

LA ETNOFARMACOLOGÍA Y LOS BIOENSAYOS COMO NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA DE LA FLORA MEDICINAL PERUANA

César M. Fuertes R¹., Pedro Angulo H²., Lourdes Hernández De Jesús³

¹Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

²Centro de Investigación IVITA. UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria.
d170003@unmsm.edu.pe

³Laboratorio de Fitoquímica. Instituto Politécnico Nacional - México.

“La observación es el apoyo de la mente en el razonamiento,
y la experiencia, el apoyo de la mente en la decisión”

C. Bernard

RESUMEN

Como las plantas pueden contener cientos, aún miles, de metabolitos, el reino vegetal puede ser una fuente de nuevos compuestos para ser ensayados en los “screenings” terapéuticos. Un enfoque realístico a este desafío fascinante es el desarrollo de la etnofarmacología. En contraste con la química medicinal, la etnofarmacología puede empezar a partir de la actividad observada de una droga usada en humanos o animales. El subsecuente fraccionamiento guiado por el bioensayo puede conducir al descubrimiento de estructuras químicas previamente desconocidas para los estudios posteriores de estructura-actividad. Con la inyección automatizada de muestras y fracciones colectadas, los sistemas HPLC pueden fácil y rápidamente ser usados para aislar décimas de miligramos de compuestos puros, cuyas estructuras usualmente se identifican por el uso de la espectroscopía RMN. Finalmente, nosotros hacemos dos recomendaciones muy importantes a los fitoquímicos que entran en este campo: (i) nunca empiecen un gran proyecto a menos que tengan garantizado suficiente suministro de material, sea una planta o una droga usada localmente, (ii) se debe encontrar o desarrollar un adecuado bioensayo para monitorear el aislamiento de los constituyentes activos. Sin embargo, muchos de los grupos que están trabajando en productos naturales se encuentran en las universidades e institutos de investigación en todo el Perú, y no están muy familiarizados o bien adaptados a las nuevas tendencias en el descubrimiento de drogas. Nuestra esperanza es que esta publicación llame la atención no solamente de la comunidad biocientífica, sino del gobierno porque si la actual tendencia de destrucción de los hábitats del Amazonas continúa a la misma velocidad, los fitoquímicos tienen poca chance para descubrir biomoléculas para el bienestar humano y animal.

Palabras clave: Etnofarmacología, bioensayos, screening fitoquímico, métodos espectroscópicos.

ABSTRACT

Since plants may contain hundreds or even thousands metabolites, the vegetable kingdom can be a posible source of new compounds for introduction into therapeutical screening programmes. A realistic approach to this fascinating challenge is the development of the ethnopharmacology. In contrast to medicinal chemistry, ethnopharmacology can start from an observed activity of a drug used in man or animals. Subsequent bioassay-direct fractionation can lead to the discovery of previously unknown chemical structures for further structure-activity studies. With automated sample injection and fraction collection, HPLC systems can readily and rapidly be used to isolate tens of milligrams of pure compound, whose structure is usually resolved by use of NMR spectroscopy. Finally, we have two strong recommendations to

phytochemists entering this field: (i) Never launch a major project unless a sufficient supply of starting material is guaranteed, be it a plant or a locally used drug, (ii) An adequate bioassay should be found or developed for monitoring the isolation of active constituents. However, many of the groups working on natural products are based in universities and research institutes throughout Perú, are not very familiar with or well adapted to the new trends in drug discovery. Our hope that this paper will attract the attention not only the bioscientific community but the government because if the current trend of destruction of Amazon's habitats continues at its present rate, phytochemists may have only a few chances to discover biomolecules for the human being and animal specimens.

Key words: Ethnopharmacology, bioassay-guided fractionation, phytochemistry screening, spectroscopy methods.

INTRODUCCIÓN

Los severos efectos colaterales de muchas drogas sintéticas y la falta de drogas efectivas en la causa de las enfermedades, es aún una característica desconcertante de la farmacología moderna (1). Sin embargo, las plantas usadas en la medicina tradicional, se constituyen en una fuente casi inagotable de moléculas, cuyos análisis se están facilitando por la disponibilidad de bioensayos *in vitro* que sirven de guía en la investigación fitoquímica moderna (2, 3). En consecuencia, ahora podemos apreciar un renacer de la medicina verde. También hay un cambio en la actitud de la industria farmacéutica: hace 15 años, de las 250 transnacionales más poderosas, ninguna tenía un programa de investigación que involucre las plantas medicinales, ahora, más de la mitad de éstas se han comprometido con estas investigaciones por lo que están en la búsqueda mundial de moléculas bioactivas (4).

