forma, para obtener el extracto orgánico del fruto, se maceró exhaustivamente, se tomaron 82g de material vegetal molido y seco, y se mezcló con 300 mL de disolvente orgánico por orden creciente de polaridad (hexano, diclorometano y metanol), por

72 horas y por triplicado. Se eliminó el exceso de disolvente de cada extracto mediante presión reducida empleando un rotavapor Heidolph G-3 con bomba de alto vacío.

6.1.3. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de *Bocconia arborea*

Para identificar o aislar los metabolitos responsables de la relajación, se recurrió a la cromatografía en capa fina, en donde se eluyeron los diferentes extractos orgánicos de corteza y de fruto por separado. Se usó acetona para su disolución y una fase móvil 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol v/v, revelados en el UV de onda corta y de onda larga.

6.2. Preparación del reactivo: Dragendorff

El reactivo se elaboró por la adición de 8 g de nitrato de bismuto pentahidrato en 20 mL de ácido nítrico al 30%, con solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de H₂O. Se dejó reposar por 24 h, se decantó y aforó a 100 mL. Una vez preparado el reactivo se agregó a la cromatoplaaca desarrollada.

6.3. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta

El extracto diclorometánico de corteza se fraccionó por cromatografía en columna abierta, con fase estacionaria gel de sílice con un tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm (Merck) y con fase móvil hexano, diclorometano y metanol; se inició la elución con hexano y, se aumentó la polaridad con mezclas de los otros disolventes. Una vez colectadas las fracciones, se concentraron y se separaron por cromatografía en capa fina, se revelaron con la lámpara de UV de onda corta y larga para reunir las por similitud cromatográfica. Después se corrió la

cromatografía de las fracciones para disminuir su número (por similitud cromatográfica) y la purificación de los precipitados obtenidos.

6.4. Evaluación farmacológica en modelo *ex vivo*

Para las evaluaciones farmacológicas se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 250 - 300 g, alimentadas con Rodent Labs Chow ® y libre acceso al agua, en condiciones de bioterio. El estudio siguió las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA).

6.4.1. Obtención de la tráquea

Para aislar la tráquea, los animales se expusieron a éter etílico, y posterior la disección. La tráquea se cortó en anillos de 4-5 mm, se colocaron en solución Ringer-Krebs [NaCl (118 g), glucosa (11.4 g), NaHCO₃ (25 g), KCl (4.7 g), MgSO₄ (1.2 g), KH₂PO₄ (1.2 g), EDTA (0.026 g), CaCl₂ (2.5 g)], constantemente burbujeados con O₂/CO₂ (95%) y a 37 °C para la conservación del tejido.

6.4.2. Sistema de determinación del efecto tráqueo-relajante, registro de datos.

Para determinar el efecto tráqueo-relajante, los anillos de tráquea se cortaron, limpiaron, y se colocaron en 10 mL de solución de Ringer-Krebs a pH 7.4, y con burbujeo constante de carbógeno (O₂/CO₂, 95:5), la solución se mantuvo a 37 °C con un baño recirculador. Cada anillo se colocó en la cámara de incubación con ayuda de un gancho al extremo de la cámara y a un transductor de fuerza Grass modelo FT 03 el cual registra los cambios y los envía a un polígrafo BIOPAC systems UIM 100C.

6.4.3. Evaluación del sistema tráqueo-relajante

Los anillos fueron sometidos a tensión basal de 2 g de fuerza y, se dejó estabilizar 30 min. A continuación, el tejido se sensibilizó durante 15 min con carbacol [1 μM], a intervalos de 30 min (por duplicado). Después de cada estimulación, el tejido fue lavado con la solución Ringer-Krebs, para recuperar el valor basal de la tensión.

El tejido sensibilizado, se expuso a diferentes concentraciones de los extractos de forma acumulativa [3-1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en $\frac{1}{4}$ de logaritmo (Figura 6). Posteriormente se construyeron curvas de concentración- respuesta.

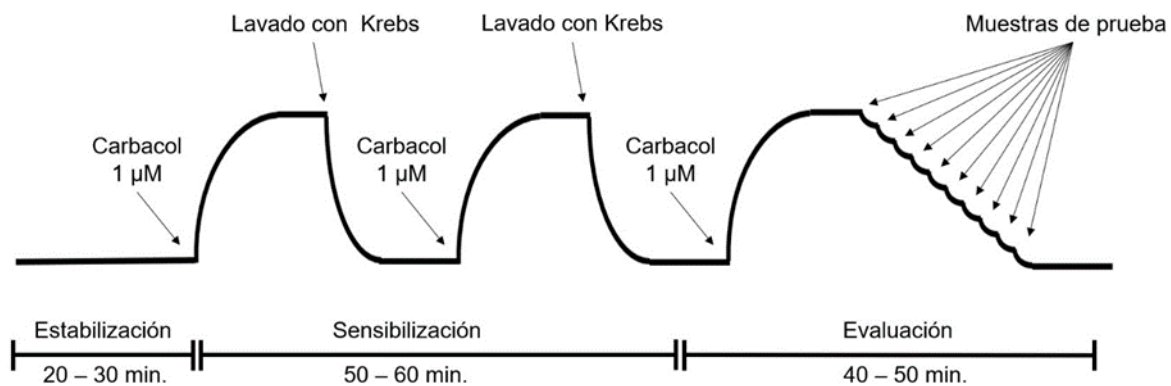


Fig.6. Estabilización, sensibilización y evaluación del efecto traqueo-relajante en anillos de tráquea aislada de rata contraídos con carbacol. Tomado de (Arias-Durán, 2020).

6.4.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del efecto tráqueo-relajante son expresados como el promedio de 5 animales \pm el error estándar de la media. Se usó el programa Origin 8.0 para construir las gráficas, y para el análisis estadístico se usó GradPad Prism 7.0, estableciendo diferencia estadísticamente significativa de los promedios con el valor $p < 0.05$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Obtención de los extractos orgánicos de *Bocconia arborea*

Para obtener los extractos de corteza se usaron 1570 g de la colecta de enero del 2018, con la metodología descrita. Para los extractos de fruto se maceraron 82 g de la colecta de enero del 2019 con la misma técnica. Los extractos dieron diferentes rendimientos, siendo los más abundantes el extracto diclorometánico y metanólico de corteza (tabla 2).

Tabla 2. Pesos y rendimientos de los extractos orgánicos de <i>B. arborea</i>		
Disolvente	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	17.12	1.07
Diclorometánico	50.79	3.20
Metanólico	68.08	4.29
Extractos de fruto de <i>Bocconia arborea</i>		
	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	6.55	7.98
Diclorometánico	2.104	2.56
Metanólico	6.133	7.47

7.2. Determinación cualitativa por cromatografía en capa fina (CCF)

A partir de los extractos obtenidos se empleó la CCF para monitorear, conocer y comparar el perfil metabólico, usando el sistema 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol, volumen/volumen (v/v), en donde se observó gran contenido metabólico, y similitud entre los constituyentes del extracto de corteza y el de fruto (Fig.7). Sin embargo, es importante continuar indagando para conocer todas las moléculas presentes.

No obstante, por la mayor cantidad en los extractos de corteza, los evaluamos, además de mostrar mayor intensidad en la CCF, lo que podría deberse a la cantidad.

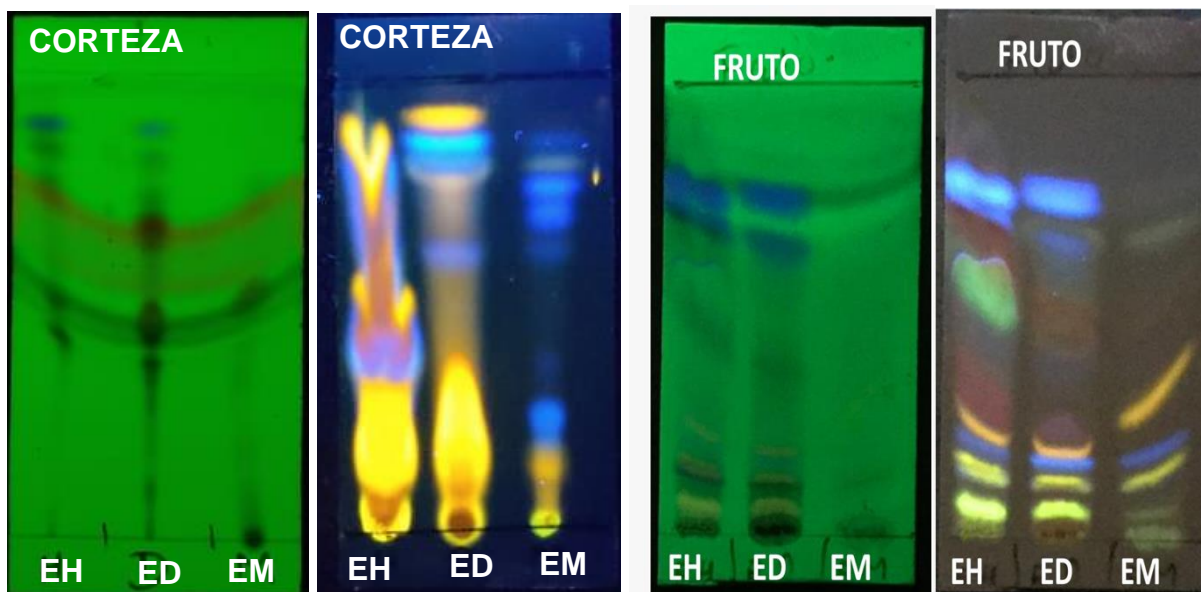
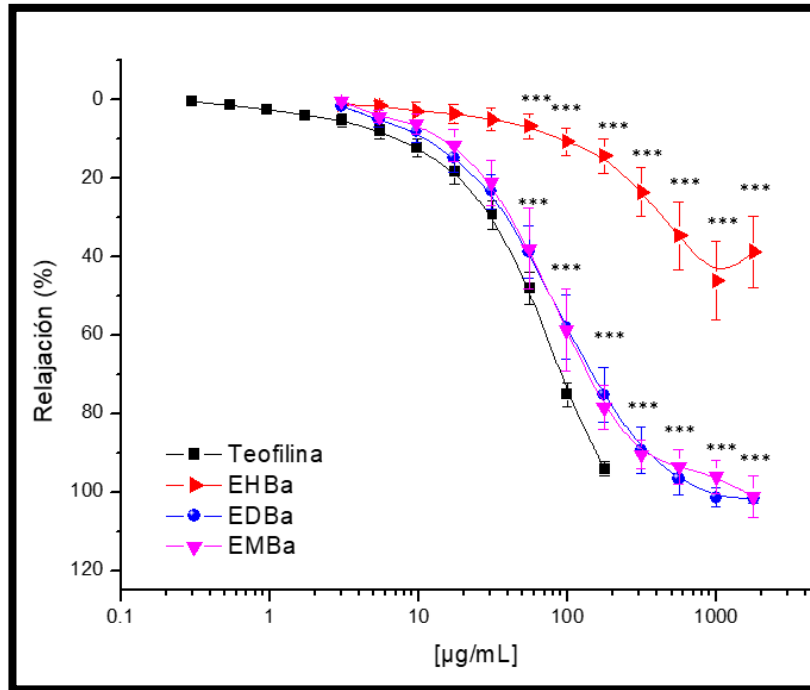


Fig.7. Placas comparativas de los extractos orgánicos de corteza y de fruto de *B. arborea* en un sistema 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol v/v. Extracto Hexánico (**EH**), Extracto Diclorometánico (**ED**), Extracto Metanólico (**EM**).

