



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E
INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
LICENCIATURA EN QUÍMICA

PSORALENOS DE LAS RAÍCES DE
Conium maculatum

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

P R E S E N T A:

Laura Adriana Ortiz León

A S E S O R

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Química **Laura Adriana Ortiz León**, quien presenta el trabajo de titulación "**Psoralenos de las raíces de *Conium maculatum***" después de revisar el trabajo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dra. Maricruz Sánchez Zavala
PRIMER VOCAL:	Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Noemí Andrade López
TERCER VOCAL:	Dra. Susana Rojas Lima
SECRETARIO:	Dr. J. Roberto Villagómez Ibarra
PRIMER SUPLENTE:	Dr. T. Eduardo Fernández Martínez
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Claudia Velázquez González

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 29 de noviembre de 2011.

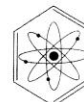
Dra. Claudia Coronel Olivares.
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO



CENTRO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICAS

Ciudad Universitaria Carretera Pachuca – Tulancingo
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184
Mineral de la Reforma, Hidalgo. México.
Tel: (771)7172000 ext. 2218 Fax. 6502
E mail: ccoronel@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado, un
esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

A Dios, porque es tan maravilloso creer en ti, tener poco que pedirte y tanto que agradecerte.

A mis padres Susan y Santiago, por creer en mí, su amor, consejos, esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado durante este largo camino, deseo que este también sea logro suyo, el cual representa la herencia más valiosa que pudiera recibir. Los amo.

A mí hermana Ana, por tu cariño, apoyo, por ser mi amiga y enseñarme a analizar la vida tan detalladamente.

A mi abuela Teresa, por ser mi mejor amiga, tu comprensión y apoyo han sido el motor que me alienta a seguir adelante.

A mis tíos Luis, María, Martín, Micaela, Rosario, Santos, por su cariño incondicional y alentarme en mis sueños.

A mi prima Nayeli, por ser como mi hermana menor y por los ánimos para terminar la tesis.

A mis amigos Alejandro, René, Felipe, Jorge, Horacio, Miguel, Arely, Fernanda, Félix, Inés y Judith, por su gran apoyo académico, emocional y compartir momentos tan gratos e inolvidables.

A cada uno de los Doctores que integran el Área Académica de Química, que me ayudaron en mi enseñanza profesional, a quienes confiaron en mí y me alentaron a continuar mi sueño.

A los Doctores Roberto Villagómez Ibarra, Maricruz Sánchez Zavala, Susana Rojas Lima, Noemí Andrade López, Eduardo Fernández Martínez y Claudia Velázquez González, que integran mi jurado y se tomaron el tiempo de asesorarme en el escrito de trabajo de tesis.

A mi asesor de tesis, el Doctor J. Martín por la confianza depositada para realizar el proyecto, su paciencia, sus enseñanzas tanto en el aula como en el laboratorio, sus consejos y por ser un ejemplo como investigador. Mil gracias.

El presente trabajo se realizó en Centro de Investigaciones Químicas, perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia (CIQ-UAEH).



SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$[\alpha]$	Rotación específica
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
c	Concentración
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
COSY	Correlation spectroscopy
δ	Desplazamiento químico
DFDMA	Difosfato de dimetilalilo
DMBA	Línea celular cáncer de mama
Fig.	figura
Fru	Fructosa
g	Gramos
GC-MS	Espectrometría de gases-masa
Glc	Glucosa
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento

kg	Kilogramos
L	Litros
MDCK-MDR1	Línea celular epitelio de riñón
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	MegaHertz
min	Minutos
mL	Mililitros
m/z	Relación masa-carga
No.	Número
OPP	Difosfato
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PUVA	Psoraleno y rayos ultravioleta
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³ C [¹ H]	Resonancia magnética nuclear de carbono 13 desacoplado a protón.
SAM	S-adenosilmetionina
TMS	Tetrametilsilano

UDP	Uridina difosfato
UV	Radiación ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Rutas metabólicas, metabolismo primario y secundario	3
1.2. Biosíntesis de la sacarosa	5
1.3. Cumarinas	7
1.3.1. Biosíntesis de cumarinas	8
2. ANTECEDENTES	12
2.1. El género <i>Conium</i>	12
2.2. Composición química	17
3. OBJETIVO	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Colecta e identificación de la especie	26
5.2. Obtención de la sacarosa	27
5.3. Obtención de β -sitosterol y estigmasterol	34
5.4. Obtención de furanocumarinas	37
5.4.1. Análisis por espectrometría de gases-masa (GC-MS) de la mezcla de psoralenos	47

6. CONCLUSIONES	53
7. PARTE EXPERIMENTAL	56
7.1. Generalidades	56
7.2. Recolección e identificación de la especie	57
7.3. Obtención de sacarosa	57
7.4. Separación del extracto de acetato de etilo de la raíz de <i>Conium maculatum</i>	58 58
7.4.1. Obtención de β -sitosterol y estigmasterol	58
7.4.2. Obtención de furanocumarinas	59
8. REFERENCIAS	60

1. INTRODUCCIÓN

Conium maculatum L. (Apiaceae = Umbelliferae) (Fig. 1.1) es originaria de Asia y Europa y se introdujo en América como planta ornamental (López, 1999). Esta especie se ha identificado en México en los estados de Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Guanajuato, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Veracruz e Hidalgo (CONABIO, 2011). Aunque la parte aérea, ha tenido uso tradicional como remedio para el cáncer, sedante, analgésico y anestésico (Foster, 2000), se distingue por tener propiedades venenosas o tóxicas atribuidas a la producción de alcaloides de piperidina (López, 1999; Reynolds, 2005).

C. maculatum se reproduce de manera abundante en el estado de Hidalgo, particularmente en los municipios de Actopan, Ixmiquilpan, Mineral del Monte y Tulancingo, en zonas húmedas alrededor de ríos y canales de riego y, hasta donde se conoce, no ha sido estudiada en su composición química. En este trabajo se describe el estudio químico de sus raíces, lo cual condujo a la identificación de la sacarosa y una mezcla de las furanocumarinas conocidas como psoraleno, bergapteno, xantotoxina e isopimpinellina (Fig. 1.1).

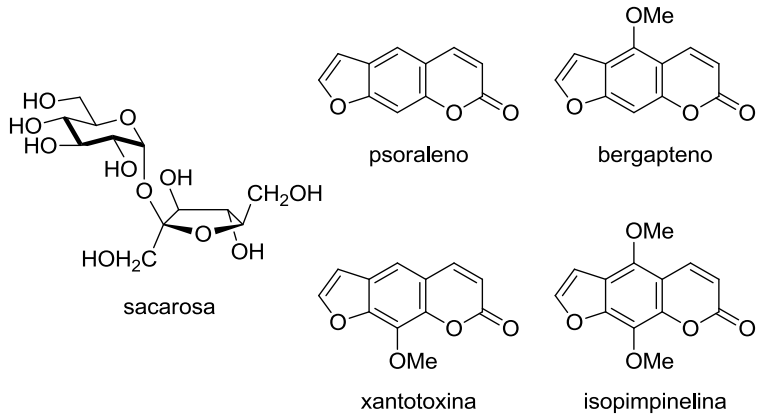


Figura 1.1. Imagen de *Conium maculatum* L. y las estructuras de los metabolitos aislados de sus raíces.

De los compuestos mostrados en la Figura 1.1, la sacarosa se considera un metabolito primario, mientras que las furanocumarinas se clasifican dentro de los metabolitos secundarios. Para el mejor entendimiento de estos conceptos, se describirán en el siguiente tema.

1.1. Rutas metabólicas, metabolismo primario y secundario

Todos los organismos necesitan transformar una gran cantidad de compuestos orgánicos para nacer, crecer y reproducirse. Así mismo, requieren proveerse de energía y de unidades edificadoras para construir sus tejidos. Con tal propósito dentro de estas se llevan a cabo una gran variedad de reacciones químicas reguladas por enzimas. Todo este proceso se refiere al metabolismo intermediario y los cambios implicados en ello son conocidos como **rutas metabólicas**.

Los organismos presentan variaciones en su capacidad de llevar a cabo transformaciones químicas. En este sentido, las plantas son muy eficientes en la síntesis de compuestos orgánicos vía fotosíntesis, a partir de compuestos inorgánicos que se encuentran en su entorno y requieren de sintetizar moléculas especializadas a partir de sustancias básicas como el CO_2 , N_2 , H_2O y algunos metales.

A pesar de la amplia variedad de organismos vivos, se ha encontrado que las rutas para la síntesis y modificación de **carbohidratos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos** son esencialmente las mismas en todos ellos, con algunas variaciones menores. Esto demuestra lo fundamental que son estos procesos para todo ser viviente que en conjunto se les llama metabolismo primario, y los compuestos involucrados se les denomina **metabolitos primarios**.

En contraste de estas rutas metabólicas primarias, en las cuales se sintetizan, degradan y se transforman compuestos encontrados comúnmente en todos los

organismos, también existe un área del metabolismo que corresponde a sustancias con una distribución limitada en la naturaleza. Tales sustancias, llamadas **metabolitos secundarios**, se encuentran sólo en organismos específicos o grupos de organismos, y son una expresión de la individualidad de las especies. Los metabolitos secundarios no son necesariamente producidos bajo cualquier situación y en la gran mayoría de los casos, su función y beneficio para el organismo que los produce no es bien conocido. Algunos son producidos, por ejemplo, como sustancias tóxicas previendo defensa contra depredadores, atrayentes volátiles hacia la misma o diferente especie, o como agentes coloridos. Esta es el área del metabolismo secundario, el cual provee de la mayoría de los productos naturales farmacológicamente activos. En general, los colores, aromas y principios activos son considerados como metabolitos secundarios.

De manera general, se puede clasificar a los metabolitos secundarios en tres grandes familias dependiendo de su ruta biosintética: **alcaloides** (ruta del ácido shikímico), **terpenos** (ruta del ácido mevalónico y 1-desoxi-D-xilosa-5-fosfato) y **policétidos** (ruta del acetato-malonato). Sin embargo, existen otras familias de compuestos que resultan de rutas biosintéticas combinadas, como es el caso de los **flavonoides**, **cromonas** y **cumarinas** (Dewick, 2009).

1.2. Biosíntesis de la sacarosa

La sacarosa (azúcar) pertenece a la familia de los carbohidratos, es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa unidos mediante un enlace glicosídico $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ (Fig. 1.2).

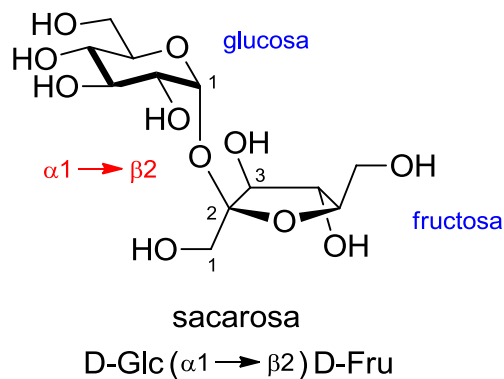


Figura 1.2. Estructura de la sacarosa.

La biosíntesis de la sacarosa se encuentra regulada principalmente por tres pasos, los catalizados por la fructosa-1,6-fosfatasa, la sacarosa-6-fosfato sintasa y la sacarosa fosfato fosfatasa (Fig.1.3). El proceso inicia con la fotosíntesis para generar la dihidroxiacetona y el D-gliceraldehído-3-fosfato, los cuales conducen a la condensación de la fructosa-1,6-bifosfato, y su hidrólisis forma fructosa-6-fosfato. La sacarosa-6-fosfato-sintasa cataliza la reacción de la fructosa-6-fosfato con UDP-glucosa (glucosa activada) para formar sacarosa-6-fosfato. Finalmente,

la sacarosa-6-fosfato-fosfatasa elimina el grupo fosfato permitiendo que la sacarosa esté disponible para transporte desde la célula hasta los tejidos de la planta (Fig. 1.3) (Dewick, 2009).

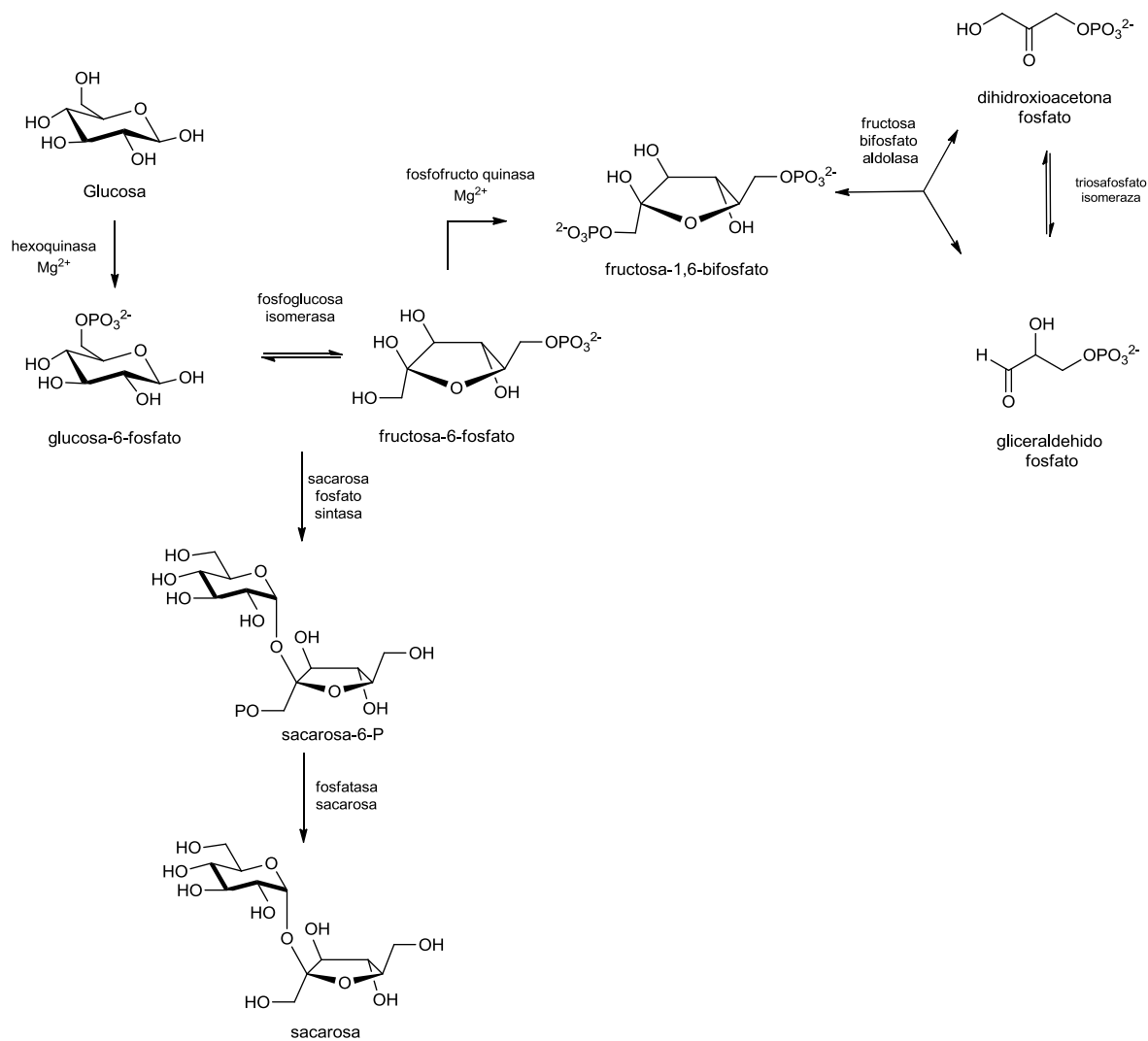


Figura 1.3. Biosíntesis de la sacarosa.

1.3. Cumarinas

El nombre de cumarina, proviene de “coumarou” nombre común de la haba tonca (*Coumarouna odorata* o *Dipteryx odorata*). Las cumarinas se obtienen principalmente de las familias de Umbelíferas/Apiaceae y Rutaceae, su núcleo es una benzo-2-pirona o benzo- α -pirona (Fig. 1.4) (Carretero, 2000), son lactonas insaturadas y prácticamente todas poseen un sustituyente oxigenado en posición 7, ya sea como hidroxilo libre (umbeliferona) o alquilado (metilo, azúcares, etc.) (Arango, 2010). Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, tanto en forma libre o como glucósidos y abundan en los frutos y flores. Se considera que la función que desempeñan dentro del organismo es la autodefensa, antimicrobiana, captación de radiación UV e inhibidor de la germinación (Olmedo, 2009).