Las plantas contienen cientos y aún miles de metabolitos, que a pesar de los modernos laboratorios de investigación que se encuentran en los países desarrollados, se tardaría muchos años en conocer la composición química de un porcentaje apreciable de ellas (5). Cada especie viviente es el resultado de un proceso lento e irreversible de evolución biológica y los ecosistemas representan una preciosa reserva de biodiversidad que están siendo rápidamente reducidos por el avance de la civilización. (6). En la medida que los bosques tropicales están siendo destruidos, se están perdiendo especies que podrían dar medicinas útiles (7, 8).

La inhabilidad para ver un determinado uso en una planta que no llama la atención, es una falla de la imaginación, el mismo tipo de falla que vió al Océano Atlántico como un vasto y enorme charco rodeando y limitando a Europa antes que ver una gran vía hacia las nuevas variedades del nuevo mundo. Esta falla en la imaginación no nos permite percibir a nuestra selva como una fuente de moléculas terapéuticas y fitomedicamentos para este milenio (9), no solamente para abastecer al mercado interno, sino también para los países industrializados cuyas poblaciones están retomando al uso de los productos naturales (10). El tejo del pacífico, *Taxus brevifolia*, del cual se extrae el taxol, es un gran ejemplo de una especie que hace 30 o 40 años era considerado sin uso. Algo similar ha sucedido con la uña de gato, (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*), la cual hasta hace poco no figuraba en las referencias bibliográficas. Recientemente se ha realizado en Iquitos (Perú) la I Reunión Internacional del Género *Uncaria* "Uña de gato", en la cual se ha reconfirmado su actividad antiinflamatoria y antioxidante (11, 12). Sin embargo, respectivamente, ambas especies fueron descubiertas y han sido utilizadas tradicionalmente por los indígenas de la columbia británica y de la amazonía peruana.

Los humanos cuidamos de no perder lo que nunca tuvimos y no lo que tenemos. Por lo tanto hay poco interés en mantener la diversidad vegetal para un beneficio futuro, en su lugar se prefiere la

ganancia económica inmediata o a corto tiempo (7, 8).

Esto debe llevarnos a la siguiente reflexión: Los países en vías de desarrollo como el nuestro, no pueden permitirse el lujo de gastar millones de dólares en importar medicinas que pueden producir o extraer de sus recursos terapéuticos naturales (9). Las plantas medicinales contienen un gran número de constituyentes químicos que pueden contribuir a la medicina humana y veterinaria como materia terapéutica para producción de fitoterapéuticos en nuestro país. Por ejemplo: (i) pueden ser usadas directamente como agentes terapéuticos (plantas medicinales); (ii) las sustancias químicas que contienen pueden servir como modelos para la producción de compuestos medicinales afines; (iii) pueden servir como materiales para compuestos semisintéticos más complejos; (iv) pueden ser usados para investigar, evaluar o como otras herramientas de investigación en el desarrollo de otras drogas; y (v) pueden ser usados como guías quimiotaxonómicas (7).

Según Vegas Gallo (13) “de las 40000 especies que se calcula tiene la flora peruana que podrían impulsar el desarrollo industrial, agrícola y medicinal, sólo 18000 están inventariadas y de las especies conocidas sólo 3140 se usan diversamente como alimentos, medicamentos, cosméticos, maderas, etc.”

Entonces, se requiere de un enfoque apropiado para seleccionar a las mejores candidatas a ser investigadas. Nosotros creemos que la etnofarmacología es de gran utilidad (14, 15). La Farmacología es la ciencia que estudia las drogas o fármacos y sus mecanismos de acción en el organismo. Cuando añadimos el prefijo “etno” nos referimos al conocimiento y utilización empírica de los productos naturales. Por lo tanto, se entiende que la etnofarmacología tiene como fin investigar científicamente los compuestos bioactivos usados en la medicina de las etnias indígenas (16).

El objetivo de la etnofarmacología es obtener y mantener una amplia perspectiva multidisciplinaria del uso humano de las drogas crudas en el contexto tradicional, correlacionando e integrando datos científicos ofrecidos por una variedad de disciplinas y subdisciplinas, tales como la antropología, arqueología, lingüística, historia, botánica, zoología, química, farmacología, toxicología y otras. Algún escéptico podría argumentar que solamente se trata de vender un vino viejo en botellas nuevas, sin embargo es más apropiado hablar acerca de un vino nuevo en botellas viejas (16, 17), ya que el mayor atractivo se encuentra precisamente en la diversidad que ella provee.