7.3. Curvas concentración-respuesta de los extractos orgánicos de corteza de *B. arborea*.

La observación cualitativa de los metabolitos en los extractos orgánicos, se evaluó el posible efecto tráqueo-relajante. En este proyecto se utilizó el modelo de tráquea aislada de rata, que permite observar *ex-vivo* la contracción en tiempo real provocada por agonistas como el carbacol, y al agregar muestras experimentales observar su oposición al efecto contráctil (Arias-Durán, 2020).

Como se observa en la gráfica 1, en las curvas concentración-respuesta a los extractos de corteza de *B. arborea*, el EH ($E_{\max} = 38.77 \pm 9.07 \%$, $CE_{50} = 245.50 \pm 4.44 \mu\text{g/mL}$) tuvo efecto menor al 50% de relajación, lo cual sugiere carencia de metabolitos bioactivos. Por otro lado, el ED de *B. arborea* ($E_{\max} = 100.00 \pm 1.12 \%$, $CE_{50} = 77.20 \pm 6.65 \mu\text{g/mL}$) y el EM de *B. arborea* ($E_{\max} = 100.00 \pm 5.23 \%$, $CE_{50} = 78.14 \pm 5.68 \mu\text{g/mL}$) alcanzaron el 100% de relajación, siendo equipotentes e igual de eficientes que teofilina, lo que sugiere que los metabolitos que provocan la actividad tráqueo-relajante están en los extractos mencionados.



Gráfica 1. Efecto tráqueo-relajante de los extractos orgánicos de corteza de *B. arborea* vs Teofilina en anillos de tráquea aislada de rata sobre la contracción inducida por carbacol [1µM]. ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni de los extractos orgánicos de *B. arborea*. *** $p < 0.001$

De acuerdo con lo obtenido en el ED de corteza de *B. arborea*, separamos los compuestos bioactivos por fraccionamiento primario en columna abierta del extracto.

7.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto diclorometánico de corteza de *Bocconia arborea*

Para los extractos de corteza se utilizó 60g del ED. Aunque no se obtuvo la cantidad suficiente de extracto, se complementó con extractos de la misma colecta de trabajos previos. Asimismo, el criterio de selección del ED fue que el EM de corteza ya tiene fraccionamiento primario, en el que se obtuvieron 11 fracciones y se aislaron diferentes compuestos, entre ellos, Ang y DHS. Esas fracciones se evaluaron y la F5 fue la más activa (**Gaona-Tovar, 2020**). Por este antecedente se hizo fraccionamiento primario del ED, que tuvo efecto farmacológico significativo y rendimiento abundante, además de obtener mayor cantidad de compuestos, y posibles nuevas moléculas. En la Fig.8, se muestra el fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta.



Fig. 8. Fraccionamiento primario del ED de corteza de *B. arborea*.

El fraccionamiento fue con disolventes por orden creciente de polaridad, y se obtuvieron 6 fracciones (tabla 3).

Tabla 3. Fracciones finales y pesos obtenidos del fraccionamiento primario del ED de corteza de *B. arborea*.

Tubo	Fracción	Peso (g)
F1	1 – 93	1.183
F2	94 – 257	7.301
F3	258 – 308	1.694
F4	309 – 324	7.396
F5	325 – 361	1.338
F6	362 – 484	7.977

Una vez obtenidas, las fracciones finales fueron sometidas a CCF para monitorear su contenido metabólico. También, y aunque las fracciones fueron separadas por polaridad, de forma cualitativa se observan compuestos que podrían estar en una o en varias fracciones debido a su abundancia (Fig.9).

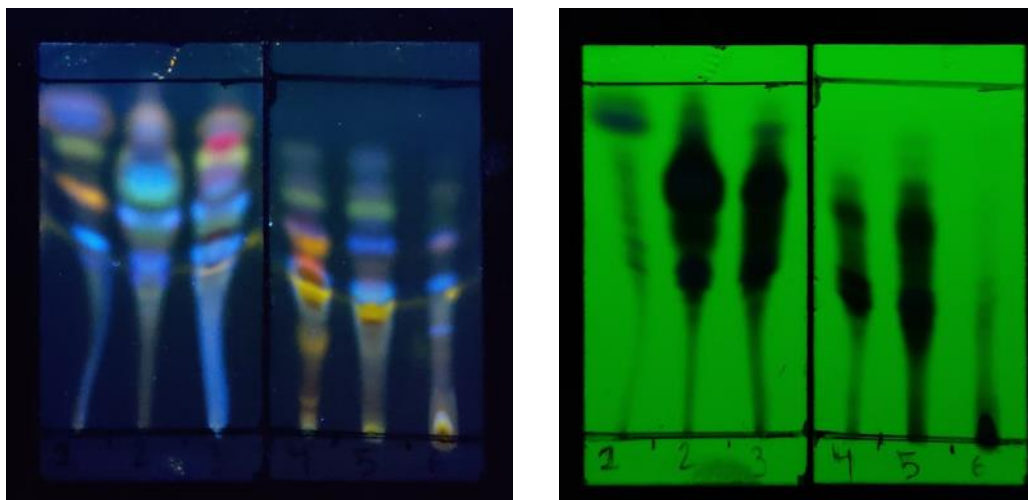


Fig. 9. Placas comparativas del fraccionamiento de corteza de *B. arborea* en un sistema 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol.

A partir del fraccionamiento se obtuvieron 3 precipitados, elucidados por Gaona-Tovar, y se muestran sus pesos finales, así como el nombre de la molécula por colaboración en ese trabajo (tabla 4).

Tabla 4. Compuestos obtenidos por precipitación espontánea del fraccionamiento primario en columna abierta del ED de corteza de *B. arborea*.

Tubo	Fracción	Nombre del compuesto	Peso (mg)
F1	29 – 93	dihidrosanguinaria	240
F3	232 – 241	bocconarborina A	260
F5	344 – 360	angolina	199

7.5. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta del extracto diclorometánico de fruto *Bocconia arborea*

Debido al método invasivo en la obtención de la corteza, es importante buscar alternativas para ello, como en las demás partes aéreas de la planta: la raíz, las hojas o el fruto. Asimismo, el extracto diclorometánico de fruto tiene actividad tráqueo-relajante, con efecto máximo (E_{max}) del 100% a la CE_{50} de $117 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte, estudios *ex-vivo* han mostrado que la colecta es más efectiva con base en su fecha de recolección (**Ramírez-Hernández, 2020**). Por lo cual, es importante continuar indagando los frutos.

En este trabajo usamos el fruto, por los antecedentes, y además se fraccionó en columna abierta para aislar compuestos del fruto; asimismo, encontrar compuestos relacionados con actividad mejor a la observada en los ya obtenidos.

El fraccionamiento primario del extracto diclorometánico de fruto (fig.10) generó 13 fracciones finales.

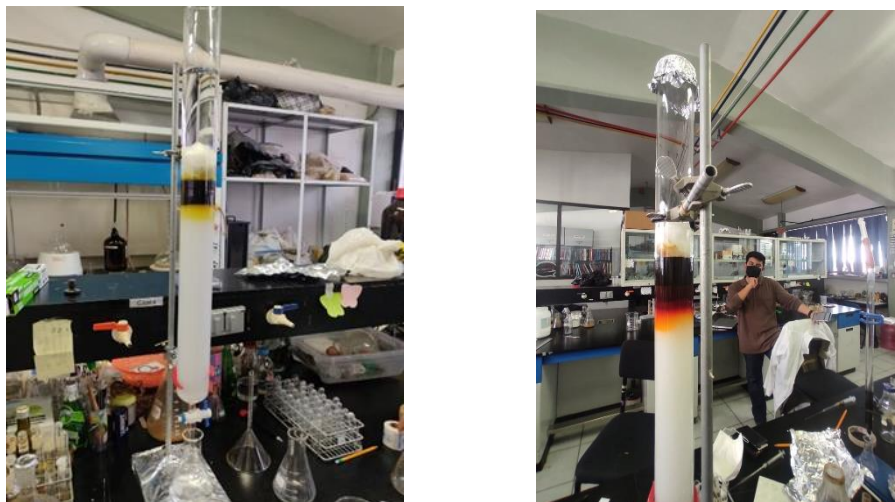


Fig. 10. Fraccionamiento primario del ED de fruto de *B. arborea*.

Como se observa en la tabla 5, no se obtuvieron rendimientos adecuados en el fraccionamiento de fruto, ya que su colección no fue como se esperaba, pues solo se obtuvieron 82g, y los extractos no fueron vastos, además la cantidad de extracto para el fraccionamiento fue de 7g. Sin embargo, si aumentamos la cantidad de fruto, los rendimientos mejorarán, y se obtendrá mayor cantidad de extracto.

Tabla 5. Fracciones finales y pesos obtenidos del fraccionamiento primario del ED de fruto de *B. arborea*

Tubo	Fracción	Peso (g)
F1	1 – 19	0.014
F2	20-24	0.037
F3	25-60	0.266
F4	61-67	0.080
F5	68-111	0.040
F6	112-188	0.018

F7	189-208	0.010
F8	209-241	0.183
F9	242-265	0.286
F10	266-276	0.125
F11	277-295	0.352
F12	296-312	0.205
F13	313-373	1.344

No obstante, se obtuvo un precipitado grisáceo, fracciones 234-265, coincidentes con las reportadas por Batalla-Roldán (2022), y correspondería al alcaloide OS. El precipitado fue de 0.0042g monitoreado por CCF para su purificación.



Fig. 11. Obtención del alcaloide Oxisanguinarina a partir del ED de Fruto de *B. arborea*.