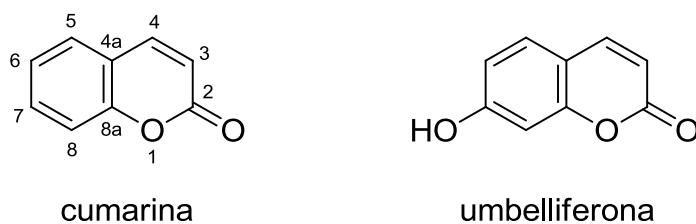


Figura 1.4. Estructura principal de cumarinas.

Las cumarinas poseen gran actividad biológica, entre ellas la acción anticoagulante, antibiótica, estrogénica y fotosensibilizadora (bergapteno y xantotoxina) (Lázaro, 2006). Algunas cumarinas se utilizan en la industria de alimentos como saborizantes y en la perfumería (Arango, 2010).

1.3.1. Biosíntesis de cumarinas

Las cumarinas se forman mediante la ruta de ácido shikímico, el cual proviene de la glicólisis de la glucosa, vía la unión del fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa-4-fosfato. El ácido shikímico es precursor de uno de los aminoácidos esenciales, la L-fenilalanina, que a su vez conduce al ácido cinámico (Fig. 1.5).

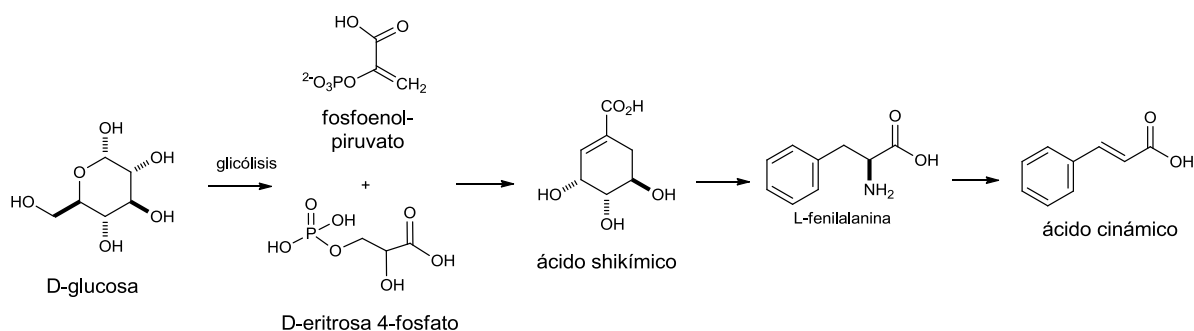


Figura 1.5. Biosíntesis del ácido cinámico.

La hidroxilación en la posición *orto* o en *para* genera los ácidos 2-hidroxicumárico o 4-hidroxicumárico, respectivamente. El ácido 2-cumárico mediante la isomerización *trans-cis* y posterior lactonización, conduce a la cumarina. A su vez, la hidroxilación *orto* a la cadena lateral del ácido 4-cumárico, seguido por la isomerización *trans-cis* y lactonización da lugar a la umbeliferona (Fig. 1.6) (Dewick, 2009).

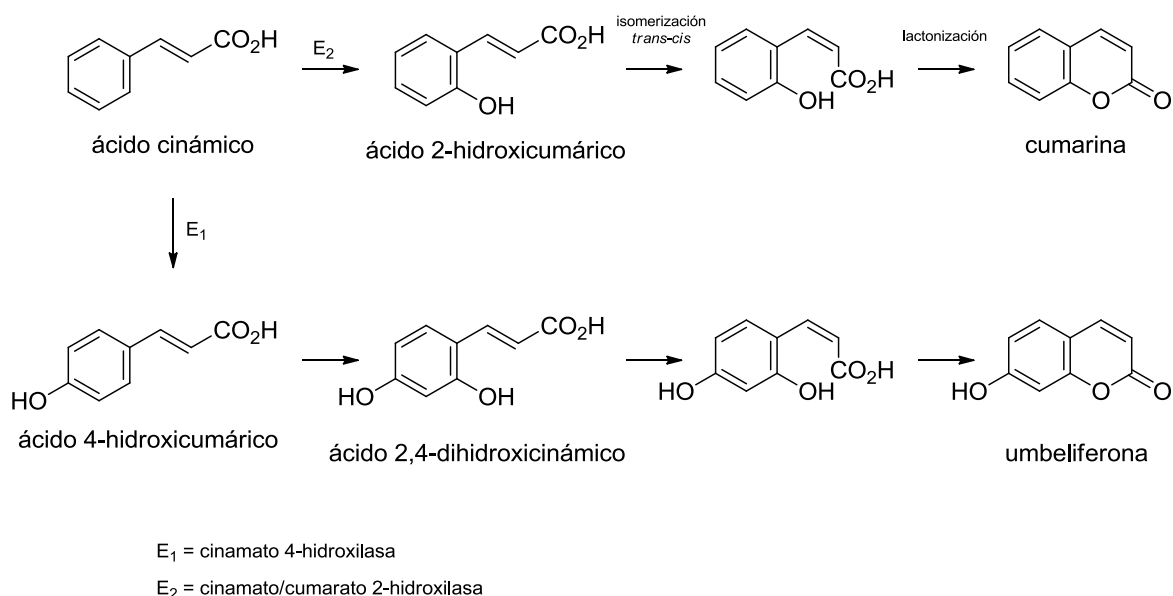


FIGURA 1.6. Biosíntesis de la cumarina y la umbeliferona.

El anillo aromático de la umbeliferona se puede activar en posiciones *orto* al grupo hidroxilo y pueden ser alquiladas por un agente como el difosfato de dimetilalilo (DFDMA), dando lugar a la demetilsuberosina, la cual a su vez forma la marmesina. La pérdida del grupo isopropiloxi de la marmesina conduce a la

formación del psoraleno, el cual mediante la hidroxilación en la posición 5 u 8 genera el bergaptol o el xantotoxol, respectivamente. La metilación de estos grupos hidroxilo por el agente metilante s-adenosilmetionina (SAM) da lugar al bergapteno y a la xantotoxina. Finalmente, la hidroxilación y posterior metilación (SAM) tanto del bergapteno como la xantotoxina conduce a la isopimpinellina (Dewick, 2009).

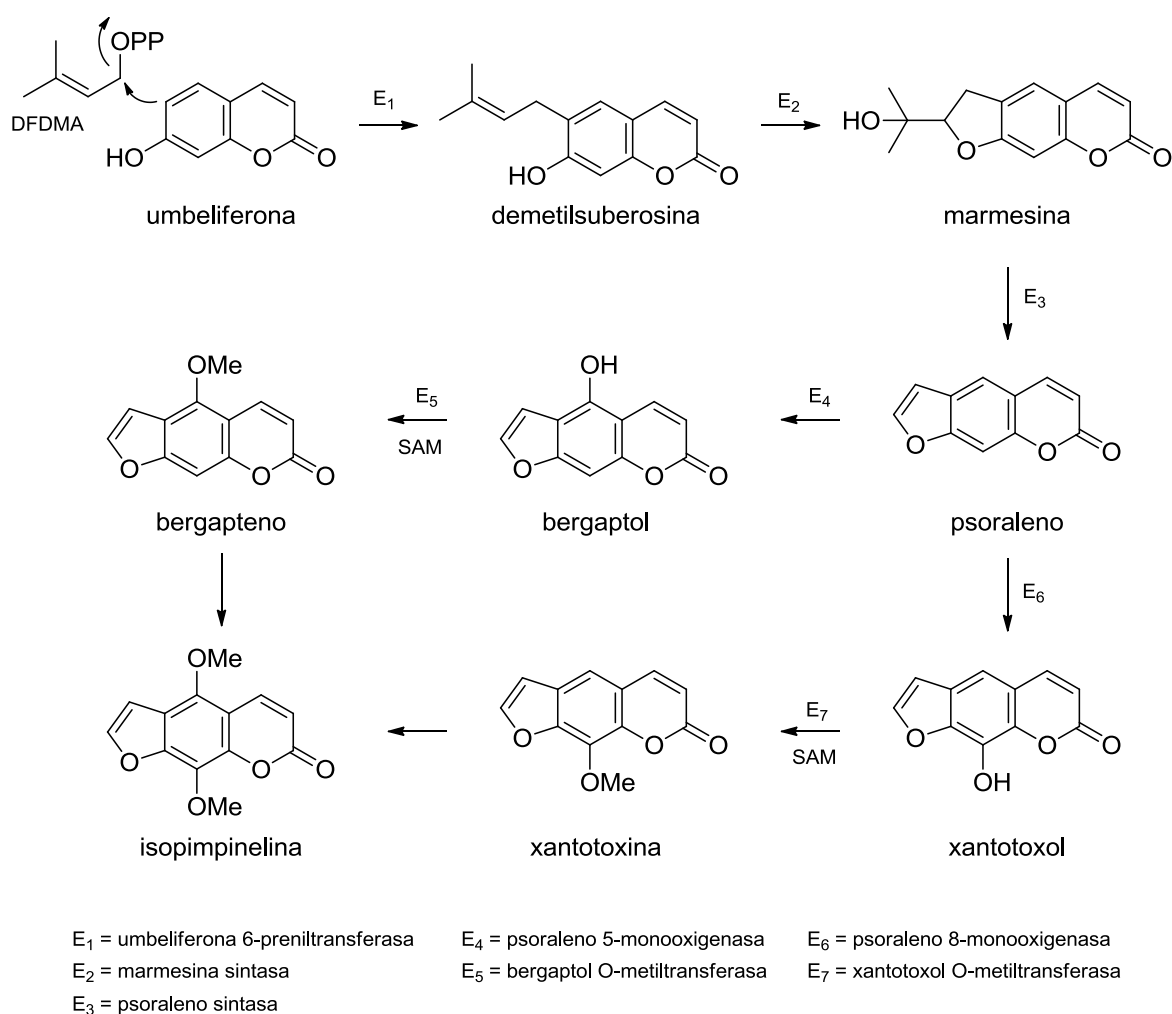


FIGURA 1.7. Biosíntesis de furanocumarinas (psoralenos).

Debido a su naturaleza plana de los psoralenos, éstos pueden actuar como intercaladores en el ADN, mediante una cicloadición 2+2 con bases pirimídicas tanto en el anillo del furano como en el de la piranona (Fig. 1.8). Esto trae como consecuencia la inhibición de la proliferación de células anormales en la piel y la eficacia en el tratamiento de la psoriasis y el vitíligo (Dewick, 2009).

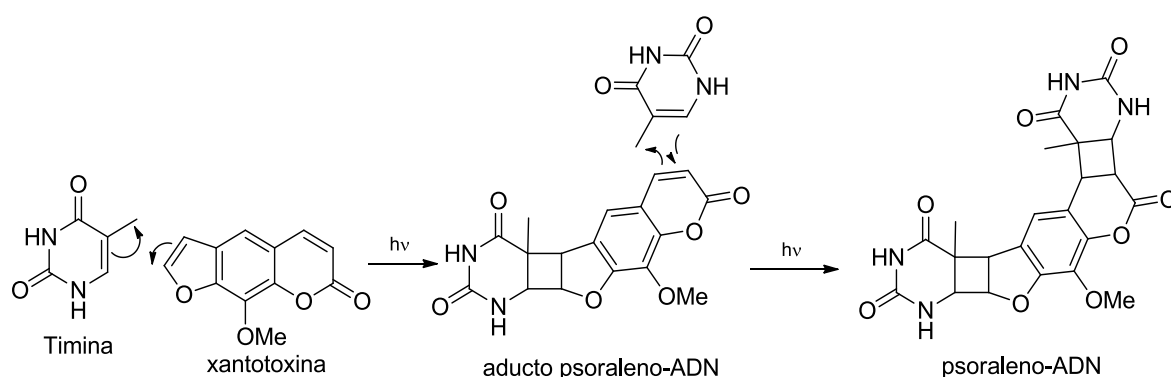


FIGURA 1.8. Reacción psoralenos con el ADN.

Se ha descrito que varios psoralenos poseen actividad antifúngica (*Aspergillus niger* y *Cornularia lanata*) (Sanabria, 1986), analgésica, antitumoral (MDCK-MDR1 y DMBA) (Riveiro, 2010) antiinflamatoria, antioxidante (Fylaktakidou, 2004), antirreumática, anticoagulante, antibacteriano (*Depressaria pastinacella*, *Copidosoma sosares* y *Sclerotinia sclerotiorum*) (Ode, 2004) y anti-VIH (Wu, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1. El género *Conium*

El género *Conium* pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae), está comprendido aproximadamente por 29 especies (Tabla 2.1) (Plantsystematics, 2011), y como se mencionó en la introducción, se distinguen por tener propiedades venenosas o tóxicas, son nativas de Europa y Asia occidental pero llegaron a América como plantas ornamentales (Holm, 1997).

Tabla 2.1. Especies conocidas del género *Conium*.

<i>C. africanum</i>	<i>C. fontanum</i>	<i>C. rigidum</i>
<i>C. arracacia</i>	<i>C. jacquini</i>	<i>C. royeri</i>
<i>C. ceretanum</i>	<i>C. maculatum</i>	<i>C. rugosum</i>
<i>C. chaerophylloides</i>	<i>C. monieri</i>	<i>C. sphaerocarpum</i>
<i>C. cicuta</i>	<i>C. moschatum</i>	<i>C. strictum</i>
<i>C. croaticum</i>	<i>C. nepalense</i>	<i>C. suffruticosum</i>
<i>C. dichotomum</i>	<i>C. nodosum</i>	<i>C. tenuifolium</i>
<i>C. divaricatum</i>	<i>C. pyrenaicum</i>	<i>C. verrucosum</i>
<i>C. filifolium</i>	<i>C. rigens</i>	

Conium maculatum L., (Fig. 2.1) también llamada cicuta o cicuta mayor, es una planta herbácea bianual, erecta, con tallos que alcanzan hasta los 2 m de altura, es semejante al perejil o al hinojo, de los cuales apenas se distingue por el olor desagradable de sus hojas. Tiene una raíz fibrosa, el tallo es verdoso de sección cilíndrica y hueca, contiene estrías y presenta manchas de color púrpura (lo cual facilita su identificación). Las hojas son blandas, triangulares y divididas en gajos elípticos, puntiagudos y dentados de hasta 50 cm de largo y 40 cm de ancho (López, 1999). Las flores son pequeñas y de color blanco. Crece en los setos, al pie de muros y caminos, suelos frescos principalmente nitrificados por la actividad de ganado, también en ríos, cunetas y huertas abandonadas. Florece en los meses de junio y julio (Chessi, 1998).



Figura 2.1. Partes de *Conium maculatum* L.

Debido a su toxicidad, *C. maculatum* L. fue utilizada por los antiguos griegos para quitarles la vida a los prisioneros. El filósofo Sócrates, acusado de negar a los dioses y corromper a los jóvenes griegos con sus ideas, fue condenado a muerte bebiendo una infusión de cicuta en el año 399 a.C. (Reynolds, 2005) (Fig. 2.2).

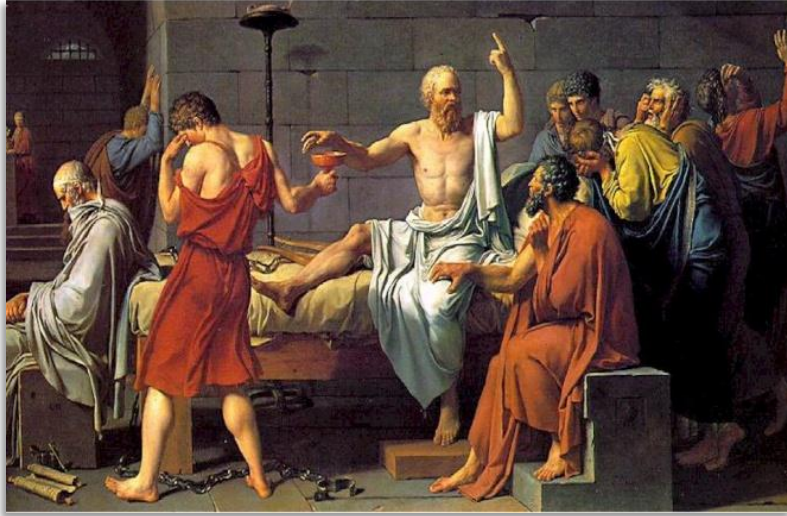


Figura 2.2. Pintura representando a Sócrates y sus discípulos, en la que el filósofo toma la cicuta que le provocó la muerte.

Así mismo en la isla griega de Ceos o Zea, la especie fue empleada como solución final en épocas de hambruna; los hombres mayores de 60 años eran obligados a tomarla en un sacrificio tendiente a que los alimentos fuesen suficientes para el resto de la población. En Norteamérica las mujeres *chérokee* mascaban y tragaban la raíz de la especie, durante cuatro días consecutivos para lograr una esterilidad permanente. En los EE.UU. la palabra *hemlock* es el nombre inglés de la cicuta, que promueve el suicidio asistido a enfermos terminales, aliviando el sufrimiento y el dolor. Los pacientes toman la decisión consciente de finalizar con sus vidas (Kotsias, 1999).