METODOLOGÍAS

Metodología para obtener moléculas bioactivas

La metodología adoptada para obtener una molécula bioactiva explotable, involucra un trabajo interdisciplinario entre botánicos, farmacognostas, farmacólogos, químicos, y toxicólogos, y puede ser formulado como sigue (18):

1. Selección, colección, identificación botánica, secado y preparación del material vegetal (herbario)
2. Extracción con solventes (preparación del extracto apropiado) y análisis preliminar en cromatografía en capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC)
3. Screening biológico y farmacológico de los extractos crudos
4. Separación cromatográfica de los constituyentes bioactivos puros (fraccionamiento guiado por el bioensayo)
5. Verificación de la pureza de los compuestos aislados y determinación de la estructura química por métodos químicos y espectroscópicos
6. Análisis y perfil farmacológico de compuestos puros
7. Examen toxicológico
8. Síntesis total y/o parcial

9. Preparación de derivados o análogos para estudios de la relación estructura-actividad

Selección del material vegetal

Dado que los recursos económicos para la investigación son limitados o no disponemos; entonces cómo decidir cuál especie vegetal debería ser seleccionada para el ensayo?

Hay dos diferentes tipos de programas de selección de las plantas. El primero se caracteriza por ser al “azar” (randomizado), mientras que el segundo puede ser denominado “dirigido” (targeted) (19).

En los programas de selección al azar, las plantas son colectadas y ensayadas sin considerar sus afinidades taxonómicas, contexto etnobotánico u otras cualidades intrínsecas. Este programa de screening a gran escala se inició en los 60's en los EE.UU. Los colectores fueron enviados a varias partes del mundo e instruidos para coleccionar diferentes tipos de plantas como sea posible. Aunque algunos screening al azar se diseñaron para asegurar un adecuado rigor botánico; pero se sabe que a los colectores les faltó rigor botánico. Pero aún, las investigaciones rigurosas tuvieron un bajo rendimiento (20).

Tal vez, la falta de interés en productos naturales de la industria farmacéutica durante los 70s y principios de los 80s fue, en parte, debido a la falla de la investigación al azar (15). Una excepción en este triste panorama, es el taxol, un compuesto antitumoral aislado por el National Cancer Institute del *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*), el cual se encontró en British Columbia.

La alternativa a la búsqueda al azar es la investigación etnofarmacológica de plantas usadas por las poblaciones indígenas en la medicina tradicional. Angulo en sus libros: “La Medicina Tradicional en el Desarrollo de Fitomedicamentos, el Enfoque Etnofarmacológico” (15) y “La Etnofarmacología y los Bioensayos

como Estrategia Actual en la Investigación Fitoquímica” (20) hace una amplia explicación de la contribución de la etnofarmacología a la fitoquímica y al desarrollo de fitomedicamentos a partir de la medicina tradicional. La historia del descubrimiento y desarrollo de drogas parece confirmar que la investigación etnofarmacológica de las floras tradicionales tiene más chance de éxito que los screenings al azar.

Los datos etnofarmacológicos derivados de las culturas que usan plantas medicinales, son análogos a los datos del bioensayo en humanos, particularmente en la gente que se ha estado dosificando con la misma planta por muchas generaciones. En tal situación, las preparaciones con baja eficacia o toxicidad aguda, probablemente han sido descartadas a través del tiempo. Así, nosotros argumentamos que la más grande probabilidad de descubrir compuestos bioactivos útiles de plantas yace en la examinación cuidadosa de las farmacopeas de las culturas que poseen experiencia tradicional en el uso de plantas medicinales (15, 20).

De acuerdo con Rivier & Bruhm (21), la etnofarmacología es un área multidisciplinaria de investigación relacionada con la observación, descripción e investigación experimental de las drogas indígenas y sus actividades biológicas. Después Bruhm & Holmstedt (17) modificaron la definición a “la exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos empleados tradicionalmente u observados por el hombre”.

La etnofarmacología como término científico, parece que fue introducida en un simposium internacional llevado a cabo en San Francisco en 1967 para destacar los aspectos históricos, culturales, antropológicos, botánicos, químicos y farmacológicos de las drogas psicoactivas (22).

Así, el enfoque multidisciplinario a los medicamentos tradicionales se llama etnofarmacología e implica la

colaboración entre antropólogos, botánicos, químicos y farmacólogos y comprende el estudio científico de las plantas usadas con propósitos medicinales por un grupo cultural. La Etnofarmacología, se ha definido como "la observación, identificación, descripción y la investigación experimental de los ingredientes y los efectos de las drogas indígenas. Es claramente un campo altamente interdisciplinario. No es una ciencia del pasado que utiliza un enfoque fuera de moda; constituye la columna vertebral científica en el desarrollo de terapéuticos activos basados sobre la medicina tradicional de varios grupos étnicos". Aunque no muy bien estimada al momento, es un desafío para los farmacólogos modernos (17).