El producto se sometió a precipitación selectiva con mezcla de hexano y diclorometano para obtener mayor cantidad. Se comparó el precipitado con la OS elucidada por Batalla-Roldán, se nota la similitud en el factor de retención y en la pureza (fig.11).

Además, se hizo la prueba con revelador químico para verificar si correspondía a un alcaloide. La prueba usa el reactivo de Dragendorff por su alta sensibilidad frente a estas moléculas (Ríos, 2013); como se observa en la cromatografía antes de aplicar el reactivo, y posterior a su aplicación (Fig. 12 A y B). El color café oscuro o rojizo/ladrillo indica positivo a esta prueba, por la precipitación de alcaloides con iones complejos inorgánicos, como el KI y el Bi₃ del reactivo de Dragendorff, además de confirmar su presencia (Medina-Trujillo, 2019).

Se eluyó la fracción 265, OS y DHS, en ese orden. DHS ya ha sido elucidado, es positivo a la prueba, y se usó como control positivo. Las muestras de prueba fueron positivas, aunque en menor intensidad tal vez debido al impedimento estérico que tiene el N en la lactama de la OS, ya que para el caso de DHS la amina es terciaria y es más propensa a formar sales (Fig. 12).

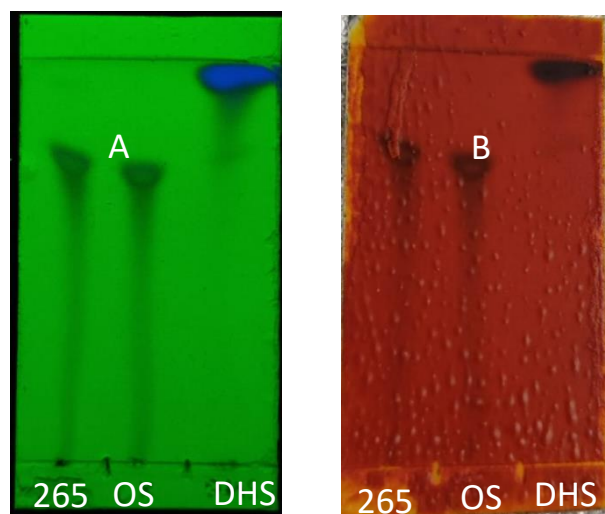


Fig. 12. Identificación de oxisanguinarina con reactivo Dragendorff.

Finalmente, se determinó el punto de fusión, para establecer su rango de pureza y determinar si es la misma molécula.

OS tiene punto de fusión mayor a 300°C (Arellano, 2019); sin embargo, el equipo EZ-MELT alcanza 280°C como máximo, y no se pudo establecer el punto de fusión exacto, y como el precipitado no se fundió a la temperatura máxima del equipo, sugiere que es el mismo compuesto (Fig.13) (Arellano, 2019).

Con toda la evidencia mencionada, se pensó que el compuesto se trataba de OS, sin embargo, es necesario realizar los experimentos de RMN para establecer su estructura. Así es posible evidenciar que al menos, OS está presente en los frutos que pudiera ser una fuente, no invasiva y destructiva de la planta, para la obtención de oxisanguinarina.

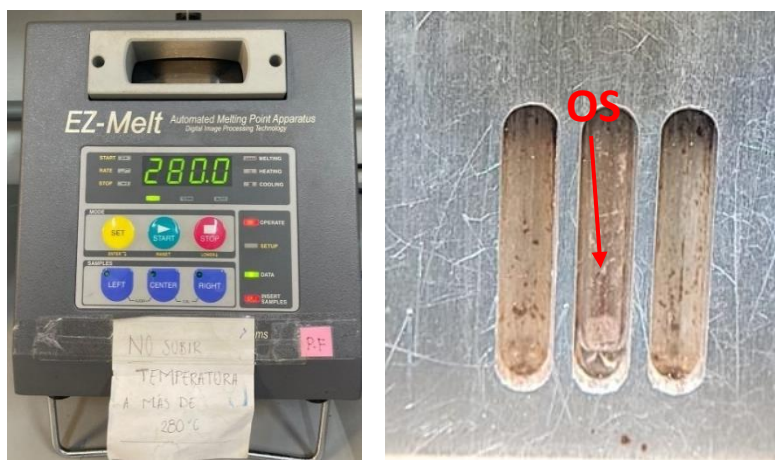
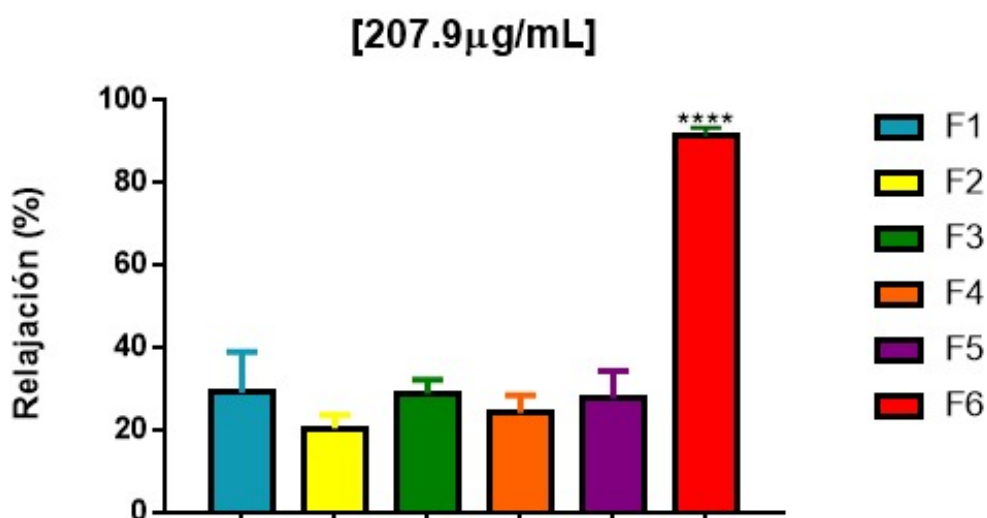


Fig. 13. Punto de fusión de Oxisanguinarina (>300°C).

Al comparar el rendimiento de ambas columnas cromatográficas, fraccionamiento del extracto de corteza y del extracto de fruto, solo se usaron las fracciones del extracto de corteza.

7.6. Determinación del efecto tráqueo-relajante de las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del ED de corteza

Debido a lo discutido anteriormente, se decidió evaluar las 6 fracciones finales del ED de corteza, con el fin de determinar su actividad tráqueo-relajante, y la que probablemente es la responsable de la actividad farmacológica presente en el extracto íntegro. Las fracciones 1 a 5, relajaron menos de 50% (F1, 29.07 ± 9.85), y la fracción 6 fue más activa, relajando al 91.07 ± 2.13 % (gráfica 2).



Grafica 2: Efecto traqueorelajante de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico de corteza de *B. arborea* en anillos de tráquea aislada de rata sobre la contracción inducida por carbacol [1µM].

ANOVA de una vía con comparativa de Bonferroni ****p<0.0001

Sin embargo, de la fracción más activa no se logró aislar ningún compuesto, por lo cual, sería interesante hacer un fraccionamiento secundario para aislar los compuestos contenidos en esta fracción. En colaboración con el M. en F. Gaona-Tovar, a partir de la F1, F3 y F5, se aisló dihidrosanguinarina, bocconarborina A y angolina, respectivamente; y a partir del fraccionamiento secundario de la F4, se obtuvieron 2 compuestos más: oxisanguinarina y oxiqueleritrina (**Batalla, 2022**).

7.7. Determinación del efecto tráqueo-relajante de las moléculas obtenidas de *B. arborea*

Los compuestos angolina, dihidrosanguinarina, oxisanguinarina, oxiqueleritrina, y bocconarborina A, fueron evaluados en el modelo *ex-vivo* de tráquea aislada de rata. Posteriormente, se corrió una placa cromatográfica para observar la pureza de estos compuestos, la cual, se reveló con luz Ultravioleta (UV), y se muestran sin impurezas (Figura 14). Además, es importante conocer su estructura, ya que estas moléculas son parte de la familia de las benzofenantridinas, y son muy abundantes de la especie *Bocconia*.

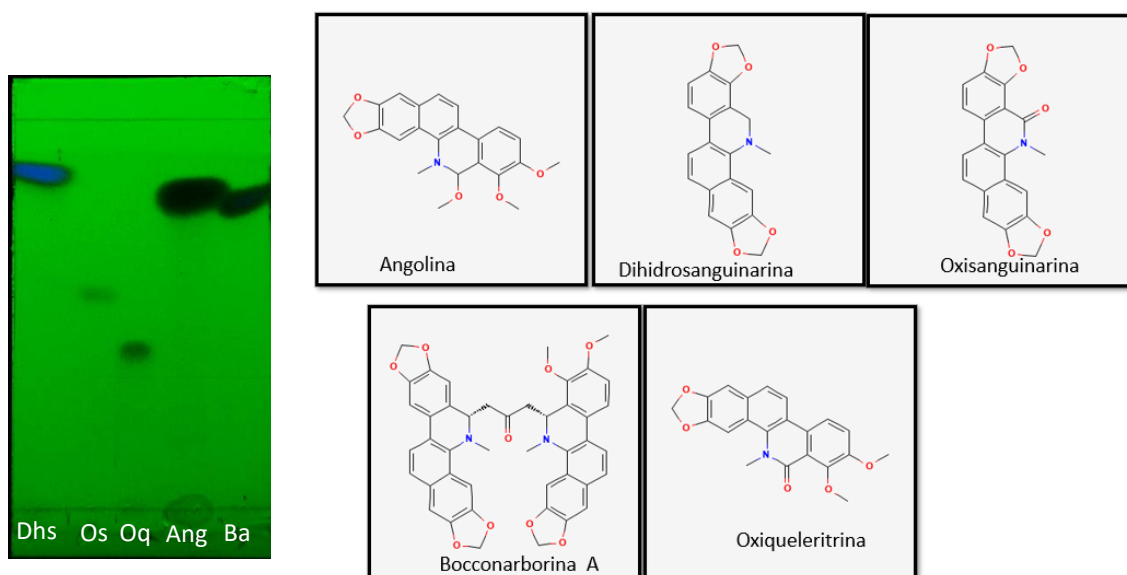
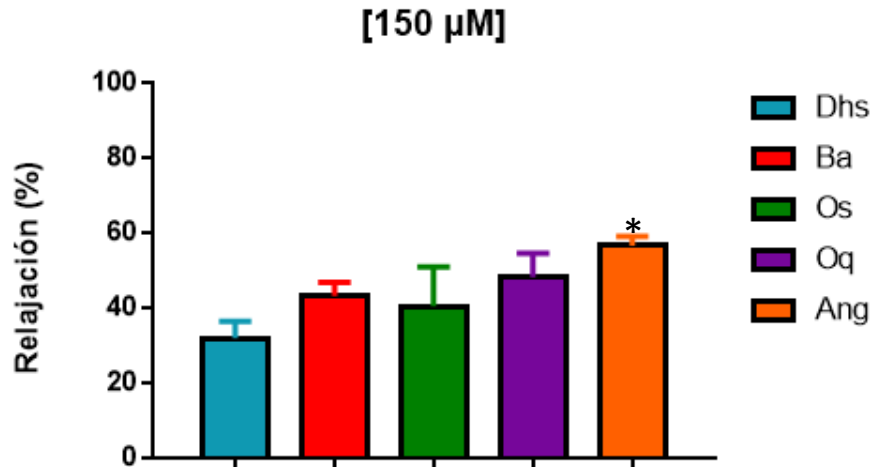


Fig. 14. Cromatografía de los compuestos aislados del EDC de *B. arborea* y su estructura. 50:49:1 Hexano: Diclorometano: Metanol. Recuperado de Pubchem.