En medicina tradicional, el uso principal de *C. maculatum* es como antiespasmódico, sedante para calmar dolores persistentes e intratables producidos por el cáncer, analgésico y anestésico. También ha tenido uso como agente antirreumático y para el tratamiento del resfriado (Foster, 2000).

2.2. Composición química

Se han llevado a cabo algunos estudios fitoquímicos sobre la especie europea y asiática de *Conium maculatum*, revelando la presencia de alcaloides (constituyentes principales de los frutos y flores), aceites esenciales, glucósidos de flavonoides, y cumarinas en la parte aérea. La toxicidad de la especie es atribuida principalmente a la producción de los alcaloides derivados de la piperidina tales como la conina (ocho veces más tóxica que los otros alcaloides producidos), γ -coniceína, *N*-metilconina, conhidrina, pseudoconhidrina, conhidrona, *N*-metilpseudoconhidrina y 2-metilpiperidina, que tienen efectos neurotóxicos (López, 1999).

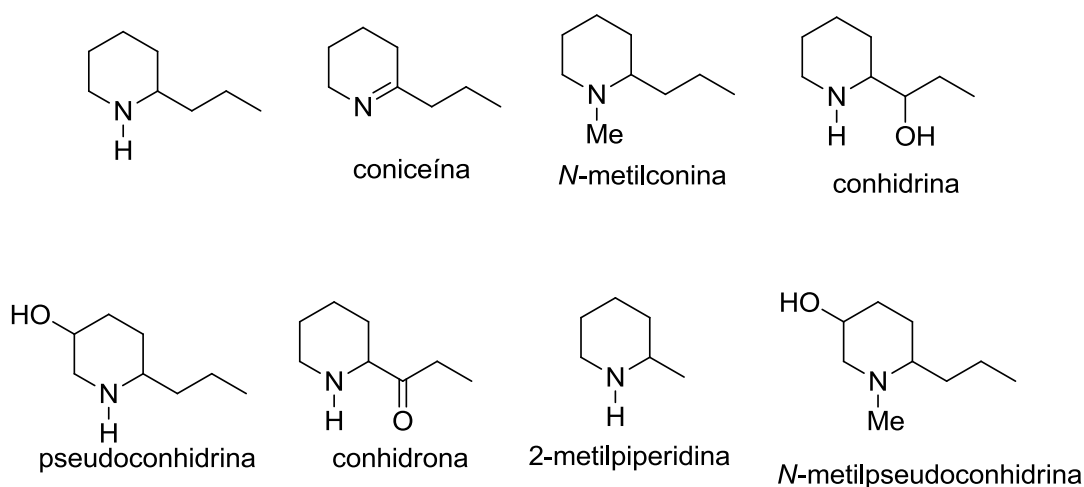


Figura 2.3. Alcaloides aislados de *C. maculatum*

En los animales, los signos clínicos de la intoxicación son debilidad muscular, incoordinación, temblor, agitación nerviosa y muerte por depresión respiratoria;

constituye un problema en medicina veterinaria por las deformaciones fetales y la disminución en la fertilidad que produce la ingesta. En el ser humano produce cuadros graves de necrosis muscular y falla renal por necrosis tubular, así como trastornos en el sistema nervioso central (Kotsias, 1999). Los aceites esenciales de las flores y hojas están constituidos por ácidos grasos insaturados derivados de la degradación oxidativa, y actúan como respuesta al estrés durante la recolección y corte de la planta, o son activadores de la atracción de insectos polinizadores. En el análisis por GC y GC-MS de los compuestos orgánicos volátiles de la cicuta en Serbia, se encontró al germacreno D como el compuesto mayoritario (41%), es un fitofármaco y su uso medicinal está relacionado con trastornos nerviosos, antidepresivo, sedante y afrodisíaco. Así mismo, se han aislado (*E*)- β -ocimeno (22.3%) y (*Z*)- β -ocimeno (7.1%) (Radulovic, 2008).

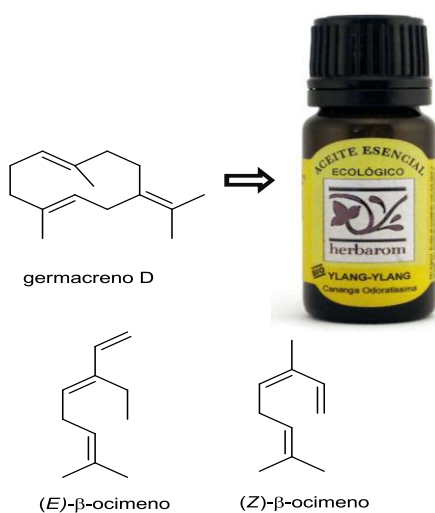


Figura 2.4. Aceites esenciales aislados de la cicuta en Serbia y uso del germacreno D.

Quizás los compuestos más importantes que se han aislado de la parte aérea, tanto de *C. maculatum* como de otras especies de la misma familia, son las furanocumarinas (bergapteno, psoraleno, xantotoxina e isopimpinellina), las cuales han sido aisladas y comprobado su actividad biológica y/o farmacéutica en otras fuentes (Mohammad, 2010).

Se ha demostrado que las furanocumarinas aisladas del apio infectado por *Sclerotinia sclerotiorum* actúan como fitoalexinas, siendo compuestos antimicrobianos que se acumulan en altas concentraciones después de infecciones bacterianas o fúngicas. Estas fitoalexinas ayudan a limitar la dispersión del patógeno (Beier, 1983). Así mismo, el nivel de psoralenos como xantotoxina y bergapteno causan trastornos en la piel (fitofotodermatitis) de las personas que trabajan en los campos de apio (Koehler, 1972).



Figura 2.5. Apio infectado por *Sclerotinia*.

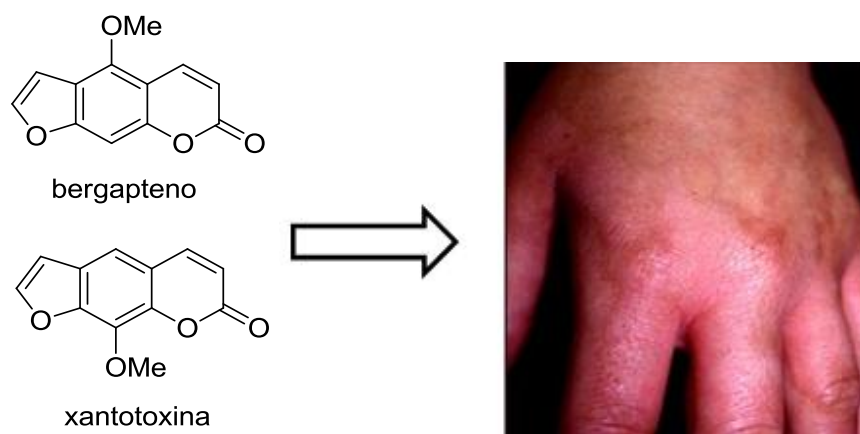


Figura 2.6. Ampollas causadas por psoralenos.

Existen estudios donde se demuestra la actividad defensiva de bergapteno, xantotoxina e isopimpinellina hacia el gusano tejedor (*Depressaria pastinacella*) (Fig. 2.7), en especies de la familia apiaceae de América del Norte. El gusano afecta disminuyendo su defensiva química o cambiando el nivel defensivo en la planta, ya que tiene la capacidad de inactivar a las furanocumarinas en su metabolismo (citocromo P450). Por lo tanto el crecimiento del parásito en una población depende enormemente de la concentración de furanocumarinas, aunque el alto nivel de estos compuestos promueve la baja producción de frutos (Ode, 2004).



Figura 2.7. *Depressaria pastinacella*.

La radiación UV es uno de los factores ambientales que aumentan la síntesis de furanocumarinas lineales (Zobel, 1993), por lo tanto son potentes moduladores del crecimiento de las células epidérmicas. Tal capacidad ha permitido el uso de la fotoquimioterapia como tratamiento en enfermedades de la piel tales como la psoriasis, vitíligo, alopecia areata (Mohammad, 2010) y micosis fungioide (Gambari, 2007). Esta técnica ayuda a la proliferación y producción de melanina en la piel, el método consiste en utilizar de forma oral (PUVA sistémico) o tópicamente (PUVA tópico) psoralenos (bergapteno, psoraleno, xantotoxina e isopimpinellina) y posteriormente exposición a rayos UVA o UVB, procedentes de una lámpara artificial o de la luz solar (Lázaro, 2006) (Fig. 2.8).

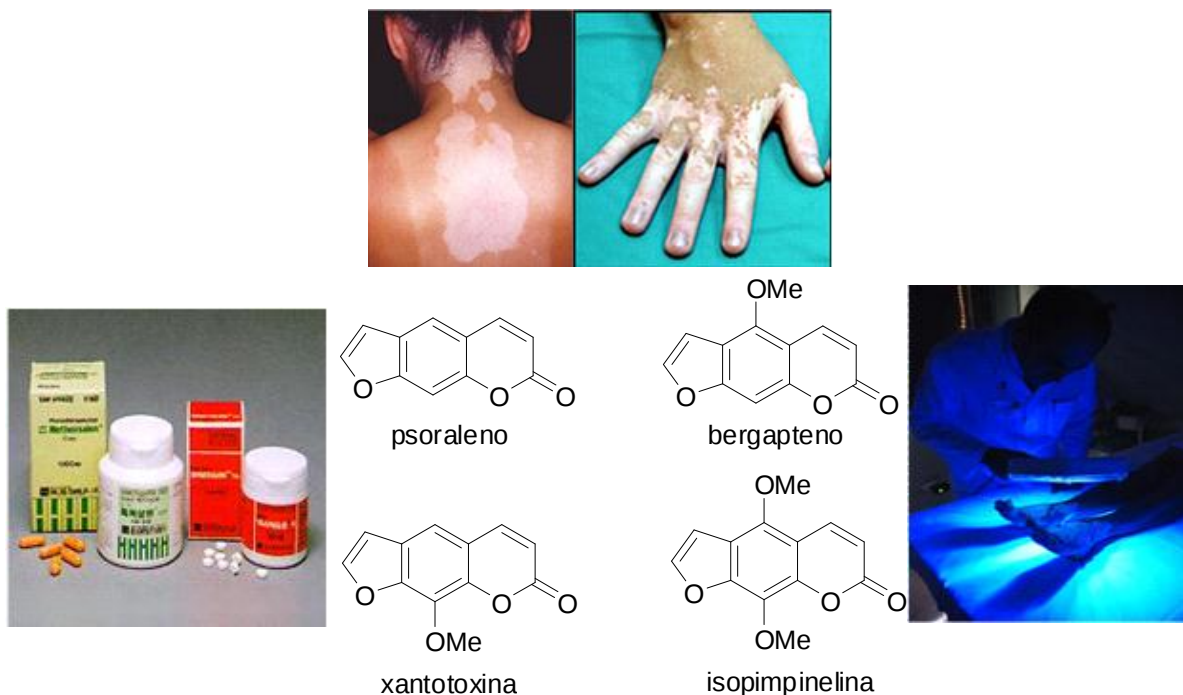


Figura 2.8. Tratamiento para vitíligo.

También se han realizado estudios que muestran la actividad de detención de crecimiento y apoptosis de bergapteno sobre el cáncer de mama, independientemente de su actividad fotosensibilizadora (Panno, 2009).

3. OBJETIVO

El objetivo del siguiente trabajo es realizar el estudio químico de *Conium maculatum* L., que crece en el estado de Hidalgo. Basado en el aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de la raíz, mediante técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos, con el propósito de favorecer al conocimiento de sustancias con actividad biológica que pudieran ser útiles en el tratamiento de enfermedades de la piel.

4. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional en México es una elección importante para el tratamiento de diversas enfermedades de la piel, desde conseguir la suavidad hasta aliviar el dolor producido por el cáncer.

El estudio químico de los productos naturales tiene su relevancia en el conocimiento de la composición química de las plantas y la obtención de principios activos promisorios para el tratamiento de enfermedades. Estos metabolitos encontrados despiertan el interés de la investigación en cuanto a su estructura ya que van desde muy complejas hasta simples y forman patrones de síntesis de compuestos biológicamente activos.

En nuestro grupo de trabajo se lleva a cabo un proyecto de investigación dirigido al estudio químico de especies medicinales del Estado de Hidalgo, contribuyendo al aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria y anticancerosa.

En esta relación se presenta el estudio químico de *Conium maculatum* L., una especie tóxica, con un crecimiento abundante en terrenos nitrificados y que es utilizada como analgésico, anestésico y sedante. Su composición química sólo ha sido investigada en la especie que crece en países de Europa, Asia y Medio Oriente.

Por lo que es importante conocer si la especie que crece en México, en zonas geográficas y climáticas diferentes, produce los mismos o distintos metabolitos. Adicionalmente, hasta donde se conoce, no han sido estudiadas las raíces de la especie.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Colecta e identificación de la especie

Los ejemplares de *Conium maculatum* (Fig. 5.1) se colectaron en los municipios de Tulancingo e Ixmiquilpan en el estado de Hidalgo, en Junio de 2008 y en Enero de 2011, respectivamente. Un espécimen de la planta se envió al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, donde el M. en C. Manuel González Ledesma identificó la especie como *Conium maculatum* L. (No. de depósito JM Torres-Valencia 137).



Figura 5.1. Imagen de *Conium maculatum* L.

5.2. Obtención de la sacarosa

Las raíces de la especie colectada en Tulancingo se extrajeron con MeOH, y este extracto se fraccionó con AcOEt, resultando una parte soluble (PS) y otra insoluble (PI). Cuando se adicionó MeOH a la PI se obtuvo un precipitado amarillo, que se analizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, evidenciando la presencia de la sacarosa (Fig. 5.2), la cual presentó p.f. 182–186 °C y $[\alpha]_D^{20} +59.3$ (c 1.35, H₂O). La comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con una muestra auténtica permitió corroborar la estructura de este compuesto.

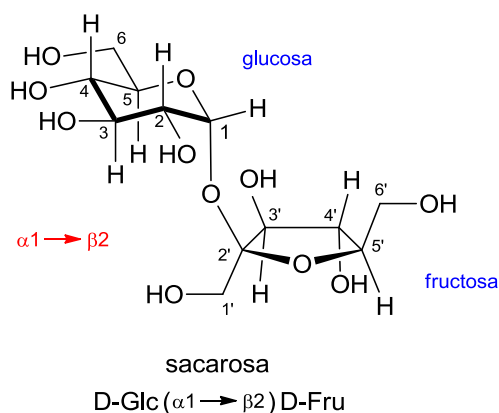


Figura 5.2. Estructura de la sacarosa.

En su espectro de RMN de ^1H en D_2O (Fig. 5.3) se observó en 5.23 ppm una señal doble con una constante de acoplamiento de 3.8 Hz que integró para un protón, correspondiente al hidrógeno anomérico de la posición 1 de la glucosa. En 4.04 y 3.88 ppm se apreciaron las señales de los protones 3' (d, $J = 8.8$ Hz) y 4' (t, 8.8 Hz) del residuo de fructosa, respectivamente, mientras que los hidrógenos 3, 2 y 4 de la parte de la glucosa se observaron en 3.60 (t, $J = 9.2$ Hz), 3.39 (dd, $J = 9.2$ y 3.8 Hz) y 3.30 (t, $J = 9.2$ Hz) ppm, respectivamente. En la tabla 5.1 se muestran los datos de protón completos, para lo cual se hizo uso del experimento COSY (Fig. 5.5) en donde se apreciaron las correlaciones esperadas. También se comparó con los datos de la literatura (Base de datos de RMN, 2011).

En el espectro de ^{13}C (Fig. 5.4) se observaron las 12 señales esperadas, entre ellas la de 103.55 y 97.07 ppm características de carbonos acetálicos que se asignaron a C-2' (fructosa) y C-1 (glucosa). El resto de las señales, todas ellas típicas de carbonos base se oxígeno, se asignaron por comparación con una muestra auténtica, así como con datos de la literatura (Gregori-Valdez, 2008) y sus datos se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz) en D_2O de la sacarosa.