El éxito de un etnofarmacólogo en revelar la química de un té o de un emplasto depende de ganarse la confianza de los expertos locales. Los curanderos, chamanes, parteras y hierberos vuelven a ser considerados los depositarios del conocimiento, a partir del cual la ciencia tecnológicamente preparada, tiene que desarrollar medicamentos "modernos", es decir: industrializarlos y socializar su distribución. Los conocimientos folklóricos o etnomédicos de este recurso humano representan pistas que podrían acortar el camino del descubrimiento de drogas terapéuticas modernas, ya sea directamente de las plantas o de sus análogos sintéticos.

Una vez que se establece la armonía con los curanderos y se obtiene un entendimiento preliminar del fundamento cosmológico de la tradición curanderil, se puede empezar la colección de la etnofarmacopea indígena. Es crucial que toda colección sea documentada con copiosas notas y "vouchers" bien preparados de los especímenes. Es importante registrar el espécimen en un herbario acreditado, para que cualquier duda o discusión concerniente a la identidad botánica de las especies involucradas puedan ser arregladas por la reexaminación de un "voucher" del espécimen colectado

apropiadamente. Tal espécimen debe suplir la información etnobotánica y etnofarmacológica incluyendo los nombres de los informantes y detalles geográficos necesarios para relocalizar la población vegetal que sería requerida (23). A causa del valor científico para los años que vienen (realmente, los sofisticados bioensayos del futuro podrían requerir solamente microgramos de material vegetal), los "voucher" de los especímenes, deberían ser conservados y preservados en un herbario bien curado con duplicados de los especímenes depositados en un herbario geográficamente distante (19)

Además de preparar los "voucher" de los especímenes, los etnofarmacólogos también son responsables de la colección del material vegetal para los test farmacológicos. Se debe poner atención muy cuidadosa a las partes de la planta colectada, ya que las flores, hojas, retoños y raíces, difieren significativamente en su composición química.

Métodos de separación, aislamiento y análisis preliminar

El aislamiento y la purificación de los constituyentes vegetales, se realizan principalmente en dos formas (i) extracción no polar: con éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, o (ii) por extracción con un solvente polar: metanol, etanol, seguido de una separación del crudo, por su polaridad, de acuerdo a los resultados del bioensayo.

Cuando se trata de plantas que son usadas en la medicina tradicional, un método para la caracterización preliminar de las sustancias activas en éstas, ha sido desarrollado por Samuelson et al (24). Este autor considera que los métodos para la extracción están de acuerdo a la forma como la planta es preparada en la medicina tradicional. Los curanderos tradicionales, casi siempre preparan sus remedios por extracción con agua, ya sea hirviendo las plantas o por infusión. Se puede asumir entonces que si esas

plantas contienen compuestos activos farmacológicamente, esas deben ser extractables con agua, el uso de otros solventes podría fallar en detectar la actividad farmacológica relevante. A pesar de las dificultades técnicas en el aislamiento de los compuestos activos de los extractos acuosos, el agua debe ser el solvente preferido para la extracción en la investigación de plantas usadas en la medicina tradicional.

Los trabajos de Samuelson, han sido continuados por Bohlin (25), del Departamento de Farmacognosia de la Universidad de Uppsala (Suecia), este departamento pertenece a la Facultad de Farmacia, localizado en el Uppsala Biomedical Centre. Brevemente: el polvo del vegetal (100g) es mezclado con 1000 ml de solución acuosa de ácido acético al 2% y la mezcla se agita toda la noche. Después de la filtración a través de algodón, el residuo vegetal es re-extractado con 1000 ml del mismo solvente. Los extractos se mezclan y se filtran o centrifugan y se concentran en rota vapor al vacío hasta aproximadamente 200 ml y se liofiliza. El extracto es almacenado a -20 °C.

Según Cox (19), tradicionalmente se han suministrado las hojas secas, de 0,5 a 2 kg, para los ensayos y, el desecado a pesar de su facilidad, no debe ser siempre el mejor método de conservación. En general, las técnicas de preservación y colección deberían aproximarse a aquellas usadas por los curanderos indígenas. En Samoa, los curanderos preparan infusiones acuosas del material vegetal fresco. Nosotros (26) maceramos las hojas frescas y fueron guardadas en envases de aluminio a prueba de rompimiento (27). Después de ser transportada al laboratorio, la fracción acuosa es congelada en seco y la fracción alcohólica es preservada en frascos de vidrio para los análisis por cromatografía de fase gaseosa.