Una vez verificada la pureza de manera cualitativa, se evaluaron estos compuestos. Las evaluaciones fueron en el mismo modelo *ex-vivo* de anillos de tráquea aislada de rata utilizado durante todo el estudio.

La **gráfica 3**, muestra los porcentajes de relajación para cada compuesto, y es importante resaltar a angolina, ya que fue el compuesto más activo, puesto que superó el 50% de relajación con 150 μ M. Esa concentración fue obtenida de un estudio previo realizado por Gaona-Tovar en el 2020, quién encontró que angolina

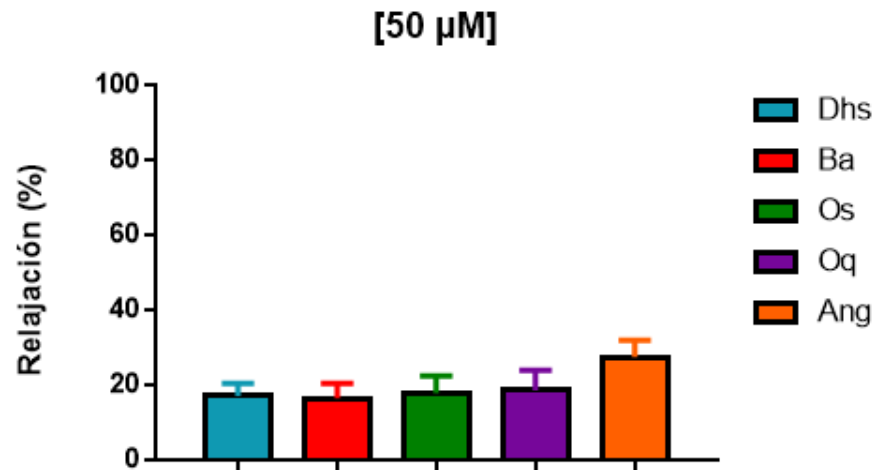
mostraba un efecto significativo a esta concentración, fue por ello que se evaluaron las otras muestras a esa misma.



Gráfica 3: Efecto tráqueo-relajante de los compuestos aislados de *B. arborea* a 150 μ M, en anillos de tráquea aislada de rata sobre la contracción inducida por carbacol [1 μ M]. ANOVA de una vía con comparativa de Bonferroni * $p < 0.05$.

Con el fin de explorar otras concentraciones que reduzcan la cantidad de compuesto para relajar más del 50%, se hizo un nuevo ensayo a 50 μ M.

Ningún compuesto evaluado superó el porcentaje establecido (gráfica 4), con lo que podemos mencionar que estos son dependientes de la concentración y también poco efectivos para relajar la contracción inducida por el carbacol en el modelo de órgano aislado.



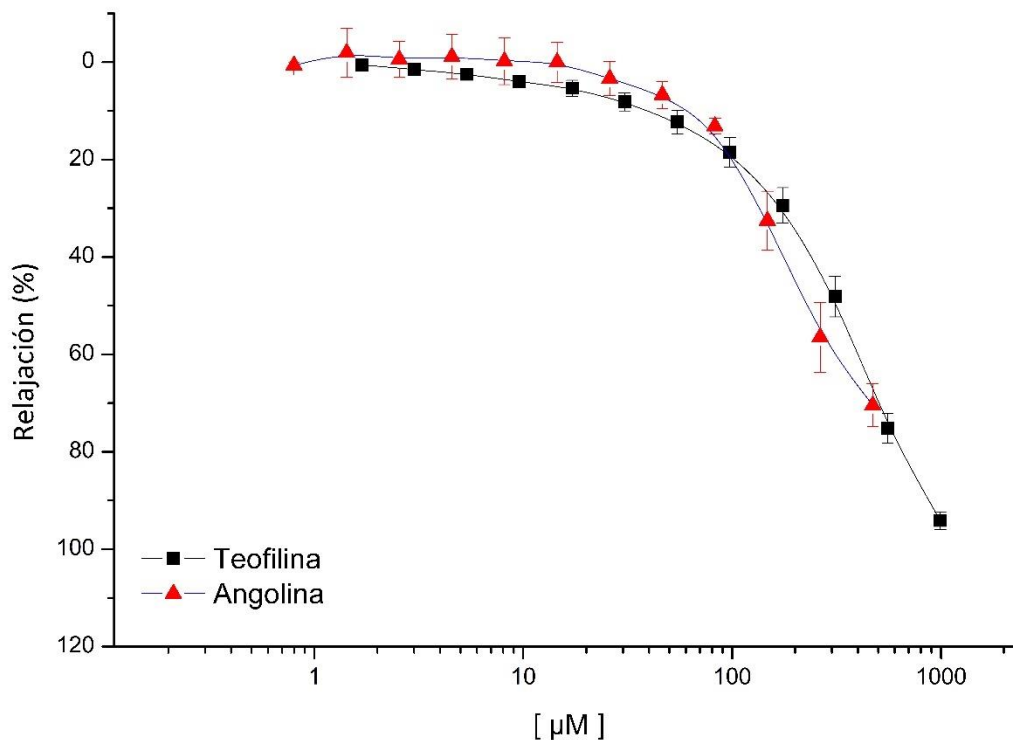
Grafica 4: Efecto tráqueo-relajante de los compuestos aislados de *B. arborea* a 50 μ M, en anillos de tráquea aislada de rata sobre la contracción inducida por carbacol [1 μ M]. ANOVA de una vía con comparativa de Bonferroni.

Estos resultados permiten establecer que los compuestos son medianamente activos, pero claramente menos activos que los extractos, lo que sugiere que el efecto se sinergiza cuando se encuentran juntos en el extracto.

7.8. Determinación del efecto tráqueo-relajante de Angolina

Debido a que Angolina fue el compuesto con mayor actividad farmacológica en el estudio preliminar, se construyó una curva concentración-respuesta para determinar su efecto tráqueo-relajante máximo (E_{max}).

El E_{max} obtenido fue de $70.46 \pm 2.9 \%$, y una $CE_{50} = 160.76 \pm 7.15 \mu M$, con tendencia similar al control positivo teofilina ($E_{max} = 94.07 \pm 1.79 \%$) (gráfica 5). De acuerdo con esa actividad farmacológica, es importante determinar el



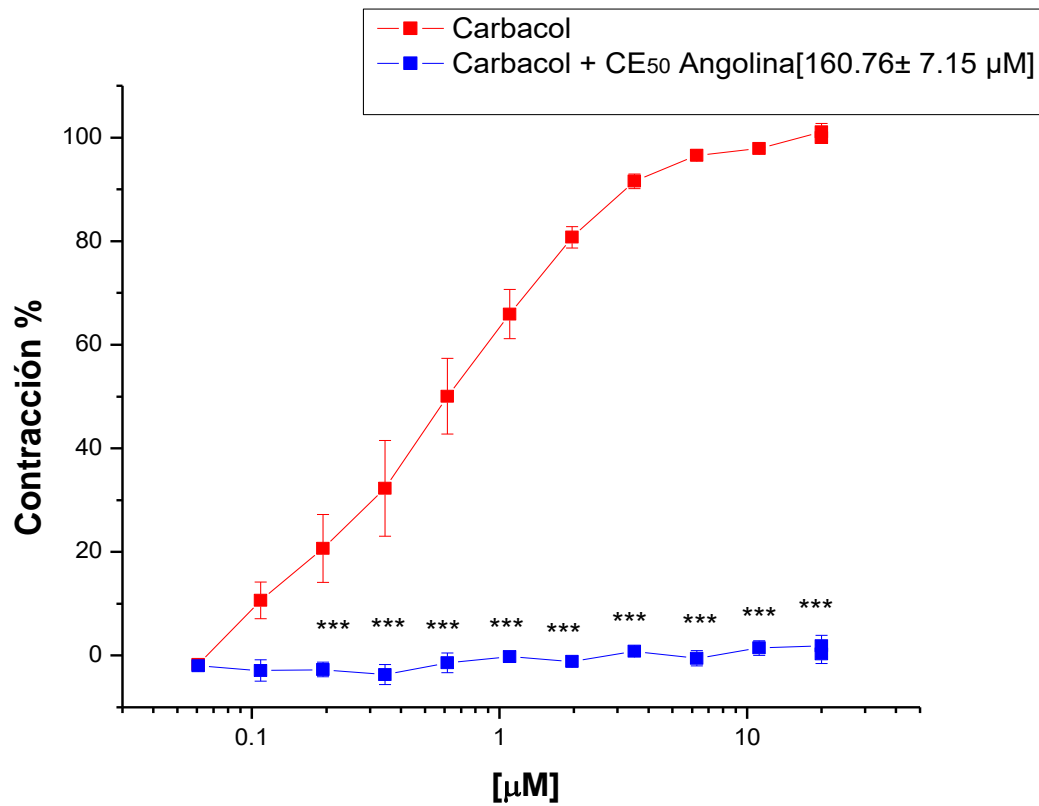
Gráfica 5: Efecto tráqueo-relajante de Angolina en anillos de tráquea aislada de rata pre-contráidos con carbacol [$1 \mu M$].
mecanismo de acción por el cual Angolina ejerce su efecto.

7.9. Determinación del mecanismo de acción de angolina.

Una vez establecido que el compuesto más activo fue angolina, se determinó el mecanismo de acción funcional de esa molécula, por su efecto relajante de interés, y es uno de los responsables de la actividad farmacológica del extracto íntegro. Para estos experimentos, se utilizó diferentes clases de agonistas, bloqueadores, e inhibidores de enzimas, que afectan la contracción y/o relajación del músculo liso.