Posición	Protón	Carbono
	δ en ppm (m, J en Hz)	δ en ppm
1	5.23 (d, 3.8)	92.07
2	3.39 (dd, 9.2, 3.8)	70.92
3	3.60 (t, 9.2)	72.27
4	3.30 (t, 9.3)	69.05
5	3.66 (m)	72.37
6	3.64 (m)	59.94
1'	3.50 (s)	61.12
2'	—	103.55
3'	4.04 (d, 8.8)	76.23
4'	3.89 (t, 8.8)	73.85
5'	3.73 (m)	81.20
6'	3.65 (m)	62.31

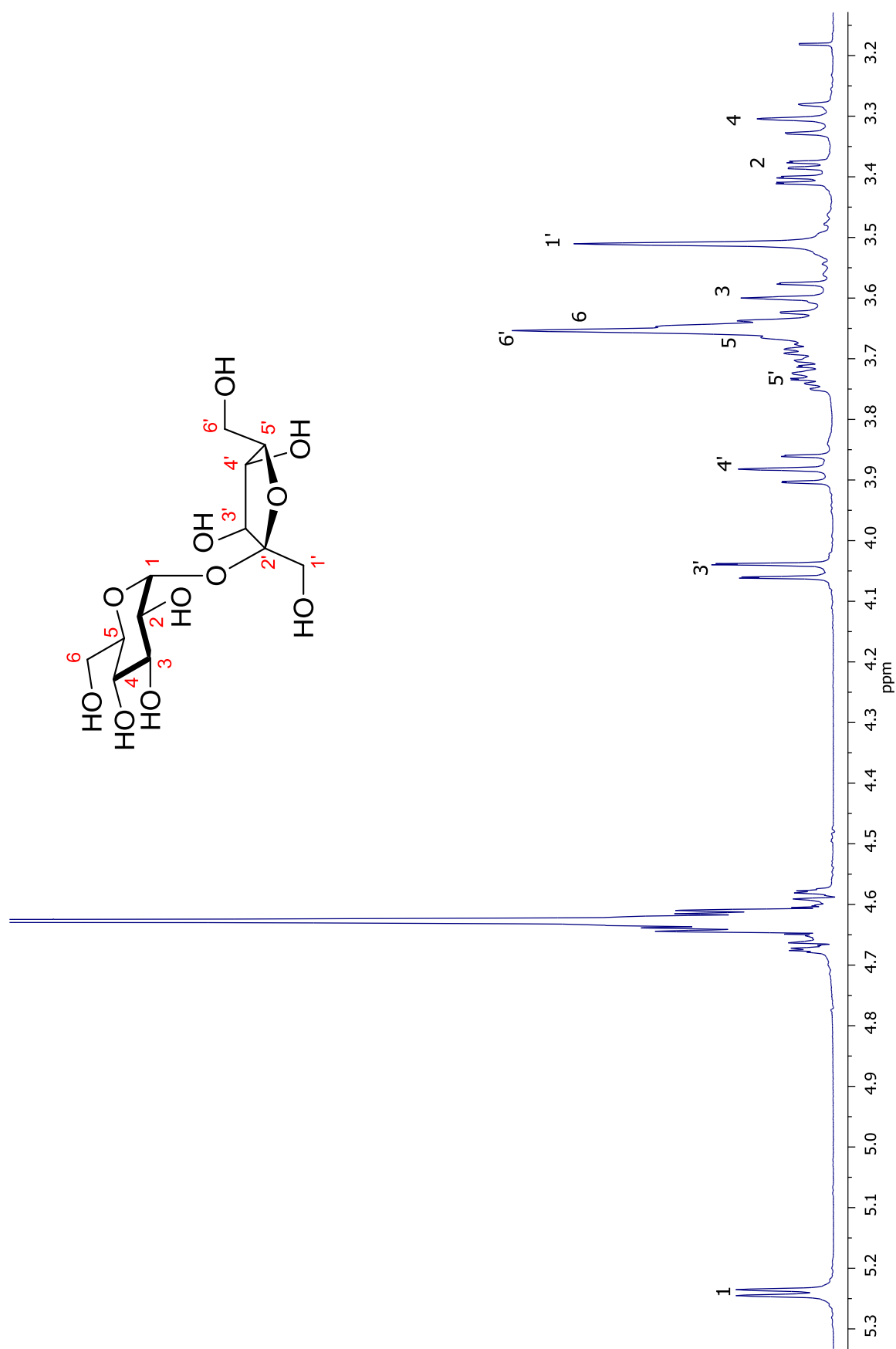


Figura 5.3. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en D_2O de la sacarosa.

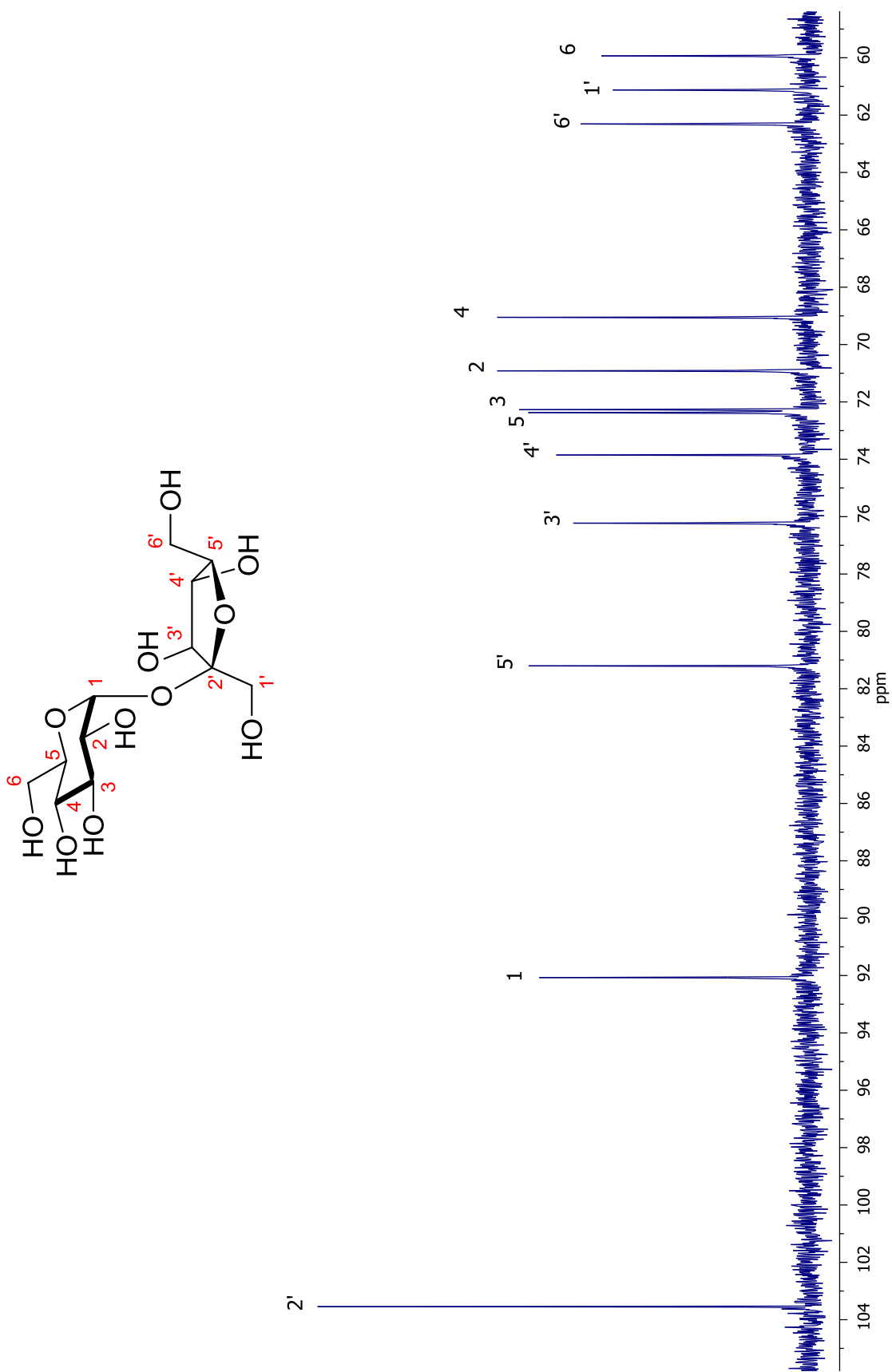


Figura 5.4. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) en D_2O de la sacarosa.

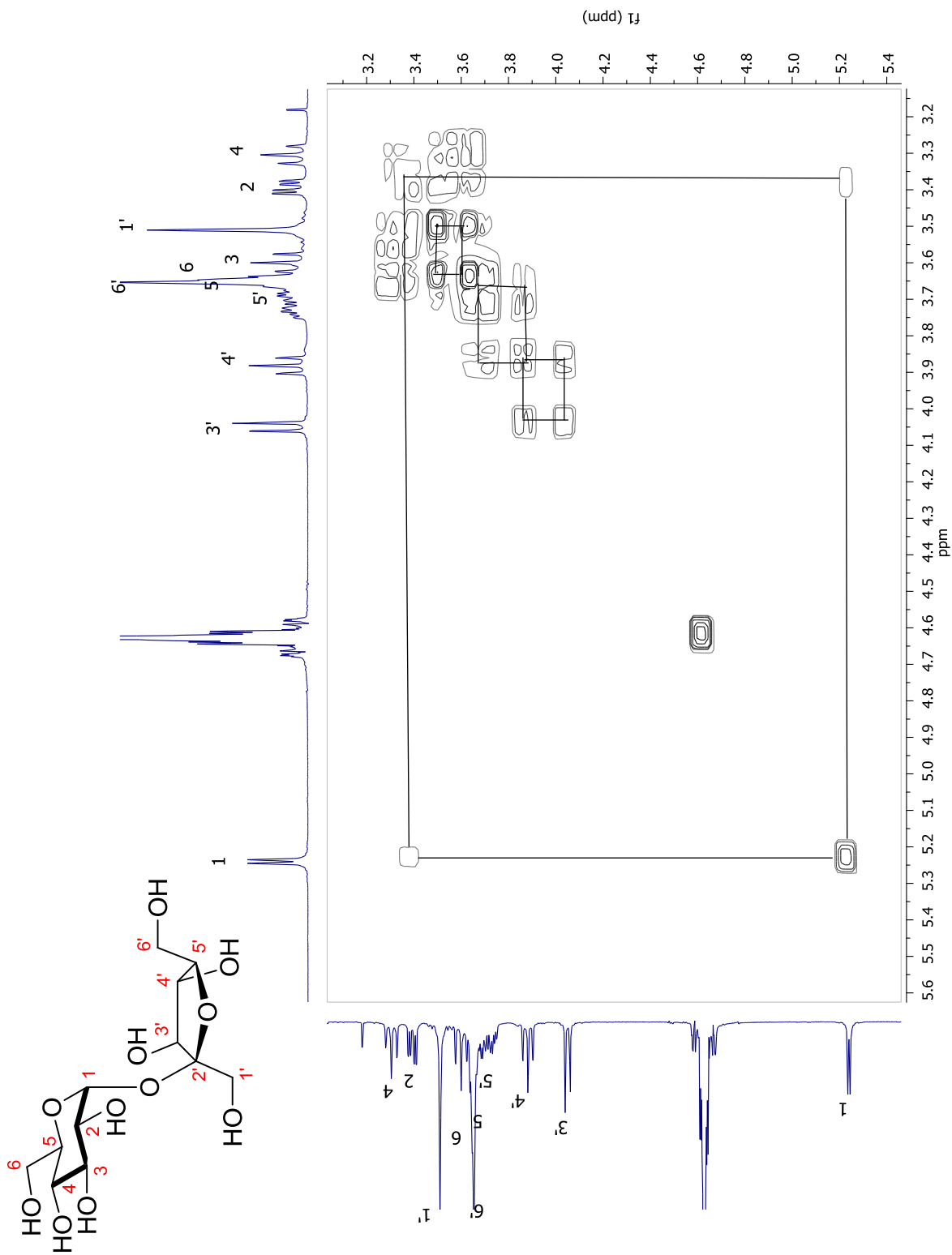


Figura 5.5. Espectro COSY en D₂O (400 MHz) de la sacarosa.

5.3. OBTENCIÓN DE β -SITOSTEROL Y ESTIGMASTEROL

La raíz de la especie colectada en Ixmiquilpan se sometió a maceración con MeOH, se filtró y se concentró para obtener un residuo viscoso, el cual se extrajo con AcOEt. El producto de la extracción se sometió a separación mediante cromatografía en columna, eluyendo con mezclas de hexano-AcOEt. Se colectaron seis fracciones, cada una que se etiquetaron como A, B, C, D, E y F, las cuales fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (CCF) y RMN de ^1H .

Las fracciones A y B, se juntaron y purificaron mediante CCF utilizando CHCl_3 -AcOEt, obteniendo un aceite amarillo. Al comparar sus datos espectroscópicos con una muestra auténtica, se llegó a la conclusión de que se trataba de una mezcla de los esteroides β -sitosterol y estigmasterol (Fig. 5.6).

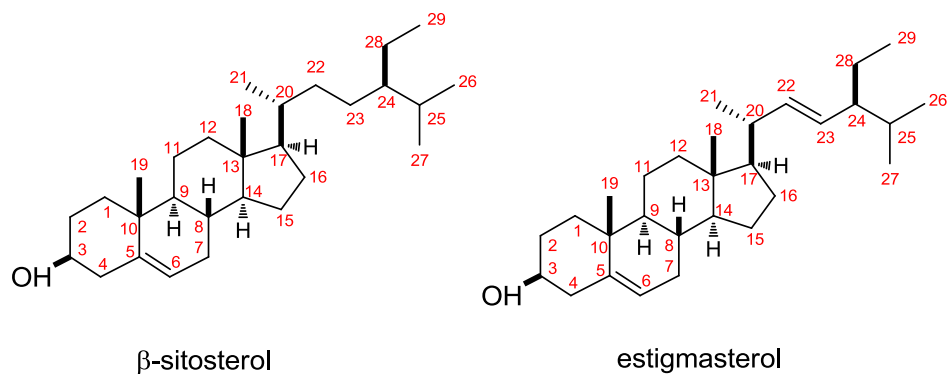


Figura 5.6. Estructura del β -sitosterol y stigmasterol.

El espectro de RMN de protón (Fig. 5.7) mostró, entre sus señales más características, la señal de protón vinílico 6, en 5.39 ppm, asimismo, en 5.05 y 5.20 ppm se observaron los protones del doble enlace en C-22 y C-23 propios del stigmasterol.

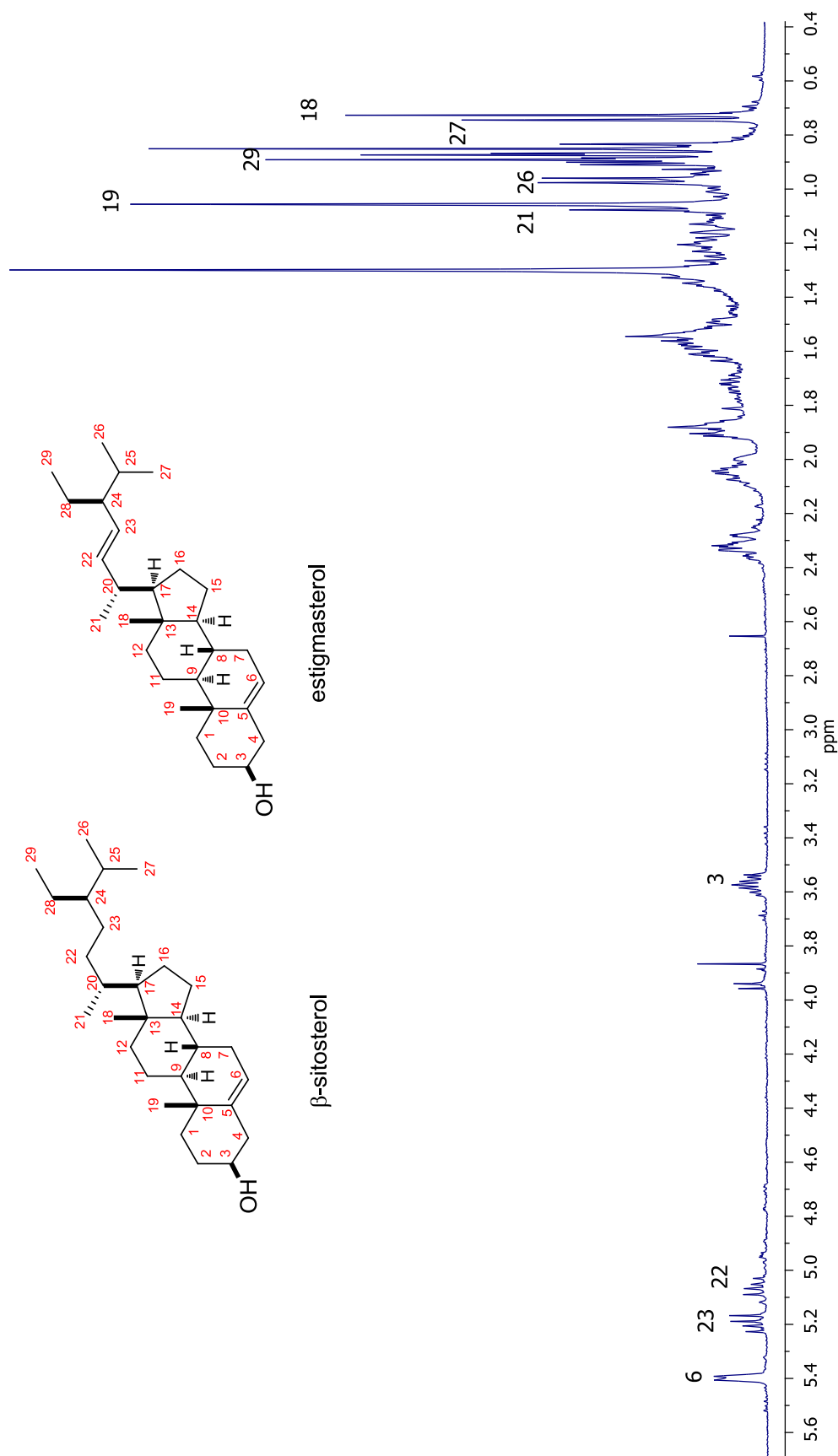


Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 de la mezcla de β -sitosterol y stigmasterol.