El extracto desecado es sujeto a calentamiento e hidrólisis (ácida y alcalina) para verificar si retiene su actividad. Una solución del extracto es

pasada a través de columnas de Sephadex para separar las sustancias de alto peso molecular (compuestos como azúcares, glicósidos, saponinas o polipéptidos) de las de bajo peso molecular (sapogeninas, terpenos, aminas biógenas, catequinas, etc) y también a través de columnas de intercambio iónico lo cual indica si tiene o no carga, esto permite que el material activo sea adsorbido y todas las impurezas sean lavadas, antes de la elución de los compuestos deseados. La solución acuosa del extracto es mezclada con 10 volúmenes de acetona y el precipitado resultante se colecta por precipitación, se remueve el sobrenadante y ambas fracciones son ensayadas para su actividad farmacológica. La actividad puede ser retenida solamente en el sobrenadante o en el precipitado, este procedimiento es conveniente para usarlo como el primer paso en la purificación en el proceso de aislamiento. Con todos los datos anteriores se puede construir un método de aislamiento y llevar a cabo el fraccionamiento guiado por el bioensayo.

En los sistemas cromatográficos, así como en los procesos de extracción, la polaridad es de suma importancia cuando se selecciona el disolvente. Se ha elaborado una lista de disolventes en función de su capacidad para retener moléculas en la fase móvil de un sistema cromatográfico a la que se llama serie elutrópica (20): ciclo hexano \Rightarrow tetracloruro de carbono \Rightarrow benceno \Rightarrow éter \Rightarrow cloroformo \Rightarrow acetona \Rightarrow acetato de etilo \Rightarrow etano \Rightarrow metano \Rightarrow agua \Rightarrow ácidos y bases.

En la cromatografía de adsorción, la selección del disolvente (eluyente) depende sobre todo de la competencia entre las moléculas de disolvente y soluto por los sitios activos del adsorbente; cuando el disolvente es demasiado fuerte para el soluto, éste pasará totalmente a la fase móvil, mientras que si el disolvente es demasiado débil, las moléculas de soluto quedarán ligadas al adsorbente. Ninguno de éstos dos casos es bueno, porque en

ambos no hay separación; en cambio si se usa un disolvente intermedio, los componentes pueden separarse porque las moléculas individuales tienen la oportunidad de mostrar sus diferencias en capacidad para competir con las moléculas del eluyente (28).

En la última década se han introducido varias nuevas técnicas que han conducido a la aceleración y simplificación de problemas difíciles de separación (29). Sin embargo no existe una técnica universal que sea capaz de resolver cada problema de aislamiento. Todos los métodos tienen sus ventajas y sus limitaciones, los resultados se obtienen por la combinación de dos o más de éstos.

Las técnicas de separación preparativa más importantes que se emplean en el aislamiento y purificación de constituyentes vegetales es la cromatográfica, en sus diversas formas: TLC, LPLC, MPLC, OPLC, HPLC, DCCC, RLCC, CPC, cromatografía líquida al vacío. La cromatografía en columna es la más popular y usada extensivamente. Puede incluir resinas de intercambio iónico, filtración sobre gel, cromatografía sobre sílica gel o sílica gel químicamente modificada. La cromatografía en columna abierta tiene una alta capacidad de carga pero el tiempo de separación es mayor y la resolución relativamente baja. Nuevos sistemas preparativos han sido introducidos, los cuales reducen el tiempo de separación; pero el HPLC preparativo y semipreparativo, son los métodos más eficientes. Las desventajas de este método son la necesidad de pre-purificar la muestra y el alto costo de la columna.

Posteriormente se desarrolló sistemas cromatográficos que involucran solamente la partición líquido-líquido, sin la fase estacionaria sólida. Sus ventajas están en que se evita la adsorción irreversible de la muestra, el bajo costo de las fases, y una mínima desnaturalización. La cromatografía de partición centrífuga (CPC), una técnica

recientemente introducida, se basa en una actividad centrífuga antes que una actividad gravitatoria para la retención de la fase estacionaria y en consecuencia es más rápida que los otros métodos. Aunque es un método relativamente nuevo, la CPC está rápidamente encontrando aplicaciones para la separación no solamente de constituyentes vegetales, sino de productos microbiológicos, productos naturales marinos, y diversos metabolitos (30).

Bioensayos

Una vez que la planta ha sido seleccionada, el primer paso es la evaluación de la actividad biológica. Un gran tropiezo para los que buscan en plantas o sus extractos, moléculas con nuevas actividades fisiológicas, ha sido la falta de procedimientos sencillos de bioensayo. Dependiendo de los objetivos del estudio, entonces se ejecuta el screening general o se programa un ensayo específico para cierta actividad.