7.9.1. Participación de los receptores muscarínicos.

La contracción inducida por carbacol, agonista muscarínico, y como se observa en la gráfica 6, fue disminuida al pre-incubar con la CE_{50} de angolina, lo que sugiere que angolina interactúa con el receptor muscarínico como antagonista no competitivo, o en un sitio alostérico, que evite la cascada de señalización del carbacol, o bien generando segundos mensajeros que activen las diferentes vías de señalización, como la de β_2 -adrenérgicos, NO/Guanilato ciclasa, o propiciando el aumento de estas por inhibición de las fosfodiesterasas.

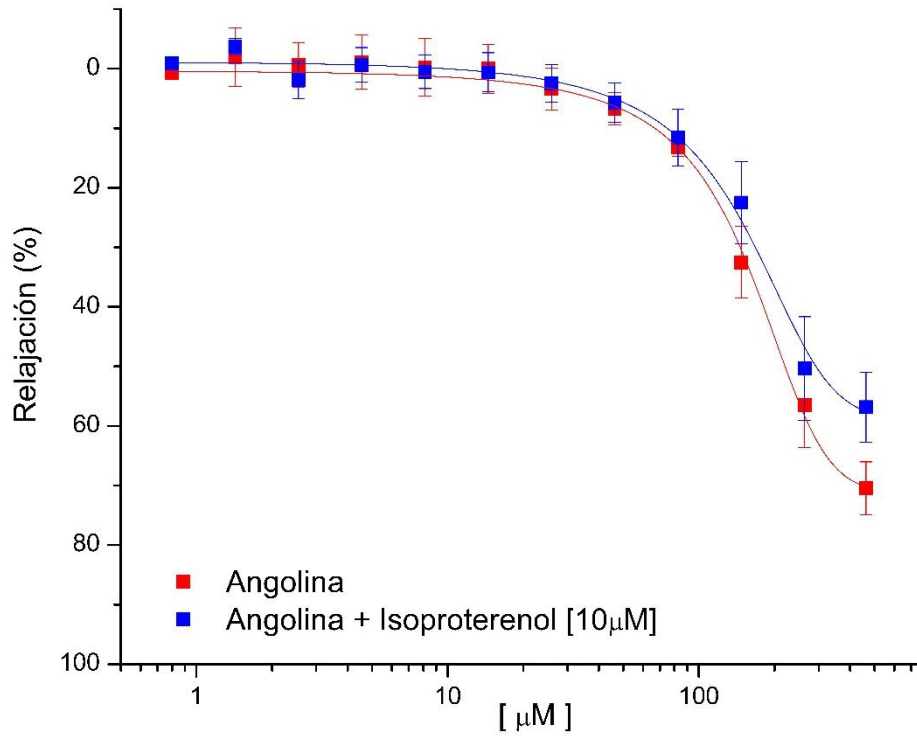


Gráfica 6: Efecto de la CE₅₀ [160.76± 7.15 µM] de Angolina en la contracción inducida por carbacol sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

7.9.2. Participación de los receptores β_2 -adrenérgicos.

Los receptores β_2 son de gran importancia en la terapia farmacológica actual, puesto que en los medicamentos de rescate contra el asma se incluyen salbutamol, salmeterol y formoterol (Vives, 2007). Estos fármacos actúan en conjunto con las proteínas G. Al activarse los receptores adrenérgicos por algún agonista, estos activan la adenilato ciclasa, la cual genera AMPc a partir del ATP. El AMPc, activa la proteína cinasa A (PKA), que fosforila diversas proteínas. En el músculo liso fosforila la cinasa de la cadena ligera de miosina, lo que produce relajación muscular (Menéndez, 2011). Debido a esto, es importante determinar si ang ejerce su mecanismo de acción mediante esta vía de señalización. Para esto, se incubó isoproterenol [10 μ M], agonista no selectivo de los receptores beta-adrenérgicos, después se adicionaron concentraciones acumulativas de ang. Al observar la gráfica 7, no hubo diferencia significativa entre la curva de ang y la curva de isoproterenol, es decir, no hubo potenciación del efecto tráqueo-relajante por la acumulación de segundos mensajeros.



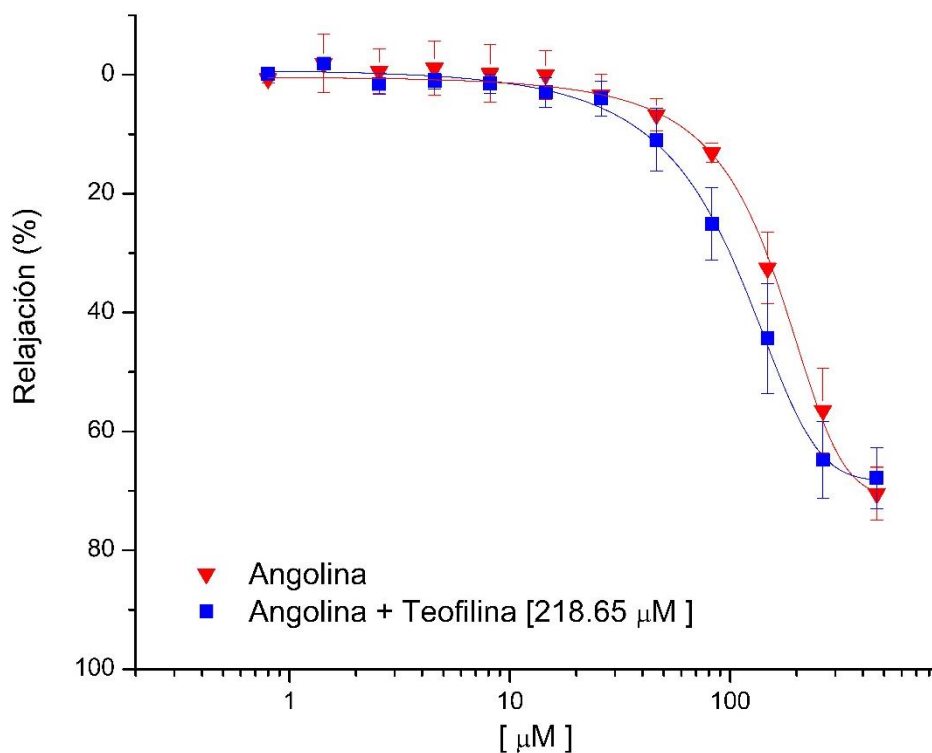
Gráfica 7: Efecto del Isoproterenol en la de relajación por Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni.

7.9.3. Participación de las Fosfodiesterasas.

Las fosfodiesterasas hidrolizan los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc a sus respectivos monofosfatos, y al aumentar el tiempo de vida media de aquellos, se producirá broncodilatación prolongada. La teofilina inhibe competitivamente las fosfodiesterasas tipo III y tipo IV, por lo cual se usa en la terapia contra el asma (Lipworth, 2005).

Para corroborar si angolina inhibe las fosfodiesterasas, se incubó la CE₅₀ Teofilina [218.65 μ M], y se comparó con la curva concentración-respuesta de ang en ausencia de teofilina. Al observar la gráfica 8, no se aprecia diferencia significativa. Esto descarta que ang actúe vía inhibición de las fosfodiesterasas, ya que, de ser positivo, se observaría un efecto aditivo en la relajación del músculo liso por la acumulación de AMPc.



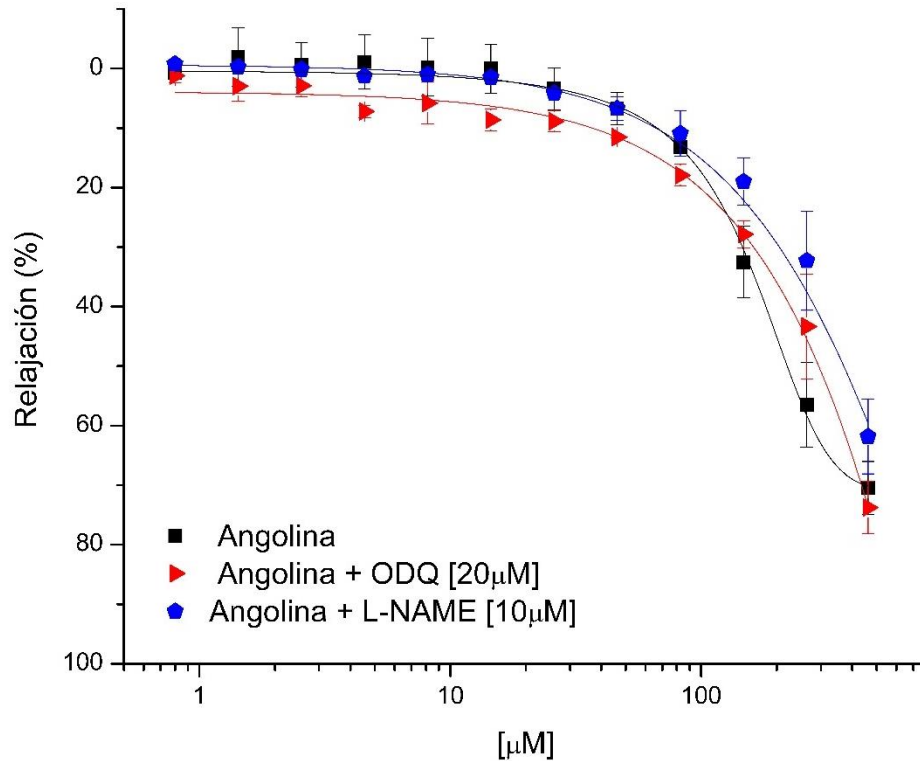
Gráfica 8: Efecto de la Teofilina en la relajación por Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni.

7.9.4. Participación de la vía NO/Guanilato ciclasa

Con el propósito de observar si ang participa en la generación de Óxido Nítrico (NO), y la participación de la guanilato ciclasa soluble activada por NO, se usaron L-NAME y ODQ respectivamente. El L-NAME inhibe la Óxido nítrico sintasa (NOS) de manera no competitiva (Calabró, 2018) y el ODQ inhibe la guanilato ciclasa al bloquear la síntesis de GMPc inducida por NO (Lies, 2013). El NO es producido a partir de la L-arginina por la NOS, el cual es un gas que modula diferentes funciones, como la relajación del músculo liso. El NO permite la conversión de Guanosina trifosfato (GTP) a Guanosina monofosfato cíclico (GMPc), aumentando su concentración hasta en 100 veces y además reduce la cantidad de calcio intracelular, interfiriendo en la cascada de relajación mediada por la proteína cinasa dependiente de GMPc (Benavides-Trujillo, 2008). Este mecanismo tiene relación cercana con el tejido de las vías aéreas, ya que el NO también es producido por estas células para producir broncodilatación (Britt Jr, 2015).