5.4. OBTENCIÓN DE FURANOCUMARINAS

De la fracción D (cromatografía del extracto hexánico de las raíces de la especie colectada en Ixmiquilpan), se obtuvo un sólido amarillo, cuyo análisis por RMN de ^1H y de ^{13}C , evidenció que se trataba de una mezcla de 4 furanocumarinas lineales, las cuales se conocen generalmente como psoralenos (Fig. 5.8). Los intentos por separar esta mezcla mediante cromatografía en columna y capa fina no tuvieron éxito, en el mejor de los casos, se obtuvieron trazas del psoraleno.

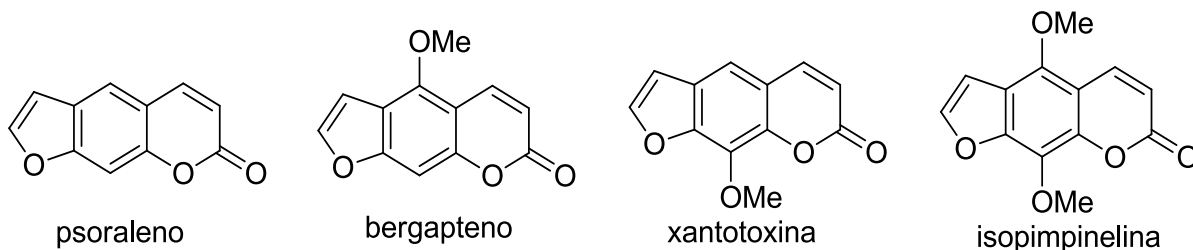


Figura 5.8. Estructura de las furanocumarinas (psoralenos) aisladas de la raíz de *C. maculatum*.

La comparación con datos descritos (Nitao, 2003; Intekhab, 2008; Hongwei, 2010), nos permitió identificar las señales correspondientes de cada sustancia en el espectro de RMN de ^1H (Fig. 5.9–5.13) y de ^{13}C (Fig. 5.14), y llegar a la conclusión de que la furanocumarina más abundante es la xantotoxina. Para esta cumarina, en el espectro de ^1H (Fig. 5.11) las señales de los hidrógenos 3 y 4 se observaron

formando un sistema AX ($J = 9.6$ Hz) en 6.37 y 7.76 ppm, respectivamente, la señal del protón aromático 5 se observó en 7.35 ppm como una señal simple ancha, las señales de los hidrógenos 2' y 3' del anillo de furano presentaron un desplazamiento de 7.69 (d, $J = 2.2$ Hz) y 6.82 (d, $J = 2.2$ Hz) ppm, correspondientemente, mientras la señal del grupo metoxilo se observó en 4.30 ppm. En la tabla 5.2 se describen los datos completos de RMN de ^1H de las 4 furanocumarinas, para lo cual se hizo una comparación con los datos de la literatura (Nitao, 2003; Intekhab, 2008; Hongwei, 2010). La integración de sus correspondientes señales en el espectro de protón, por ejemplo las respectivas a H-3, nos permitió determinar sus porcentajes relativos, los cuales fueron los siguientes: psoraleno (19.2%), bergapteno (15.4%), xantotoxina (42.3%) e isopimpinellina (23.1%).

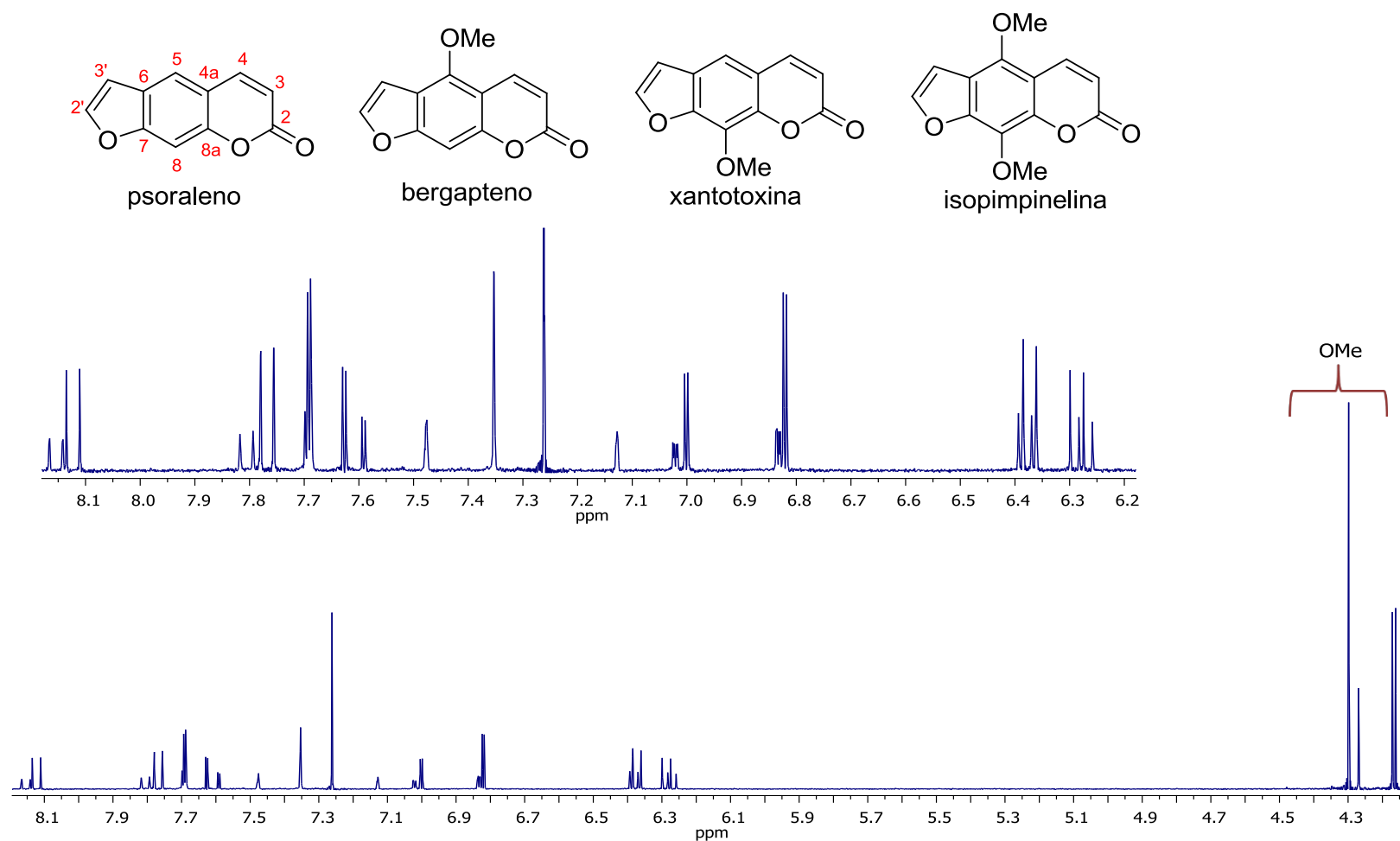


Figura 5.9. Espectro de RMN ¹H (400 MHz) en CDCl₃ de la mezcla de furanocumarinas.

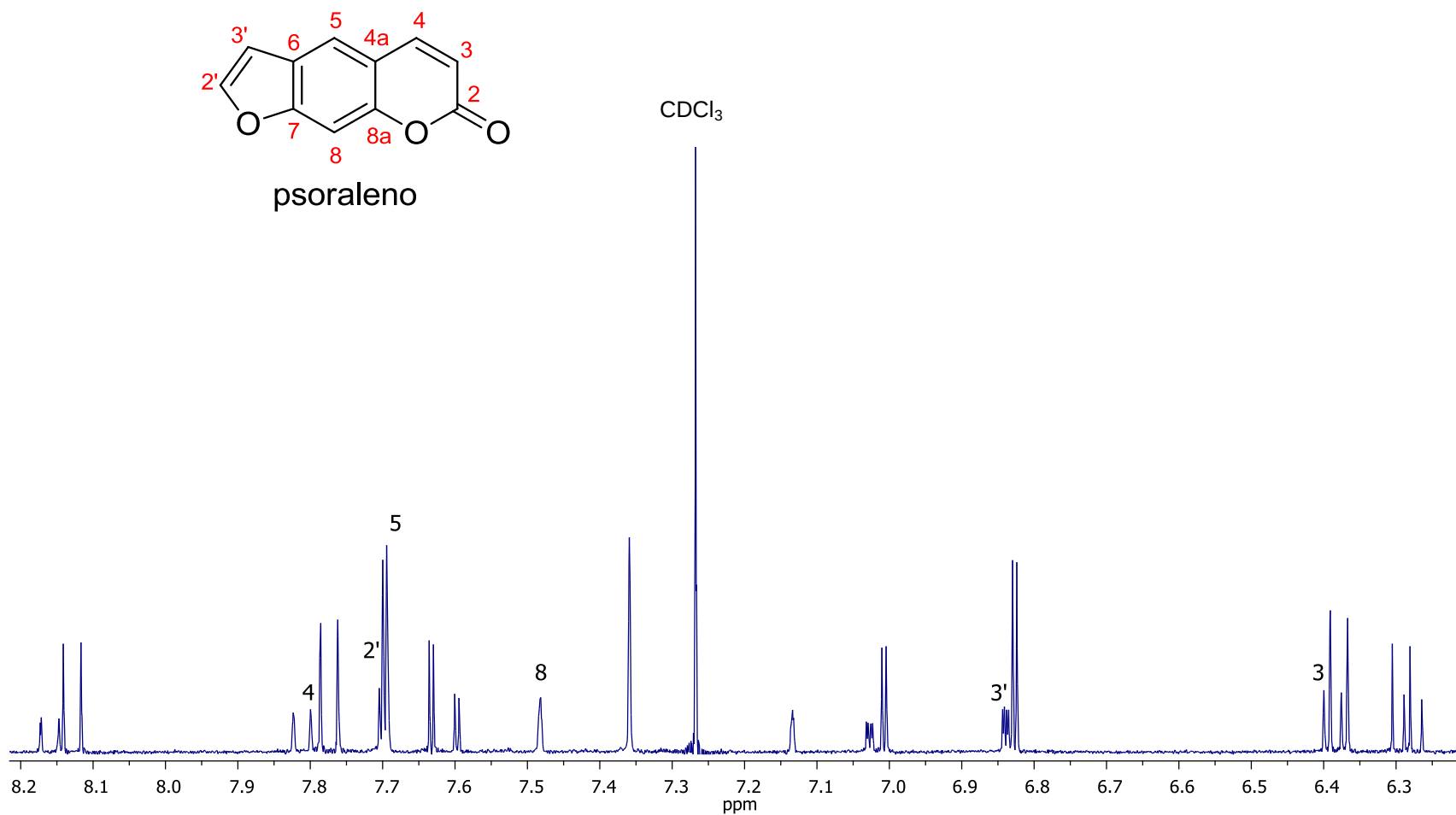


Figura 5.10. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 . Asignación con respecto a psoraleno.

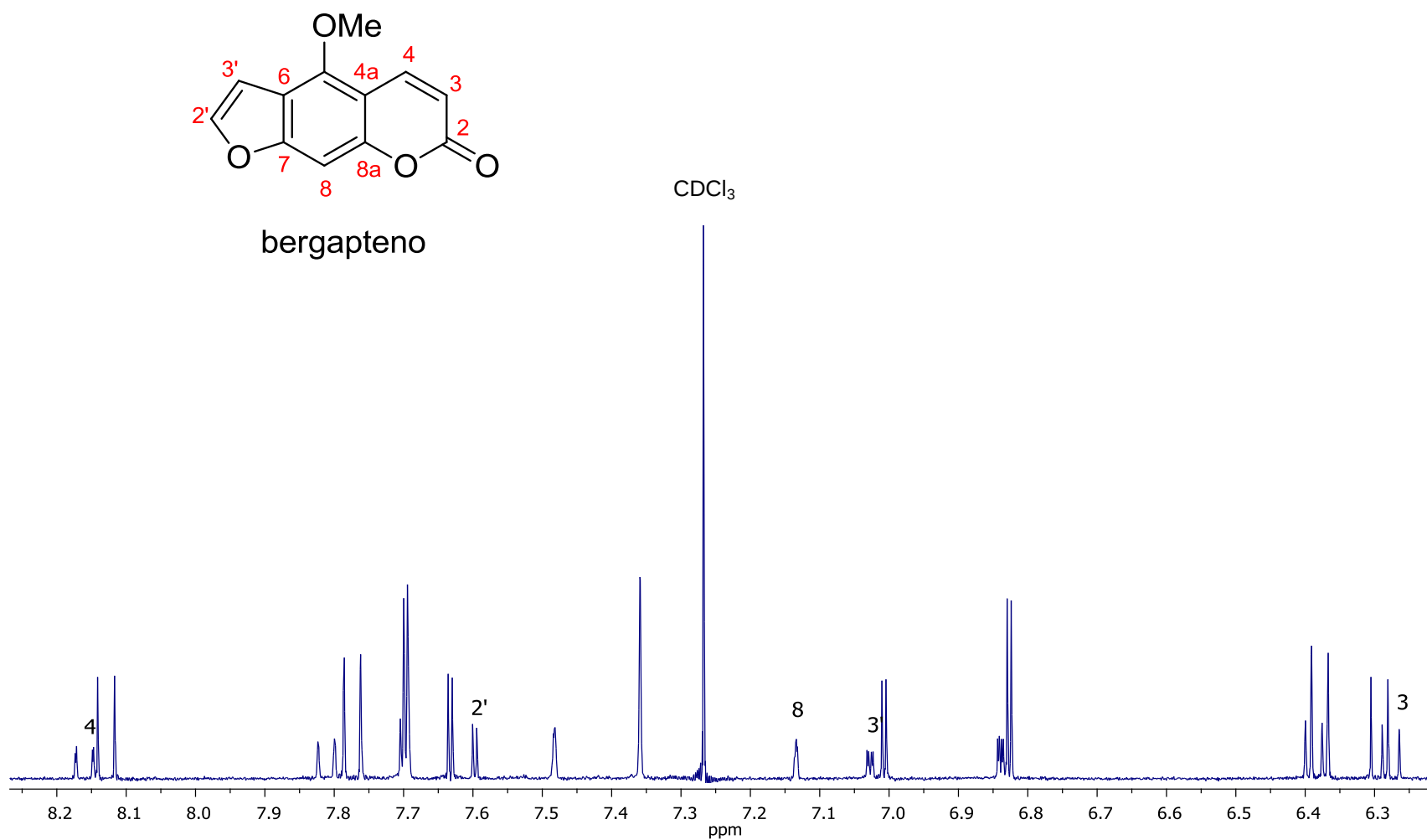


Figura 5.11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 . Asignación de las señales con respecto a bergapteno.