En el pasado, el screening Hipocrático, fue un excelente método para examinar una amplia variedad de actividades biológicas en las plantas y su perfil farmacológico y toxicológico (31). Consiste en hacer observaciones directas y cuidadosas de los efectos inducidos por una droga en ratas a una serie de dosis. Revela útil información acerca de las propiedades sobre el sistema nervioso central, autonómico, relajante muscular, anticoagulante, analgésico, diurético y propiedades laxativas de una droga cruda (32, 33).

Sin embargo, como se requiere de técnicos habilidosos y experimentados; solamente pocos grupos de investigadores académicos en productos naturales, han sido capaces de equipar con las facilidades necesarias para tal screening. Este método requiere grandes cantidades del extracto y por lo tanto no es muy confiable en guiar hacia el aislamiento de un componente activo.

Hasta hace poco la mayoría de bioensayos se llevaron a cabo en animales de experimentación. Sin embargo en los países desarrollados hay presiones políticas para evitar el uso de animales en la investigación, especialmente en las primeras etapas del desarrollo de una droga. Los experimentos con animales en USA, deben ser aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) o deben ser conforme a las regulaciones gubernamentales relacionados con el uso y cuidado animal. Una desventaja de los modelos *in vivo* es que hay un límite al número de parámetros que pueden ser medidos en un simple experimento. En nuestro país, el Congreso de la República ha aprobado una Ley de Protección Animal.

Implementar modelos animales para detectar propiedades tales como antidiabetes, anticáncer, antiinflamatorio, antihipertensivo y actividades inmunomoduladoras, lleva mucho tiempo y es caro. Además, en algunas actividades biológicas no hay una buena relación entre los resultados de los animales con los de humanos. Los modelos animales son caros, están sujetos a considerables variaciones, menos cuantitativos de lo que uno desea, usualmente no tienen un manejo mecánico y los resultados varían considerablemente, dependiendo de la ruta de administración de la sustancia ensayada (34).

En el desarrollo de drogas de plantas, una vez que se descubre que un extracto crudo tiene una actividad biológica interesante, el modelo de bioensayo debe ser usado para monitorear el fraccionamiento fitoquímico hasta que el principio (s) activo (s) sea descubiertos. Se necesita alta capacidad de procesamiento de muestras, a fin de procesar los extractos y sus fracciones. Idealmente, los sistemas de test deben ser: simples, rápidos, reproducibles y poco costosos. Como los principios activos generalmente 'se presentan a bajas concentraciones, se requiere que el bioensayo sea de alta sensibilidad para su detección. El número de falsos positivos debe ser minimizado.

Estas pruebas "de preselección" se basan más en los conocimientos de la química o bioquímica que en los de farmacología. La mayor parte de las pruebas "de preselección" se pueden llevar a cabo con materiales relativamente sencillos. Prácticamente todas las pruebas se pueden realizar con materiales para cultivo celular, una incubadora de CO₂, un microscopio invertido, una campana estéril, un contador de células, baños de agua, incubadoras de aire seco, un autoclave, un espectrofotómetro registrador y un contador de centelleo en medio líquido. Sin embargo, muchas de las pruebas "de preselección" *in vitro* pueden realizarse con eficacia sin algunos de estos aparatos e incluso sin ninguno (35).

Los farmacólogos deben considerar más conveniente y económico el estudio *in vitro* del efecto de los extractos como alternativa al empleo de animales de laboratorio. De hecho, existe una tendencia universal a evitar la experimentación en animales intactos durante las primeras etapas de la investigación farmacológica. Las ventajas más prominentes de los programas de screening que utilizan bioensayos está en que éstos son específicos en la mayoría de los casos, en algunas veces específicos de órganos, lo cual facilita el desarrollo de moléculas terapéuticas. Este método de screening también tiene implicaciones prácticas importantes con relación a tiempo operacional, costos y especialmente con la bioética médica.

Los científicos suelen ser reacios a aceptar datos sobre los efectos de extractos crudos de plantas en seres humanos o animales intactos, si no se proporciona al mismo tiempo una explicación previa de los efectos observados.

La desventaja de estos programas que utilizan el bioensayo es que los resultados obtenidos *in vitro* a menudo no se repiten cuando se hacen ensayos *in vivo*. Por otra parte, los hallazgos de estudios mecanicistas (habitualmente realizados *in vitro*) de los extractos

crudos de plantas, rara vez atraen mucho interés si no se acompañan de pruebas que demuestren sus efectos en un animal intacto o en el ser humano. Además, debemos mantener en nuestra mente que debido a la complejidad fisiopatológica de muchas enfermedades, no es posible en cada caso encontrar y seleccionar modelos con blancos adecuados. Si la etiología de la enfermedad o el sitio de la deficiencia es desconocido, el screening de este programa, usualmente, conduce a compuestos que actúan sintomáticamente. Esto significa que aún empleando técnicas de screening modernos, excepcionalmente se encontrarán drogas que actúen en la causa de las enfermedades.