Para ver si angolina está implicada en esta vía, se realizó el experimento cuyos resultados se muestran en la gráfica 9, se usaron L-NAME y ODQ, que no modificaron la actividad tráqueo-relajante, y no hubo diferencia con respecto a la curva control, por lo que la relajación de angolina no está mediado NO/GC/GMPc.

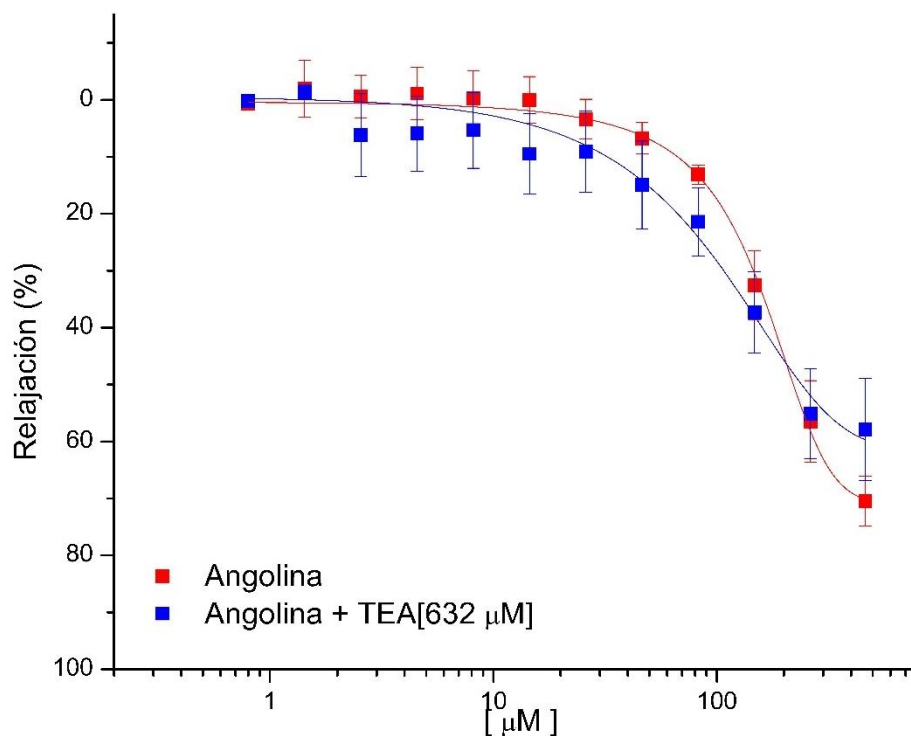


Gráfica 9: Efecto de L-NAME y ODQ en la relajación por Angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

7.9.5. Participación de los canales de K⁺

Los canales de K⁺ regulan el paso de iones K⁺ en células excitables, entre estas las células de la musculatura lisa. En respuesta a la despolarización de la membrana, estos canales se activan, permitiendo el flujo de K⁺ al exterior de la célula para equilibrar el potencial de membrana negativo. Esto provoca la hiperpolarización de la membrana, cerrando los canales de Ca²⁺, e impidiendo su paso, afectando la relajación-contracción (López-Cacacho, 2021). Para este ensayo se usó tetraetilamonio (TEA), bloqueador de los canales de K⁺; se construyeron curvas concentración-respuesta de ang, y se pre-incubó TEA [632 μM] para observar el patrón de ang con este bloqueador. No hubo diferencia significativa entre ambas curvas, por lo que se descarta la participación de ang sobre los canales de K⁺ (gráfica 10).



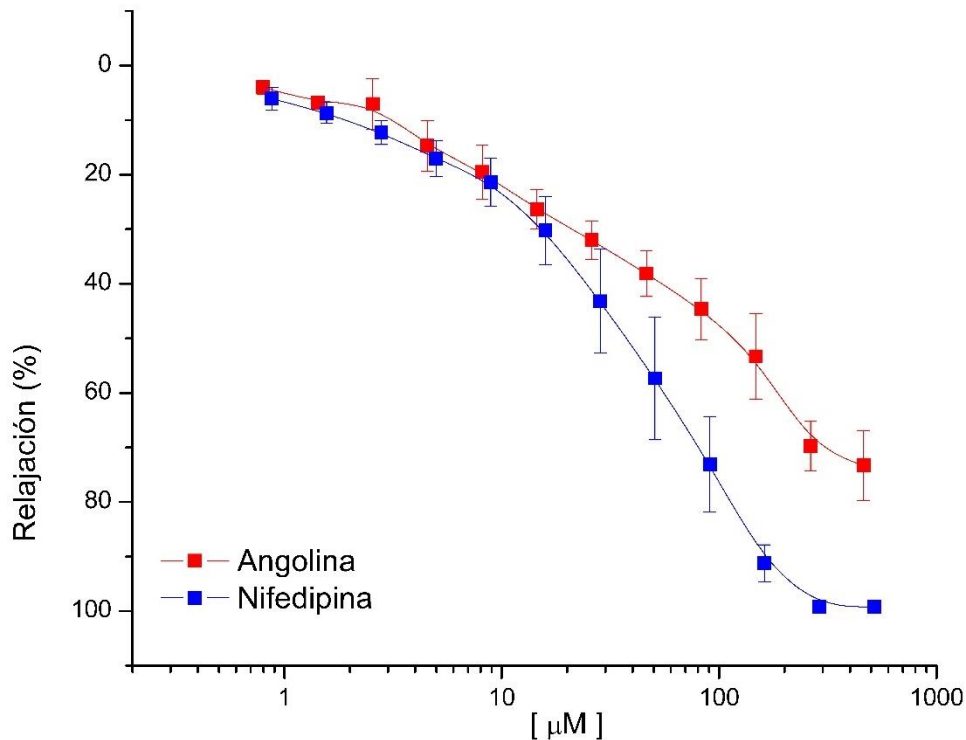
Gráfica 10: Efecto del TEA en la relajación por angolina sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

7.9.6. Participación de los canales de Ca^{2+} activados por KCl

Para conocer si el efecto de Angolina es mediado por bloqueo de canales de calcio, se provocó contracción con KCl 80 [mM] y se adicionó de manera acumulativa concentraciones de Angolina. El KCl actúa como estimulante, el cual abre los canales de Ca^{2+} al despolarizar la membrana, y aumenta la concentración de Ca^{2+} y provoca la contracción del músculo liso (Padilla-Pérez, 2020). Comparando con los canales de K^+ , si ang actuara mediante este canal, provocharía la entrada de K^+ a la célula, lo que directamente reduciría la cantidad de Ca^{2+} , reduciendo la contracción.

Se comparó con el control Nifedipina, el cual es un bloqueador de los canales de Ca^{2+} (Drugbank, 2023). El efecto de ang ($E_{\text{max}}= 73.32\%$) mostró tendencia similar al control Nifedipina ($E_{\text{max}}= 99.20\%$). Lo cual sugiere que ang sigue este mecanismo de acción, y para corroborarlo se construyó el ensayo con concentraciones acumulativas de CaCl_2 .

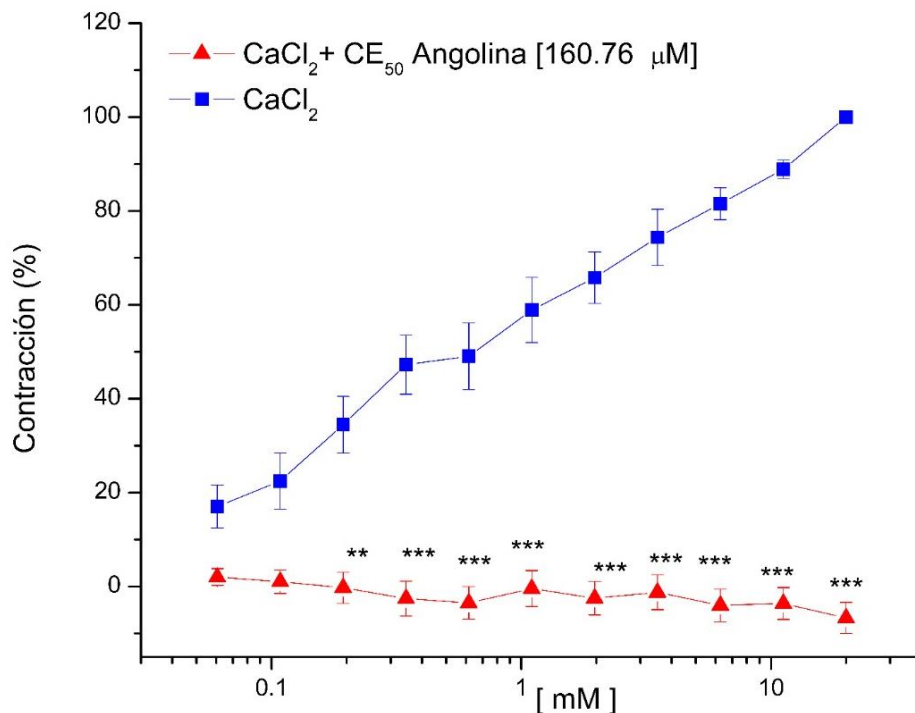


Gráfica 11: Efecto tráqueo-relajante de Nifedipina y Angolina posterior a la contracción inducida por KCl sobre anillos de tráquea aislada de rata.

7.9.7. Participación de los canales de calcio

Para observar si Angolina actúa por bloqueo de los canales de Ca^{2+} , se provocó la contracción inducida por CaCl_2 [80 mM] en presencia y ausencia de la CE_{50} de Angolina (gráfica 12).