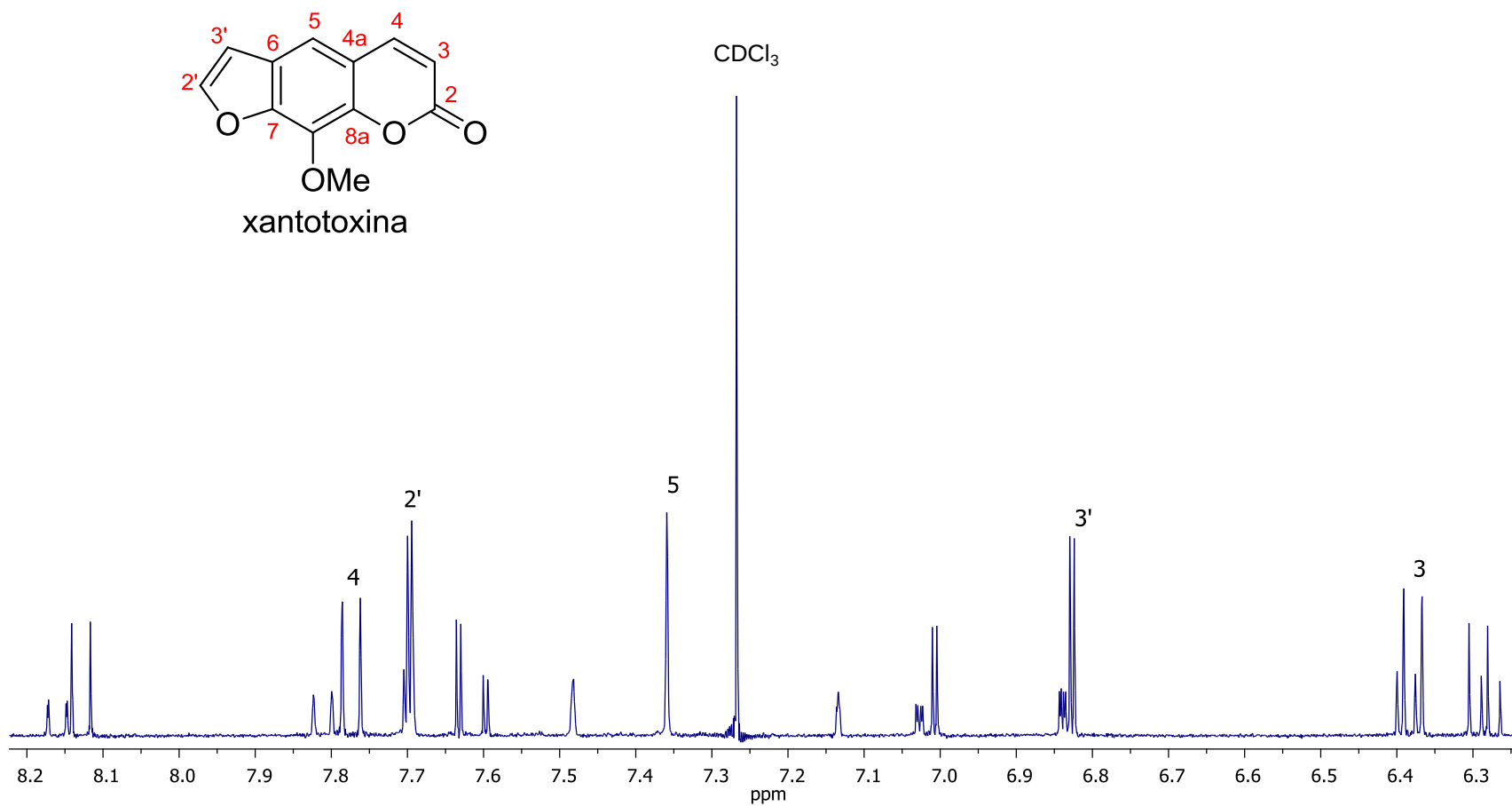


Figura 5.12. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 . Asignación de señales con respecto a xantotoxina.

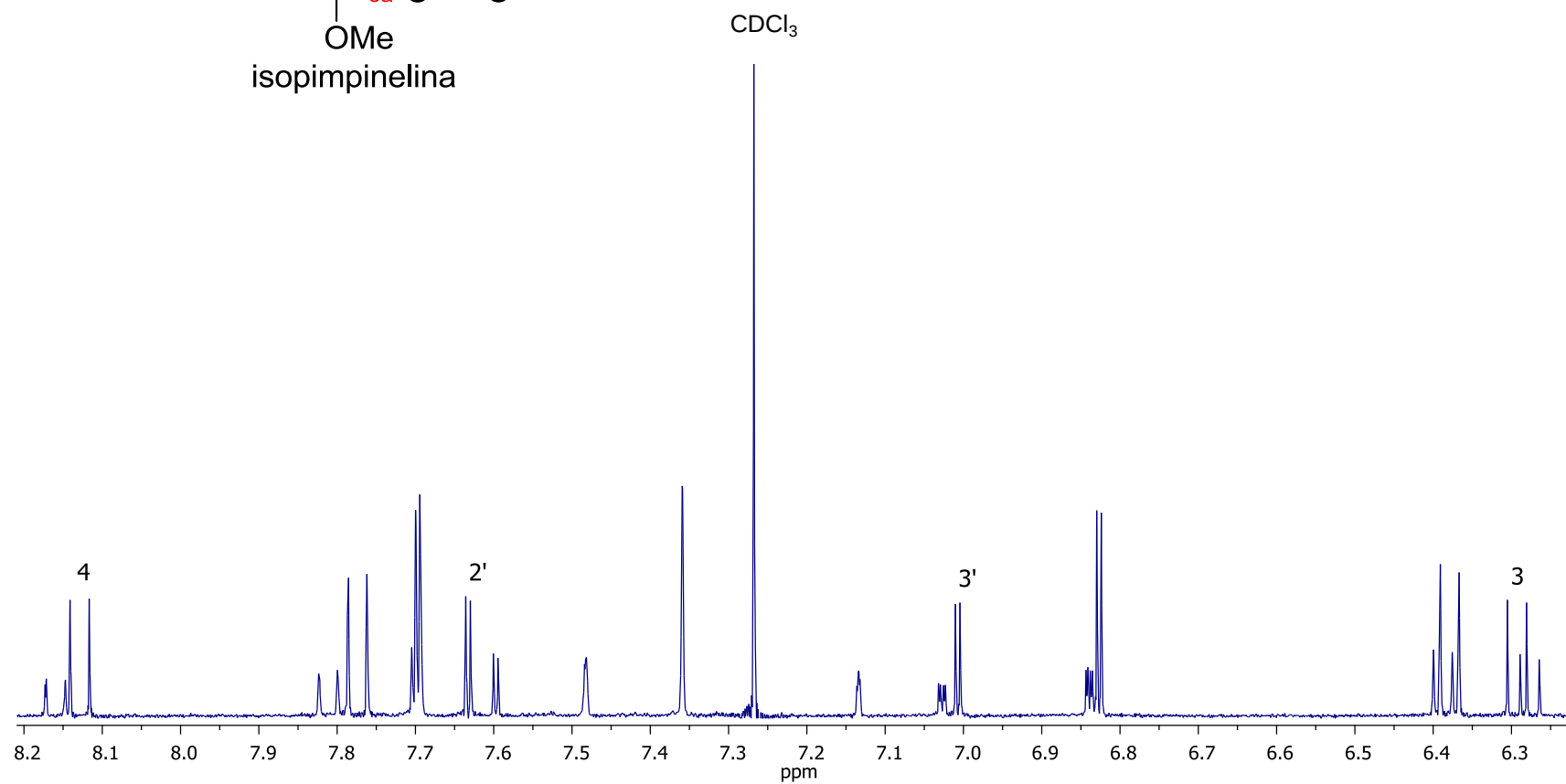
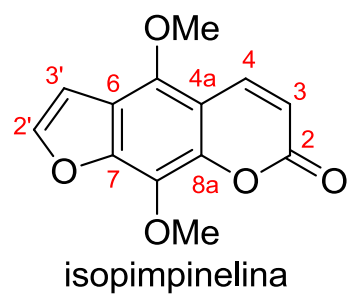


Figura 5.13. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) en CDCl_3 . Asignación de señales con respecto a isopimpinellina.

Tabla 5.2. Datos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de las furanocumarinas aisladas de *C. maculatum*.

Desplazamiento químico (δ) en ppm (m, <i>J</i> en Hz)				
Protón	psoraleno	bergapteno	xantotoxina	isopimpinelinea
3	6.38 (d, 9.6)	6.27 (d, 9.8)	6.37 (d, 9.6)	6.28 (d, 9.8)
4	7.80 (dd, 9.6, 0.5)	8.15 (dd, 9.8, 0.6)	7.76 (d, 9.6)	8.12 (d, 9.8)
5	7.70 (s)	–	7.35 (s)	–
8	7.13 (sa)	7.48 (sa)	–	–
2'	7.70 (d, 2.4)	7.59 (d, 2.4)	7.69 (d, 2.2)	7.64 (d, 2.3)
3'	7.02 (dd, 2.4, 1.0)	6.83 (dd, 2.4, 1.0)	6.82 (d, 2.2)	7.01 (d, 2.3)
OMe	–	4.27 (s)	4.30 (s)	4.17 (s)

En la figura 5.14 se muestra el espectro de ^{13}C de esta mezcla de psoralenos, en la cual están asignadas las señales correspondientes a la furanocumarina más abundante, la xantotoxina. En la tabla 5.3 se muestran los desplazamientos químicos para esta sustancia y los otros tres compuestos, para lo cual se hizo uso de los datos de la literatura (Nitao, 2003; Intekhab, 2008; Hongwei, 2010).

Tabla 5.3. Datos de RMN de ^{13}C [^1H] (100 MHz, CDCl_3) experimentales y de la literatura, de las furanocumarinas aisladas de *C. maculatum*.

Desplazamiento químico (δ) en ppm								
Carbono	psoraleno		bergapteno		xantotoxina		isopimpinellina	
	Lit.	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	Exp.
2	161.0	161.0	161.2	160.9	160.4	160.3	160.4	160.3
3	114.6	115.3	112.5	112.5	114.7	114.6	112.9	112.8
4	139.2	139.2	139.2	139.3	144.5	144.2	139.3	139.3
4a	112.5	115.3	106.4	107.6	116.5	116.5	107.1	106.3
5	144.0	142.8	149.5	149.9	112.9	112.8	144.3	144.0
6	106.4	105.1	112.7	112.7	126.1	125.9	114.8	114.6
7	156.4	156.3	158.3	156.2	147.7	147.65	150.0	150.2
8	99.8	99.8	93.8	93.8	132.8	132.8	128.3	128.3
8a	152.0	152.0	152.7	151.9	143	142.8	143.7	144.1
2'	145.0	145.1	144.7	144.7	146.6	146.6	145.1	145.0
3'	105.0	105.1	105.2	105.1	107.2	106.7	105.0	106.3
OMe	–	–	60.1	59.9	61.3	61.3	60.8; 61.7	60.8; 61.7

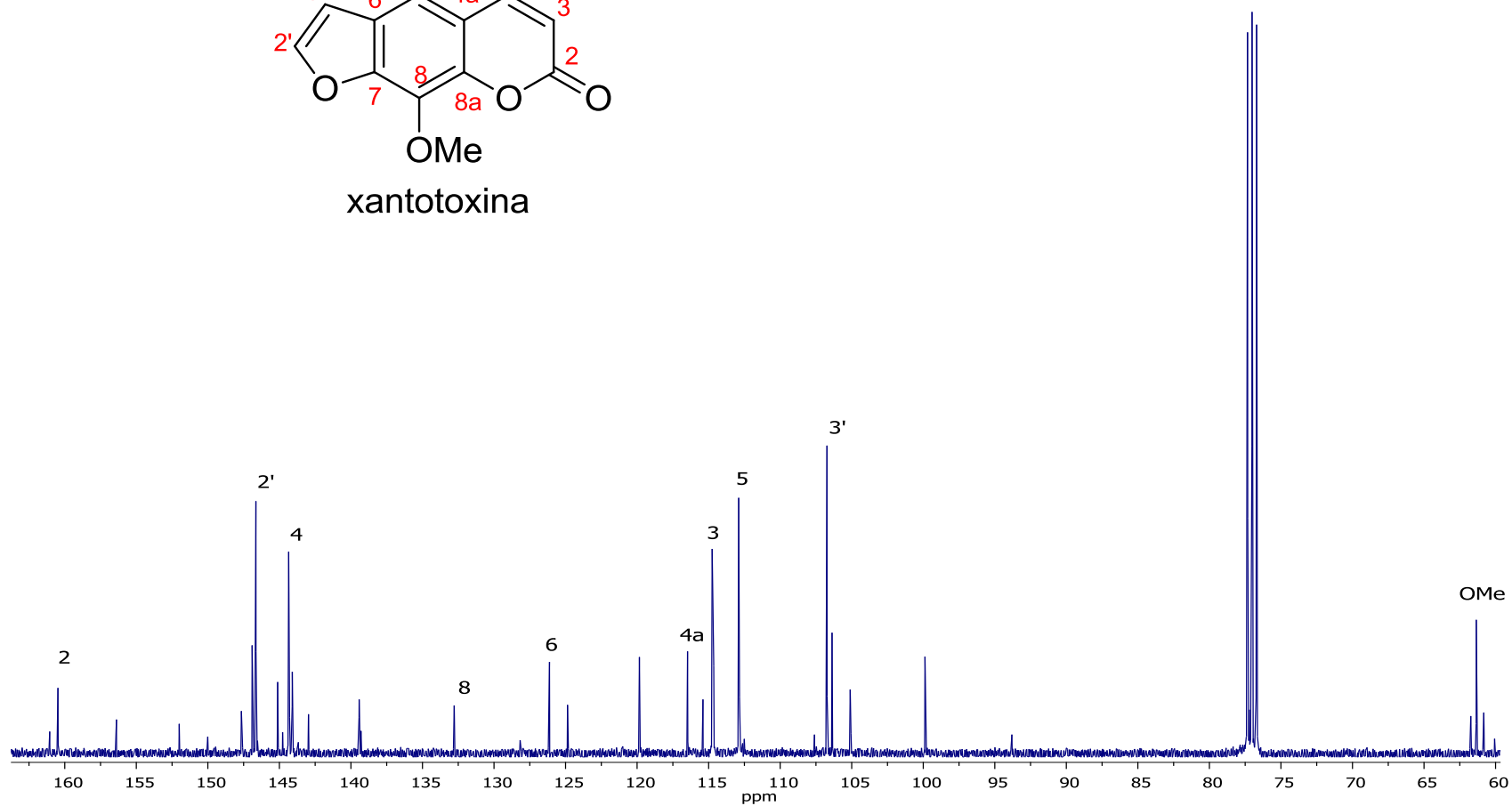
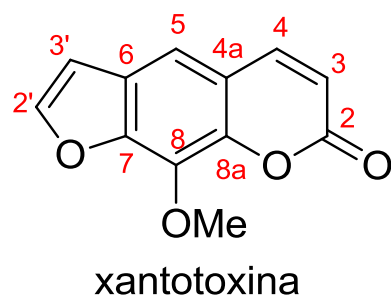


Figura 5.14. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}[^1\text{H}]$ (100 MHz) en CDCl_3 . Asignación de señales con respecto al compuesto mayoritario, xantotoxina.

5.4.1. Análisis por espectrometría de gases-masa (GC-MS) de la mezcla de psoralenos

La fracción D (mezcla de psoralenos) se analizó por espectrometría de gases-masa (Fig. 5.15 – 5.19) cuyo cromatograma (Fig. 5.15) mostró cuatro picos con un tiempo de retención de 6.157, 6.963, 7.122 y 8.016 minutos. La fragmentación de cada uno de los picos mostraron los iones moleculares de 186 ($C_{11}H_6O_3$) correspondiente a psoraleno (Fig. 5.16), 216 ($C_{12}H_8O_4$) del compuesto mayoritario, xantotoxina (Fig. 5.17), 216 ($C_{12}H_8O_4$) para bergapteno (Fig. 5.18) y 246 ($C_{13}H_{10}O_5$) de isopimpinellina (Fig. 5.19). El bergapteno y la xantotoxina tienen el mismo peso molecular (216 g/mol), pudiendo presentar confusión sobre la identidad de cada compuesto. Pero, como se mencionó ya, sus datos de RMN permitieron saber cuál es el que está en mayor porcentaje relativo, por lo que también se pudo deducir en el cromatograma que el compuesto con el tiempo de retención de 6.963 minutos (mayor porcentaje) corresponde a la xantotoxina.