A menos estas limitaciones, sin embargo, estos programas de screening vegetal abren la posibilidad de encontrar estructuras importantes. Estas podrían ser las plantillas iniciales para las modificaciones sintéticas con el propósito de optimizar la biodisponibilidad y la farmacocinética, mejorando considerablemente así la eficiencia de los constituyentes vegetales para la terapia (36).

Con mayor conocimiento acerca de los fundamentos de la enfermedad y las bases moleculares de los organismos vivientes, los bioensayos basados en el mecanismo usando sistemas subcelulares hoy son una opción realística. Éstos tienen una alta sensibilidad, alta selectividad, y buena reproducibilidad, y permiten el procesamiento de un gran número de muestras.

Jerry L. McLaughlin (37), del Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Purdue University West Lafayette, nos dice: la disminución de las especies vegetales del mundo en cuanto a posibles usos farmacéuticos, pronto deben ser evaluadas biológicamente y conservadas antes que sean extinguidas. Los investigadores del tercer mundo, donde una riqueza de especies vegetales inexploradas son únicas y valiosos recursos, deben rápidamente aceptar este

desafío. Para aumentar su significado e importancia, los futuros fitoquímicos, especialmente aquellos que trabajan con plantas medicinales folklóricas, están obligados a incorporar el uso de los bioensayos. Deben combinarse tres metodologías fácilmente disponibles: (1) técnicas de separación (extracción, partición y cromatografía), 2) bioensayos simples y convenientes, 3) métodos de elucidación estructura (espectroscopía, espectrofotometría, conversiones químicas y cristalografía de rayos-X).

El factor simple más importante que está bloqueando el descubrimiento de nuevos constituyentes bioactivos de plantas superiores, es el desconocimiento y la renuencia de los investigadores fitoquímicos para adoptar los bioensayos.

Métodos analíticos modernos

A causa de su naturaleza compleja, las plantas fueron consideradas extremadamente difíciles de fraccionar con el propósito de aislamiento e identificación de sus constituyentes activos. Las técnicas analíticas empezaron a ser mejoradas a partir de la segunda mitad de este siglo. La extracción por un solvente selectivo fue bosquejado por G. Dragendorff (38) y dió el camino para que en este siglo se desarrolle la cromatografía de adsorción, la cual a su turno generó las técnicas de capa fina, partición en papel, intercambio iónico, antes del desarrollo de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la cromatografía de gas. Estas últimas, acopladas con la espectrofotometría de masa, actualmente de mucha utilidad.

El llamado Cromato-masa permite la identificación y cuantificación de pequeñísimas cantidades como nanogramos de constituyentes en aproximadamente 1 mg de muestra vegetal, sin previa extracción o purificación (39). Otras poderosas técnicas útiles para la determinación estructural de constituyentes vegetales

complejos incluyen, cristalografía de rayos X y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear en sus diversas variaciones.

El mejoramiento de estas técnicas y el desarrollo de otras, evidentemente conducirán al último analizador de la "black box" (caja negra) que aún representa a los miles de fitoquímicos que están contenidos en el reino vegetal. Estamos a pocos pasos de que se haga realidad una invención por la cual unos pocos miligramos del tejido vegetal colocado en un analizador será convertido en un listado de todos los constituyentes de interés y sus concentraciones en la muestra aparecen en el monitor de una computadora. Esto, apareado con las técnicas mejoradas y simplificadas de bioensayo, son necesarios para revelar numerosos, nuevos y significantes agentes medicinales de la plétora de plantas que se vienen usando en la medicina tradicional (40, 20).

HPLC asociado con espectrofotometría de masa y detección UV para el análisis de extractos vegetales

En el análisis de extractos vegetales se emplean con éxito la combinación de los métodos espectrofotométricos acoplados al HPLC y la detección UV (LC-UV). Una gran cantidad de información preliminar se puede obtener acerca de los constituyentes de un extracto, antes del aislamiento de los compuestos de interés. También hay equipos acoplados entre CG-EMS.

Estas técnicas acopladas conducen a un rápido screening y proporcionan útil información estructural con una cantidad diminutiva de material. Una buena idea se obtiene del tipo de compuestos examinados y subsecuentemente es posible un aislamiento dirigido, si existen otros constituyentes vegetales o compuestos bioactivos de otra fuente natural. Esto tiene doble ventaja, nos permite ahorrar tiempo y costo. Para facilitar mejor las cosas, el sistema está

"on line" con una librería espectral computarizada (20).

Para las investigaciones LC-MS, se usa como interfase un termosparay (TSP) ya que esto es compatible con los solventes y el rango de flujo empleado en el análisis de constituyentes vegetales sobre columnas HPLC de fase reversa.