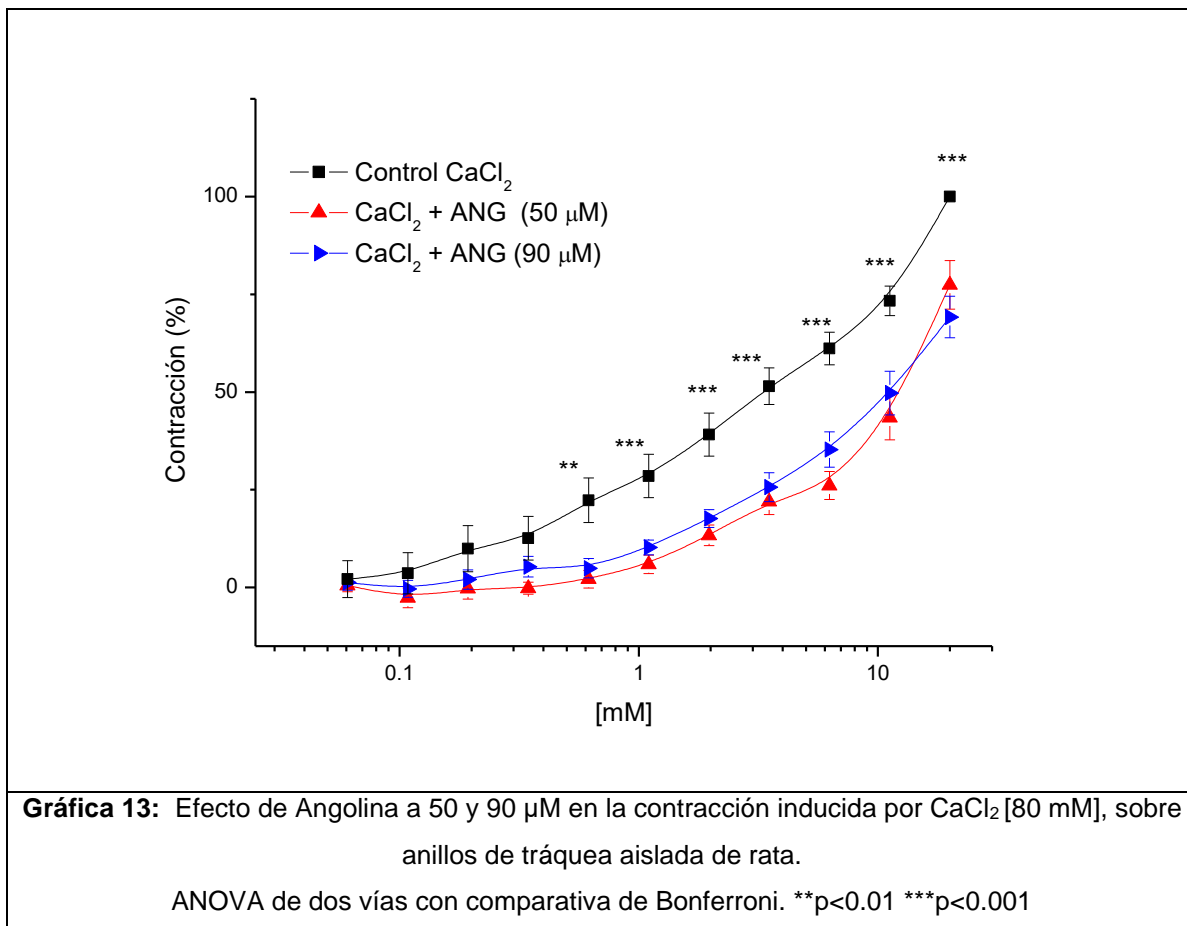
En la gráfica se observa que al incubarse Angolina, se opone a la contracción por CaCl_2 , lo que indica que la relajación por el compuesto es vía el bloqueo de los canales de Ca^{2+} , impidiendo el influjo de este ion a la célula, evitando la cascada de señalización de la contracción.



Gráfica 12: Efecto de la CE_{50} [$160.76 \pm 7.15 \mu\text{M}$] de Angolina en la contracción inducida por CaCl_2 [80 mM], sobre anillos de tráquea aislada de rata.

ANOVA de dos vías con comparativa de Bonferroni. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Finalmente, para observar la acción de ang a menores concentraciones, se hizo el ensayo con CaCl_2 [80 mM] a 50 y 90 μM de ang. Como se observa en la gráfica 13, el bloqueo de canales de calcio disminuyó en comparación con 160 μM . Estos datos sugieren que el efecto depende de la concentración, y al no haber suficientes moléculas para cubrir el total de canales de calcio, el paso del ion sigue provocando contracción, aunque disminuido. Asimismo, debido a la alta afinidad del Ca^{2+} por el canal, probablemente desplace a ang del sitio de acción disminuyendo su actividad.



8. CONCLUSIONES.

El extracto diclorometánico de corteza de *Bocconia arborea* tuvo efecto tráqueo-relajante del 100 %. Derivado del estudio fitoquímico de este extracto se obtuvieron los alcaloides dihidrosanguinarina, oxiqueleritrina, bocconarborina A, angolina y oxisanguinarina. Este último también se encontró en el extracto de fruto. Asimismo, se determinó que estos compuestos son dependientes de la concentración, y podrían tener sinergismo al encontrarse en el extracto integro.

Finalmente, se dictaminó a angolina como el más activo, cuyo mecanismo de acción funcional esta dado por bloqueo del influjo de calcio al medio intracelular, impidiendo la contracción.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Santos, F. N. (2003). Regulación del tono bronquial en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC): papel de los receptores muscarínicos. *Anales de medicina interna*, (Vol. 20, No. 4,).
- Aguilar, N. E. (2009). Etiopatogenia, factores de riesgo y desencadenantes de asma. *Neumología y cirugía de tórax.*, 68(S2), S98-S110.
- Aguirre, O. E. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L.(Papaveraceae). *Revista de tecnología*, 14(2), 21-36.
- Arellano, L. (2019). *Prospección química y antimicobacteriana de los productos naturales presentes en las partes aéreas de Bocconia latisejala S. wats.* . Nuevo Leon: Universidad Autónoma del Estado de Nuevo León.
- Arias-Durán, L. E.-S.-M.-S.-V.-R.-B. (2020). Tracheal relaxation through calcium channel blockade of *Achillea millefolium* hexanic extract and its main bioactive compounds. . *Journal of ethnopharmacology*, , 253, 112643. .
- Azman, S. S. (2021). Traditional medicinal plants conferring protection against ovalbumin-induced asthma in experimental animals: A review. . *Journal of asthma and allergy*, , 641-662.
- Batalla-Roldan, P. (2022). *Aislamiento y caracterización de Benzofenantridinas con potencial antihipertensivo a partir de Bocconia arborea*. Cuernavaca, Morelos : Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Benavides-Trujillo, M. C. (2008). Oxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista colombiana de anestesiología*, 36(1), 45-52.
- Bolton, R. M. (2018). Hiperreactividad bronquial. . *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, , 24(1), 59-63.
- Bordoni, B. S. (2019). The Other Side of the Fascia: The Smooth Muscle Part 1. *Cureus*, 11(5): e4651. DOI 10.7759/cureus.4651 .
- Britt Jr, R. D. (2015). Soluble guanylate cyclase modulators blunt hyperoxia effects on calcium responses of developing human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.*, 309(6), L537-L542.
- Bucciarelli, A. M. (2014). Efectos adversos de plantas medicinales y sus implicancias en salud. . *Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca.*, 24(1), 30.
- Calabró, V. L. (2018). Effects of quercetin on heart nitric oxide metabolism in I-NAME treated rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 647, 47-53.
- Camoretti-Mercado, B. (2009). Targeting the airway smooth muscle for asthma treatment. . *Translational Research*, 154(4), 165-174.
- Cobos, N. (2003). Asma: del síntoma al remodelamiento. *An Pediatr.*, 89-96.

- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Díaz, T. C. (2006). Diferentes tipos de respuesta inflamatoria en el asma. . *Archivos de Bronconeumología*, 13-19.
- Diego-Pérez, N. (2017). *Flora de Guerrero no. 78: Papaveraceae; Primulaceae* . México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de ciencias.
- Dostál, J. &. (2002). Some aspects of the chemistry of quaternary benzo [c] phenanthridine alkaloids. *Studies in natural products chemistr*, 27, 155-184.
- Drugbank. (2023). Nlfedipine. *Drugbank*, <https://go.drugbank.com/drugs/DB01115>.
Obtenido de <https://go.drugbank.com/drugs/DB01115>
- Everard, F. &. (2017). Tratamiento no farmacológico del asma en adultos desde el punto de vista de la kinesiología. *EMC-Kinesiología-Medicina Física*, 38(1), 1-12.
- Gaona -Tovar, E. (2017). *DETERMINACIÓN DEL EFECTO RELAJANTE DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE Bocconia arborea EN UN MODELO ex vivo DE TRÁQUEA AISLADA DE RATA*. Cuernavaca, Morelos.
- Gaona- Tovar, E. (2020). *Estudio químico y farmacológico de Bocconia arborea para la búsqueda de fármacos antihipertensivos y/o antiasmáticos*. Universidad Autonoma del Estado de Morelos.
- Gaona-Tovar, E. E.-S.-T.-V.-L.-G.-P. (2022). Antinociceptive and gastroprotective activities of *Bocconia arborea* S. Watson and its bioactive metabolite dihydrosanguinarine in murine models. . *Journal of Ethnopharmacology*, , 296, 115492.
- Global Initiative for Asthma. (2020). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2020*. Obtenido de Available from: www.ginasthma.org
- Global Initiative for Asthma. (2022). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Obtenido de www.ginasthma.org
- Gosens, R. Z. (2006). Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. . *Respiratory research*, 7(1), 1-15.
- Guía española para el manejo del asma. (2020). GEMA5.0. Guía española para el manejo del asma. © *Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica*.
- Hernández-Almanza, E. T. (2016). *Aislamiento, caracterización estructural y evaluación antimicrobiana de los alcaloides de bocconia latisejala (Doctoral dissertation)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hernández-Martínez, A. L. (2020). Queleritrina: Desde la Medicina Tradicional Mexicana hasta su síntesis y aplicaciones. *Naturaleza y tecnología.*, 37-48.
- INER. (8 de Agosto de 2017). *Gobierno de Mexico*. Obtenido de http://iner.salud.gob.mx/interna/hiperreactividad_bronquial.html

- Kruse, A. C. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552-556.
- Lacoba-Garrido, M. (2022). *Evaluación de la influencia de la obesidad en el asma bronquial y de la existencia de un fenotipo obesidad-asma*. Revisión sistemática.
- Lam, M. L. (2019). Regulation of airway smooth muscle contraction in health and disease. Smooth muscle spontaneous activity: Physiological and pathological modulation, . *Medicine and Biology* , 381-422., https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_16.
- Larenas-Linnemann et al. (2017). Guía mexicana de asma. *Asociación mexicana de Neumología y Cirugía de Torax*.
- Larenas-Linnemann, D., & Salas-Hernández, J. R.-N.-P.-R.-O. (2021). MIA 2021, Comprehensive Asthma Management Guidelines for Mexico. *Revista Alergia de Mexico*, 68.
- Lies, B. G. (2013). Lack of effect of ODQ does not exclude cGMP signalling via NO-sensitive guanylyl cyclase. *British journal of pharmacology.*, 170(2), 317-327.
- Lipworth, B. J. (2005). Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. . *The Lancet*, 365(9454), 167-175.
- López-Cacacho, A. I. (2021). *Transcriptómica comparativa de los canales dependientes de voltaje de sodio (para), potasio (Shaker) y calcio (Dmca1A) del Subfilo Hexapoda*. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, Doctoral dissertation.
- Mackenny, J. (2017). Asma severa problemática en pediatría. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 45-54.
- Martínez-Cuevas, L. R. (2018). *DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIDIABÉTICO Y TOXICOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE Bocconia arborea EN MODELOS MURINOS*. Cuernavaca, Morelos.
- Martínez-Ramírez. (2006). Alteración de la actividad inflamatoria regulada por TH1-TH2 en asma. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.*, 19(2), 136-142.
- Martínez-Ramírez, I., & Aviles-Salas, A. N.-R.-G.-S.-C.-H. (2006). Alteración de la actividad inflamatoria regulada por TH1-TH2 en asma. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(2), 136-142.
- Martínez-Sánchez, L. D. (2014). *Obtención de receptores muscarínicos de acetilcolina recombinantes involucrados en patologías neurodegenerativas*. Catalunya: (Master's thesis, Universitat Politècnica de Catalunya).
- Medina-Trujillo, K. Y. (2019). *Diseño de goma de mascar para fumadores a partir del aprovechamiento del contenido de alcaloides presente en el extracto de la fruta Morinda citrifolia (Noni)*. Universidad de los Andes.
- Menéndez, J. T. (2011). . I. FARMACOLOGÍA DE LOS BLOQUEANTES DE LOS RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS. *Curso beta 2011 de Actualización en Betabloqueantes*.