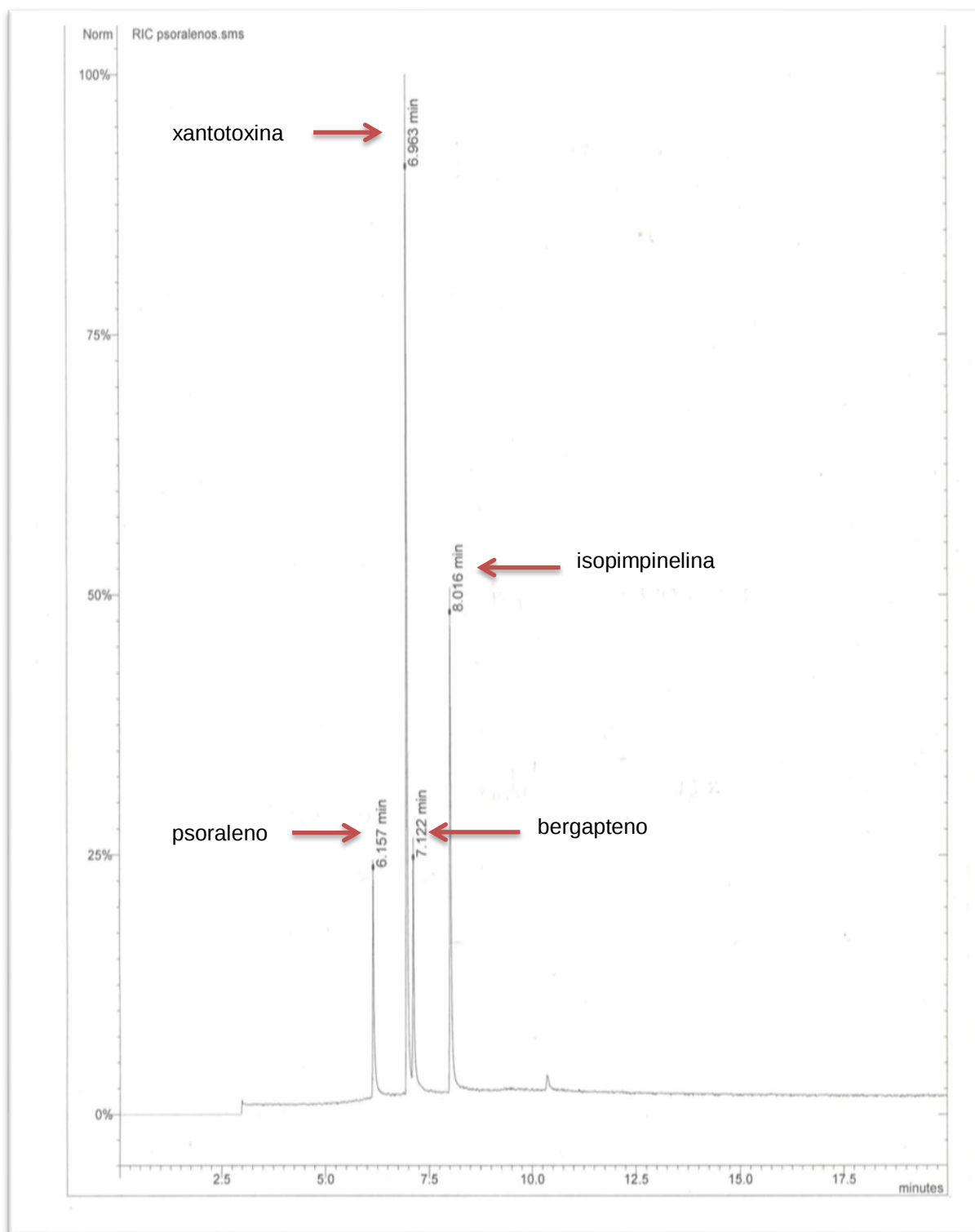


Figura 5.15.. Cromatograma de la mezcla de psoralenos.

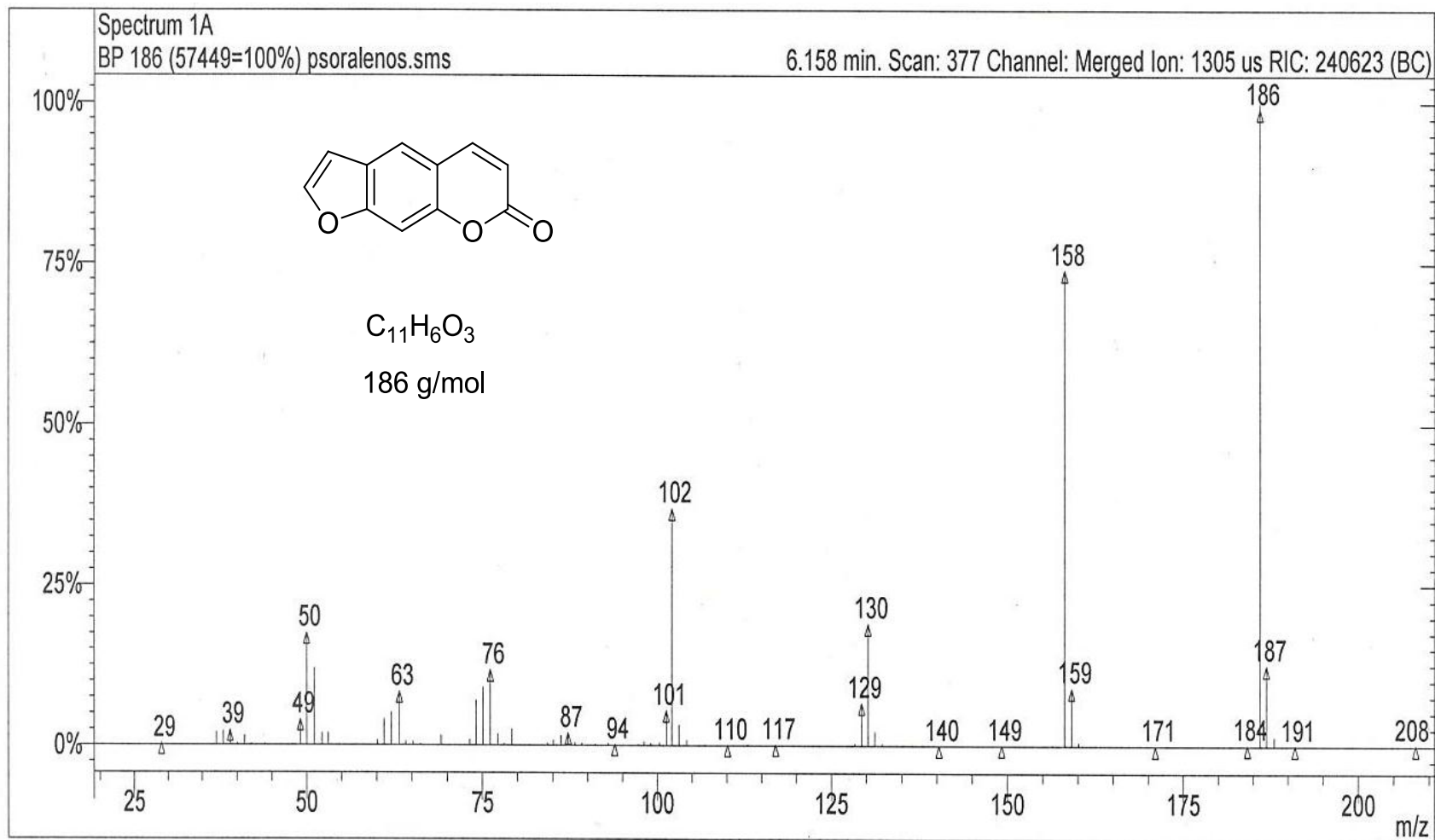


Figura 5.16. Espectro de masa del psoraleno.

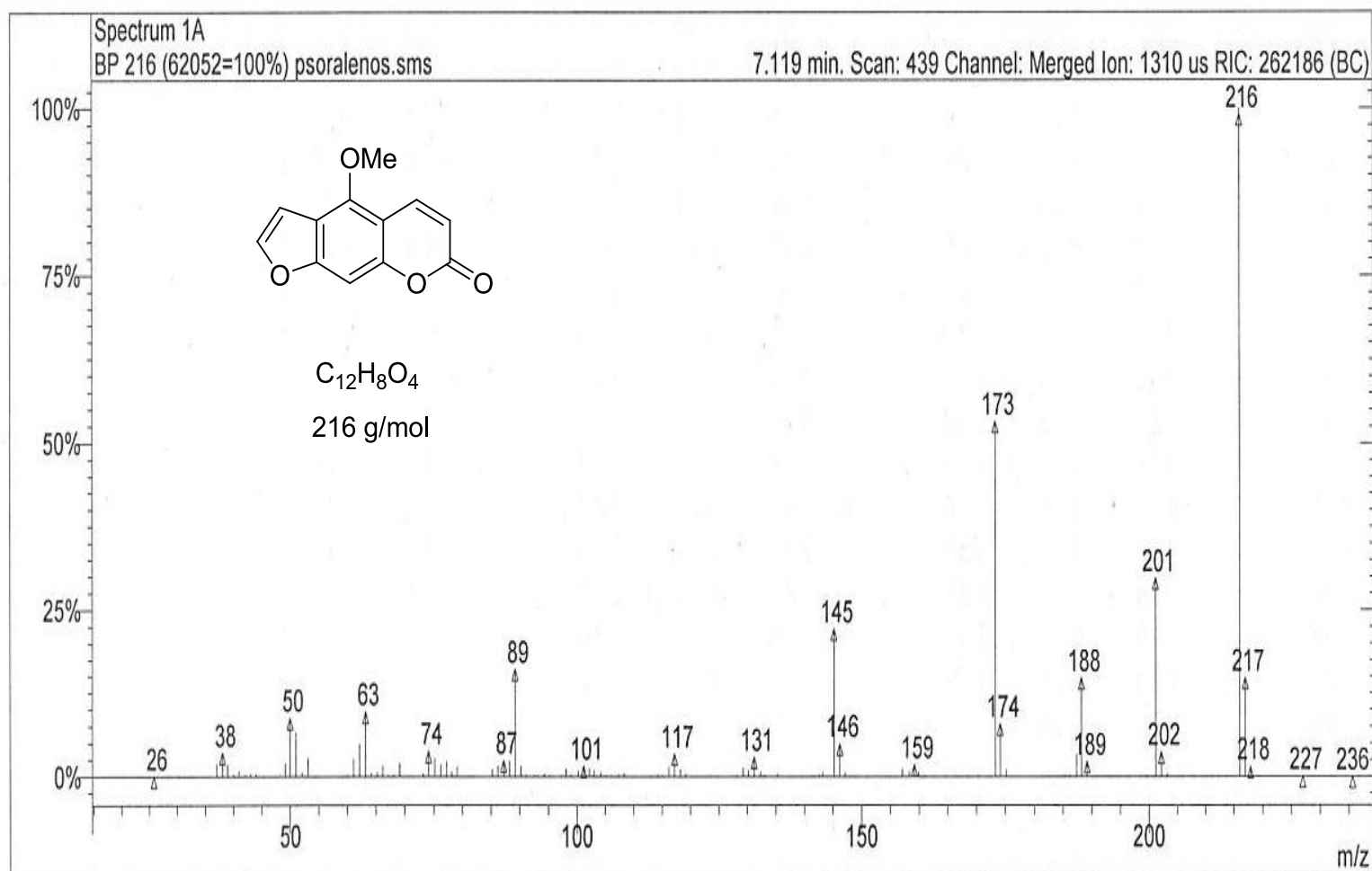


Figura 5.17. Espectro de masa de bergapteno

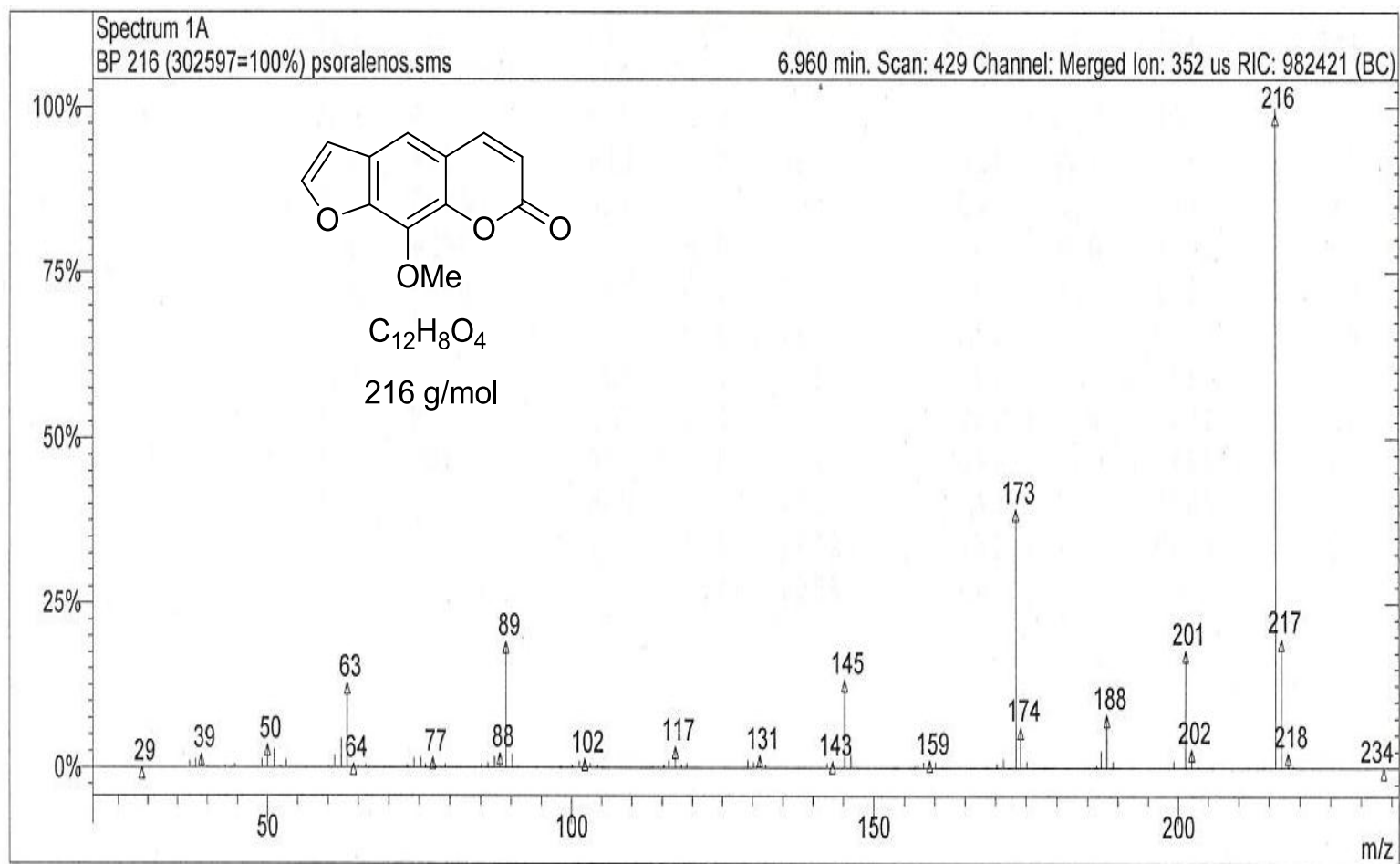


Figura 5.18. Espectro de masa de la xantotoxina.

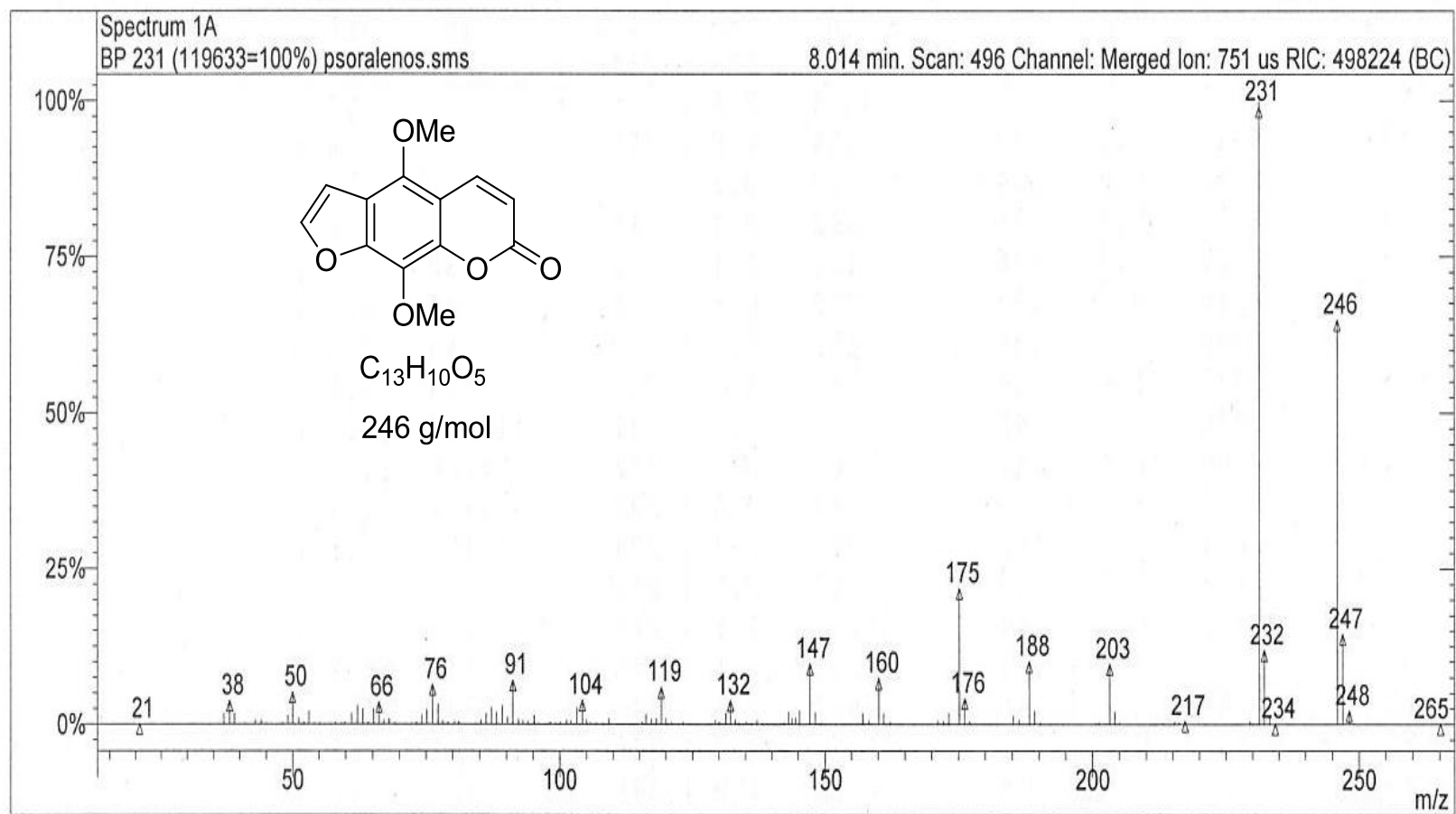
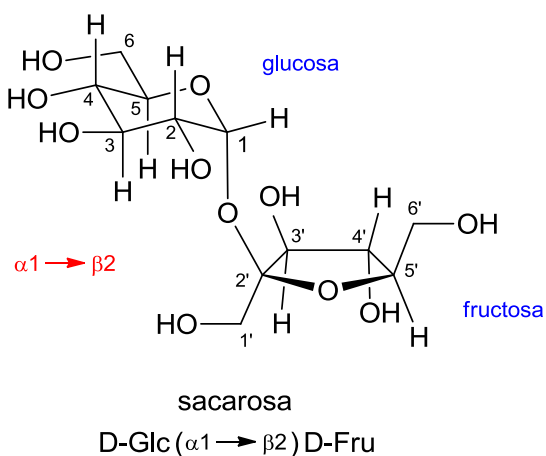


Figura 5.19. Espectro de masa de la isopimpinellina.

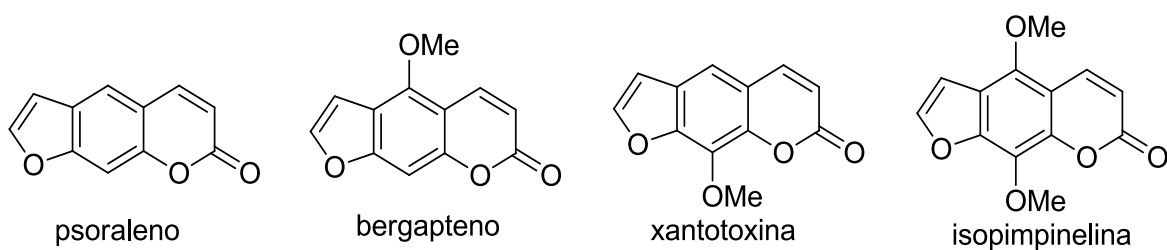
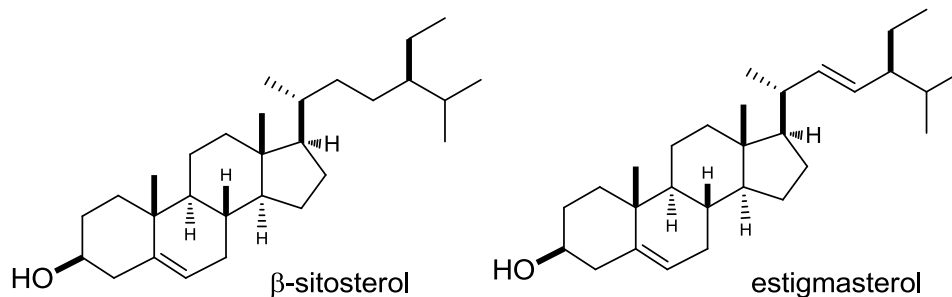
6. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la colecta, identificación y estudio químico de las raíces de *Conium maculatum* L., la cual es una especie considerada como tóxica, atribuido a la producción de alcaloides de piperidina. Su reproducción es abundante en municipios como Actopan, Ixmiquilpan, Mineral del Monte y Tulancingo. La composición química de la especie mexicana no había sido estudiada.

El extracto metanólico de las raíces de la especie colectada en Tulancingo, condujo a la obtención de sacarosa. La caracterización del compuesto se llevó a cabo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, especialmente por RMN de ^1H y ^{13}C en 1D y 2D, así como por comparación de datos descritos.



La separación cromatográfica del extracto de acetato de etilo de las raíces de la especie colectada en Ixmiquilpan, condujo a la obtención de los compuestos β -sitosterol y estigmasterol, así como el aislamiento de una mezcla de furanocumarinas lineales denominadas como psoralenos, siendo la xantotoxina, el compuesto mayoritario (42.3%). La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante datos de RMN de ^1H y ^{13}C , GS-MS y comparación con datos descritos.



Con este estudio se concluye que la especie mexicana contiene en las raíces las mismas furanocumarinas encontradas en la parte aérea de las especies europeas. Dado que, la especie europea y asiática no ha sido explorada en su composición química en las raíces, no se puede hacer una comparación de los metabolitos presentes en las mismas.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de los principales metabolitos presentes en las raíces de la especie mexicana de *Conium maculatum*, particularmente los psoralenos, que han sido empleados para enfermedades de la piel como el vitíligo y la psoriasis.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Generalidades

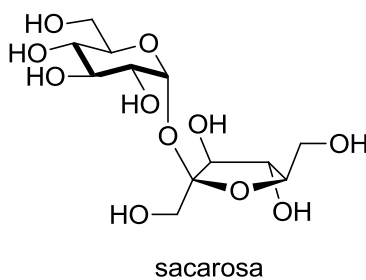
Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice 60, Merck, 0.04-0.063 mm (Aldrich, 230-400 mesh ASTM) en columnas de vidrio de 10, 5, 3.5, 2 y 1 cm de diámetro interno por 40 y 60 cm de largo. La separación mediante cromatografía en placa fina se realizó en cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio de 2 x 5 cm y 10 x 20 cm, usando como revelador sulfato cérico amoniacal. CG-MS: los espectros se determinaron en cromatógrafo de gases VARIAN modelo CP-3800 acoplado a un espectrómetro de masa VARIAN SATURNO 2000. Los espectros de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como el espectro COSY, se determinaron en un equipo VARIAN 400, usando como disolvente CDCl_3 y D_2O teniendo como referencia interna TMS.

7.2. Recolección e identificación de la especie

Conium maculatum L. se colectó en Junio de 2008 en Tulancingo, Hidalgo y en Enero de 2011 en Ixmiquilpan, Hidalgo, un ejemplar de la especie (JM Torres-Valencia 137) está depositado en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma, Hidalgo, donde el Prof. Manuel González Ledesma identificó el material vegetal.

7.3. Obtención de sacarosa

La planta se dejó secar a la sombra y se separó en parte aérea y raíz. Una parte de la raíz (320 g) de la especie colectada en Tulancingo se extrajo con MeOH (3.5 L) mediante maceración por 15 días, posteriormente se filtró y se concentró en el rotavapor. Al residuo (8.1 g) se le adicionó AcOEt (250 mL) con lo cual se obtuvo una parte soluble (PS) y otra insoluble (PI). Cuando se adicionó MeOH (250 mL) a la PI se obtuvo un precipitado amarillo (5 g) el cual se analizó por RMN de ^1H y ^{13}C , evidenciando la presencia de la sacarosa. p.f. 182–186 °C, $[\alpha]_D^{20} = + 59.3$ (c 1.35, H_2O), RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.1).

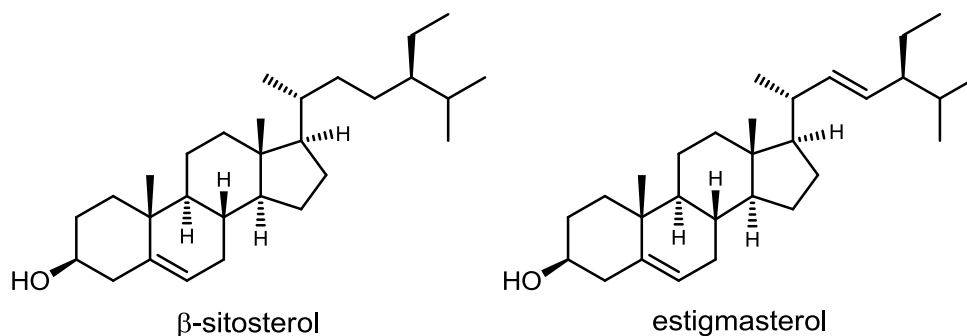


7.4. Separación del extracto de acetato de etilo de la raíz de *Conium maculatum*

La raíz (1 kg) de la especie que fue colectada en Ixmiquilpan se sometió a maceración con MeOH (4 L) durante 8 días, transcurrido el tiempo se filtró y concentró en rotavapor para obtener un residuo viscoso (20 g), el cual se extrajo con AcOEt (500 ml), nuevamente se filtró y se concentró. El producto (6.61g) se sometió a separación mediante cromatografía en columna, usando gel de sílice y como eluyentes mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 4:1, 7.3, 3:2, 1:1 y 2:3). Se colectaron eluatos de 20 mL para obtener un total de 60 fracciones, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa fina para su agrupación en fracciones gruesas, y fueron etiquetadas como **A–F**.

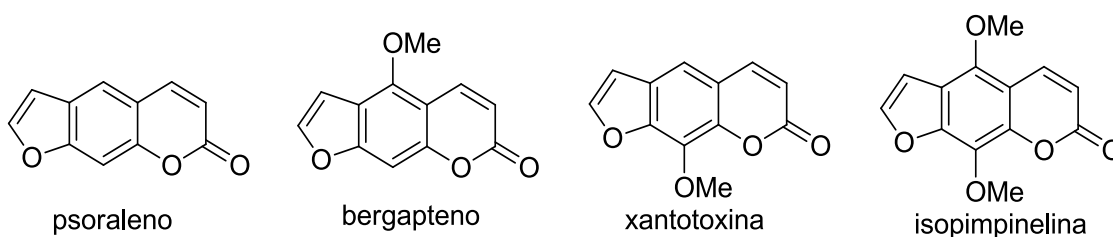
7.4.1. Obtención de β -sitosterol y estigmasterol

Las fracciones **A** y **B**, eluídas con hexano-AcOEt (9:1) y hexano-AcOEt (4:1) se juntaron y se le realizó análisis por CCF utilizando CHCl_3 -AcOEt (95:5) para obtener un aceite amarillo (24.7 mg). El análisis mediante sus datos espectroscópicos nos llevó a la conclusión de que se trataba de una mezcla de los compuestos β -sitosterol y estigmasterol. Su espectro de RMN de ^1H se muestra en la figura 5.7.



7.4.2. Obtención de furanocumarinas

De la fracción **D** eluida con hexano-ACOEt (3:2), se obtuvo un sólido amarillo (526 mg) cuyo análisis por CCF utilizando hexano-AcOEt-CHCl₃ (3:1.5:1) mostró un R_f 0.5. El análisis por RMN de ¹H y ¹³C (Tablas 5.2 Y 5.3), así como GS-MS (figuras 5.16–5.19), demostró la existencia de una mezcla de 4 furanocumarinas lineales conocidas como psoralenos: psoraleno, bergapteno, xantotoxina e isopimpinlina, en rendimientos relativos de 19.2, 15.4, 42.3 y 23.1%, respectivamente.



8. REFERENCIAS

- Arango G. (2010). Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido shikimico. Universidad de Antioquia. Medellin, Antioquia. Fecha de consulta: 6 de julio de 2011. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>
- Base de Datos de RMN (2011).
http://rmni.iqfr.csi.es/guide/tutorials/specdata/spectra/suc_cosy.html. Fecha de consulta: 4 de octubre de 2011.
- Beier R.C., Oertli E.H. (1983). Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry*. 22, 2595-2597.
- Carretero M. (2000). Compuestos fenólicos: Shikimatos (II). *Panorama Actual del Medicamento*. 24, 432-435.
- Chessi E. (1998). El mundo de las plantas peligrosas. Barcelona, España. Ed. Ultramar Editores S.A
- CONABIO. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad. <http://www.conabio.gob.mx> México. Fecha de consulta: 15 de Junio de 2011.
- Dewick P. M. (2009). Medicinal natural products a biosynthetic approach. United Kingdon. Wiley. Pp. 161-166.
- Foster S., Duke J. (2000). A field guide to medicinal plants and herbs. Eastern/central North America. USA. Peterson field guide. Pp. 67-68.

- Fylaktakidou K., Hadjipavlov-Litina D., Litinas K., Nicolaides D. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current Pharmaceutical Design*. 10, 3813-3833.
- Gambari R., Lampronti I., Bianchi N., Zuccato C., Viola G., Vedaldi D., Dall'Acqua F. (2007). Structure and biological activity of furanocoumarins. *Top Heterocycles Chemistry*. 9, 265-276.
- Gregorí V. B., Guerra M., Mieres G., Alva L., Brown A., Rangel-Vazquez N., Sosa M. (2008). Caracterización estructural de poliuretanos mediante espectroscopía FTIR y RMN (^1H y ^{13}C). *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 9, 377-380.
- Holm L.G. (1997) World weeds: natural histories and distribution. EUA. Wiley. Pp. 221-225.
- Hongwei Y., Bogaing L., Xiaoxhen C., Changsong L., Goulin Z. (2010). Chemical study on *Evodia vestita*. *Chinese Journal of applied & environmental biology*. 16, 72-75.
- Intekhab J., Aslam M. (2008). Coumarins from the roots of *Clausena pentaphylla*. *FABAD Journal Pharmaceutical Sciences*. 33, 67-70.
- Koehler P.E., Wu C.M., Ayres J.C. (1972). Isolation and identification of xanthotoxin (8-Methoxypsoralen) and bergapten (5-Methoxypsoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Microbiology*. 23, 852-856.
- Kotsias B.A. (1999) Sócrates y la cicuta. *Medicina*. 59, 211-214.
- Lázaro A.C., Sánchez M. P. (2006). Vitíligo: principales opciones terapéuticas. *Medicina Cutanea Ibero- Latino Americana*. 34, 81-88.
- López T. (1999). Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in livestock. A review. *Toxicon*. 37, 841-865.

- Mohammad S., AL-Mashhadani N., Najam W. Farhan R. (2010). Topical psoralen and ultraviolet a radiation treatment for alopecia areata. *Tikrit Medical Journal*. 16, 67-70.
- Nitao J., Berhow M., Duval S., Weisleder D., Vaughn S., Zangerl A., Berenbaum M. (2003). Characterization of furanocoumarin metabolites in parsnip webworm *Depressaria pastinacella*. *Journal of Chemical Ecology*. 29, 671-682.
- Ode P., Berenbaum M., Zangerl A., Hardy C. (2004). Host plant, host plant chemistry and the polyembryonic parasitoid *Copidosoma sosares*: indirect effects in a tritrophic interaction. *OIKOS*. 104,388-400.
- Olmedo D. (2009). Farmacognosia y Fitoterapia. Carrera técnico en Farmacia. Departamento de Química Medicinal y Farmacognosia. Escuela de farmacia. Universidad de Panamá. Fecha de consulta: 17 de noviembre de 2011. Disponible en: www.slideshare.net/dionisoantonio/apuntes-modulo-farmacognosia-tecnico.
- Panno M., Giordano F., Palma M., Bartella V., Rago V., Maggiolini M., Sisci D., Lanzino M., De Amicis F., Andò S. (2009). Evidence that bergapten, independently of its photoactivation, enhances p53 gene expression and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Curret Cancer Drug Targets*. 9, 469-481.
- Plantsystematics. <http://www.plantsystematics.org> EUA. Fecha de consulta: 9 de Junio de 2011.
- Radulovic N., Zlatkovic D., Zlatkovic B., Dorovic D., Stojanovic G., Palic R. (2008). Chemical composition of leaf and flower essential oils of *Conium maculatum* from Serbia. *Chemistry of Natural Compounds*. 44, 390-394.
- Reynolds T. (2005). Hemlock alkaloids from Socrates to poison aloes. *Phytochemistry*. 66, 1399-1406.

- Riveiro M., De kimpe N., Moglioni A., Vázquez R., Monczor F., Shayo C., Davio C. (2010). Coumarins. Old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Current Medicinal Chemistry*. 17, 1325-1338.
- Sanabria A., Mantilla J. (1986). Actividad antifungica de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Biológicas*. 15, 17-22.
- Wu L., Wang X., Xu W., Farzaneh F., Xu R. (2009). The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivates. *Current Medicinal Chemistry*. 16, 4236-4260.
- Zobel A.M., Brown S.A. (1993). Influence of low-intensity ultraviolet radiation on extrusion of furanocoumarins to the leaf surface. *Journal of Chemical Ecology*. 19, 939-952.