- Monroy-Ortiz, C., & Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Cuernavaca, Morelos, Mexico.
- Núñez, M. E. (2010). Tratamiento no farmacológico del asma bronquial. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 73(3), 20-25.
- OMS, O. M. (2020). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de <https://www.who.int/respiratory/asthma/es/>
- Padilla-Pérez, J. L.-C.-K.-H.-P. (2020). Cinética trifásica exponencial contráctil aortorácica a KCl independiente de la edad en ratas Triphasic exponential aortothoracic contractile kinetics to KCl independent of age in rats. . *Rev Hosp Jua Mex*, , 87(3), 122-129.
- Palacios-Cruz, M. S. (2021). COVID-19, a worldwide public health emergency. *Revista Clínica Española (English Edition)*, 221(1), 55-61.
- Pérez, R. M. (2003). Actividad antioxidante de los alcaloides de *Bocconia arborea*. Estudio sobre seis métodos de análisis. *Ars Pharmaceutica*, 44:1; 5-21.
- Perez-Gutierrez, R. V.-M. (2002). Identification of benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea* by gas chromatography–Mass spectrometry. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*,, 13(3), 177-180.
- Pino-Pérez, R. (2019). Tipificación de nombres de táxones nuevos de Baltasar Merino en la familia Papaveraceae. *Nova Acta Científica Compostelana*, (26).
- Prieto-González, S. (2004). Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*.
- Ramírez-Hernandez, A. D. (2021). *Determinación del efecto relajante ex vivo de extractos orgánicos obtenidos de las diferentes partes de Bocconia arborea de dos colectas diferentes*. Cuernavaca, Morelos.
- Renna, N. F. (2013). *Fisiología del músculo liso vascular*. 172-175: Cardiología.
- Ríos, J. M. (2013). Detección de alcaloides en semillas de plantas herbáceas nativas. . *Multequina*, , 22(2), 51-55.
- Robert, C. O. (2014). *DROGAS CON ALCALOIDES*. Facultad de Farmacia y Bioquímica .
- Rodríguez, M. R. (2017). Actualización en asma. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(30), 1745-1756.
- Roldán-Bretón, N. R. (2015). Asma alérgica: mecanismos inmunológicos, fisiopatología y tratamientos actuales. . *Investigación y Ciencia*, 23(65), 66-72.
- Sánchez, T. &. (2018). Estructura y funciones del sistema respiratorio. . *Neumología pediátrica*,, 13(3), 101-106.
- Sánchez-Arreola, E., & al., e. (2006). Alkaloids from *Bocconia frutescens*. and Biological Activity of their extracts. *Pharmaceutical Biology*, 44:7, 540-543.

- Sanchez-Cuellar, S. (2013). Asma: Patogenia y Bases Moleculares. En C. P. Carolina Cisneros Serrano, *Actualización en asma*. Madrid: Monografía NEUMOMADRID.
- Sullivan, S. D. (2008). An evaluation of the cost-effectiveness of omalizumab for the treatment of severe allergic asthma. . *Allergy*, , 63(6), 670-684.
- The Global Asthma Report. (2022). *Int J Tuberc Lung Dis*, 26: S1–S102.
- Tortora, G. J. (2002). Principios de anatomía y fisiología. Editorial Medica Panamericana.
- Valdés-Cobos, A. (2013). Conservación y uso de plantas medicinales: el caso de la región de la Mixteca Alta Oaxaqueña, México. *Ambiente y Desarrollo*, 17(33), 87-99.
- Villareal, E. R. (2016). *Arboles de Minatitlan, Colima*. Colima, Mexico.
- Vives, R. F. (2007). Agonistas beta-adrenérgicos. . *Tratado de Alergología*,, 2, 262-277.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Armando Daniel Ramírez Hernández

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

22 junio del 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2023-06-22 21:41:22 | Firmante

ClaOxt+3aALyEfG+U3eXYghEH1wbXSRrwAt2/Mq239x3dBht4193L1QAaw5icsdowiqmGKYVDA11CmyF1BvTBfseFHZFoSDJRNH2txFJFBWSs2+TAnqpq5EQCHwxakLiz3Eg5Udtko+6trnlZDdAXQGHdsW4oGaU09XBg8Jxak3DqYNs9lwSGOlaJJBUAxI7a2t2XHc1HcWNF2o9Opeh1ZTJj+J/cMSu/cC1nYagqte2Da0NEwGMdjfwNOyTDML8B9DiSQagjwGJiA7xjdaIAcLI5yCb6zv5zfY5h3GvK+0Oz4PyLBLHQ3SyIC1J1x4+C/SpzGTIMYIfyxZp8V2+wM8Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[AnxFb02RZ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ZiXHf1kpdEFF32n3SjOA9lsSX1km5tLi>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Armando Daniel Ramírez Hernández

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Irene de la Concepción Perea Arango

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

22 junio del 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2023-06-22 18:16:31 | Firmante

P0GqqZKQuUI7xB1OyeX6VycfQfB9gkOP8awy8zyjzIV7V5KKOWpbjdfHHI6IK61RthhNw8J6xmyNfFcG7PQP8k9X69O78k+BKMfexJUUp32aGf40bcaGh3k98CSVtHKI4fVUIz55gXSBOuL1IYGz7M7YkQDo7A2dXGn70b27naXJrP6OMn2mv5bW8+5WzsuMwH1qs7/niA2m+/QUQwWBYzGKssBWRct6nqzxb5uhH0mpRIFFPvUjtj3NylhDrCwoFwQz7XpDSERL8x9TZFh+RUKJ4NrxRVYGFYU57EF2k7Zbj63XZkv4K7fEnHfl1wXQeSsTMJUg9kM9XNA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[puS6E8UsC](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/a8nzz64tMGpfCvLaW0OwBugPludNuPWS>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Armando Daniel Ramírez Hernández

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

22 junio del 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-06-25 11:50:23 | Firmante

fyT4KlrWjfhX51bTrWphUmHH8n3MvWY5J2JfASliCfvlciUFWVYNVUg6mlKmkIipzHKK5qAjkeXGGfaUO2jfhAoYe3q42ryV/N2+PD/ZDyTf4uHlfz7JblGouWxa0aTuu/GMIJNBuQGjGcn70aWfg/DfxfY0s+o/DuZK64GXTLKNc4csTerFXu3khIOW5hL3LE2kp+3a+HZ2AiqnR0AA9FlsNF8NxQ3jWRoHENh3npwI6rcy05coORTIaj+2sBARXTYl29CFuM3qWgqjtlAz/U3pgvn+Pe3T0W1rsjxKxnhYKhVq5LbYrftt5zILjuzlNwcv3N6Dspdzrpu6m8zbQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[I5yhLcdkS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/546kLsF6Swk7k4YotRDblIntg3u4USNb>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Armando Daniel Ramírez Hernández

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Angélica Flores Flores

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

22 junio del 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha:2023-06-22 09:03:22 | Firmante

ca0i5mrD9me7yoJI68q4WbuwQIFEEIqsRgtkLfS1DF9cfxEUok8blOpahS40CcssqO6mTMchjNMrmRYpmV6JuHyTFUL4PCXYM/gSeNnw7yBau2+KddQdv3Hh6SGNdlbYH0fbvWoOdXALcz0Zi3d87bch8CUsVwJAZAcsfRR/S1+ujmbl6hMF0y0ES51lPr+esWfyo413FY9t3vzlgGUUMecPjnjSTz67P1zJXWVW/yd5plXG584qSZ5t3oQ9D/Tqjrcbc+9YvnnvYoS8H6nZon5pd6FYxa9OhmPmHxftCHqjZ8Q7bftd+i7H2JVdQKyBw2PdFIE+grf2gP+c7t/Rug==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[vBizlVWFE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8Nn6dDISWqibfW06OyZTgMseKgrvLQwH>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Armando Daniel Ramírez Hernández

Título de la tesis: “Estudio fitoquímico biodirigido de *Bocconia arborea* para la búsqueda de compuestos bioactivos traqueorelajantes”.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Rafael Villalobos Molina

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

Firma Jurado

22 junio del 2023

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAFAEL VILLALOBOS MOLINA | Fecha:2023-06-22 18:43:18 | Firmante

Y56VLRJNPC+esvLri23yPyaiPh1Fn8DN5AWoEMotomK19p18BGfk8ptiVv13bW+u4wm5ib3vl62jO8GskEip9WmqXm6lgRRnXoEY/hjyxjZ88trZiT0mDMud7AChSR5RNbl3oJMueL
VQmq7aDwOK2ZEJNYj6xTju6LmCPvWf45oylpy/PLAIGRev7H9mTabOD9JpFJvfEp7l67hYEuTSjwFLEkpF0F8bXOTxM3imX3aaxLfzLB/mpysnPMTu0z1TFXYgeTwBNcx7yYgKh
fF+EwKAmy49CxA5d9iTIWDwrm3mCS5HozMd1+cwl39tK1DpVxEukbPKEWjme0P9AuVb+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xd9skrTIY](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TTUfjUiRyzpjAufynyaOJv724LNxSLft>