En suma, los resultados de LC-UV y LC-TSP-MS, dan información concerniente con la masa molecular, el número de grupos hidroxilos y metoxilos, el número de azúcares, su secuencia, y ciertos elementos de modelos de sustitución. Para más precisión de los detalles estructurales concernientes con la posición de grupos hidroxilos libres, en flavonoides y xantonas, se emplea el LC-UV con la adición post columna de reactivos betacrómicos (NaOAc/NaOH, KOH, AlCl₃, H₃BO₃/NaOAc) (20).

Una ilustración de la utilización de este método es, la determinación de modelos de alcaloides quinozilidínicos en 56 especies del género *Lupinus*. Michael Wink et al (41), reportan los alcaloides de 56 especies de *Lupinus* (semillas y hojas), las cuales fueron estudiadas por capilaridad GLC y GLC-MS, en combinación con el INCOS data system. Las especies de Sudamérica, que han estudiado, son: *Lupinus albescens*, *L. aureonitens*, *L. gibertianus*, *L. microcarpus*, y *L. mutabilis*. Se encontró a este método de elección para el análisis de mezclas complejas de alcaloides quinozilidínicos.

El uso de técnicas altamente sensibles, tales como HPLC, GC, y la instrumentación acoplada (LC-UV y LC-MS), hacen posible un rápido screening inicial de extractos crudos vegetales.

La interacción de estas técnicas proveen una gran cantidad de información preliminar acerca del contenido y naturaleza de los constituyentes de estos

extractos - en ciertos casos, la combinación con una librería espectral y la derivatización pre o post columna, conduce a la determina estructural *on-line* (computadora).

Esto es muy útil cuando un gran número de muestras tienen que ser procesadas, porque evita el aislamiento innecesario de los compuestos en cuestión. Sólo después de haber establecido la novedad o la utilidad de un determinado constituyente, es entonces importante procesar el extracto vegetal de la manera usual, para obtener muestras para una full elucidación estructural y ensayo farmacológico.

Elucidación Estructural

La purificación final del compuesto activo se hace mediante HPLC.

Para la elucidación estructural, los métodos usuales son el UV (Ultravioleta), MS (Espectroscopía de Masa), RMN (Resonancia Magnética Nuclear), análisis elemental, métodos químicos, cristalografía de rayos-X. Ahora, las modernas técnicas de 2D NMR, tales como la espectroscopía correlacionada homonuclear y heteronuclear y la espectroscopía NOE, juegan el más importante rol en la elucidación estructural (20).

I)

H-NMR : Tipos de hidrógenos protónicos

C-NMR : Número de átomos de carbono e hidrógeno

DEPT : Caracteriza patrones de acoplamiento

II)

MS : Peso molecular y estructura de acuerdo a la Base de Datos

IR : Grupos funcionales

UV : Cromóforos

De I y II podemos obtener: Fórmula molecular, equivalentes de doble enlace, grupos funcionales.

III)

2D NMR : asignación de todos los sistemas spin

INADEQUATE

- Homonuclear: **H,H-COSY**
- Heteronuclear: **HMQC/XHCORR SR**

HMBC / XHCORR LR

Hasta aquí, ya contamos con el esqueleto de la sustancia desconocida.

IV)

NOE difference/ o NOESY NMR

Cristalografía de **rayos X**

[α]D, CD y **RD spectroscopy**

Formación de derivados o síntesis

DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

IR (Espectroscopía Infrarroja)

COSY (Correlation Spectroscopy)

INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment)



FINALMENTE: Se obtiene la estructura química completa, incluido la estereoquímica y la asignación completa de todos los datos espectroscópicos. En la actualidad la identificación de la molécula activa responsable de una actividad farmacológica es un trabajo de pocas semanas.

Unas decenas de miligramos pueden ser suficientes para la determinación de una estructura completa (20).

RESULTADOS

La etnofarmacología de todos los pueblos del mundo ha aportado contribuciones a la farmacopea universal. Las civilizaciones del Mediterráneo encontraron el ricino (Egipto), la colchicina (Grecia), el opio (Oriente Medio), la belladona (Roma), la escopolamina, el estramonio, el cornezuelo de centeno. La digital es originaria de Inglaterra. Los chinos descubrieron las propiedades curativas de la efedrina, el ginseng, el qing'hao su. De Africa surgieron la guabaína, la vincristina y la vimblastina de Madagascar. Sudamérica ha contribuido, hasta ahora, con la quinina, el curare, la ipeca (emetina) y la cocaína. De la India y Africa surgió la reserpina tan necesaria para psiquiatras y cardiólogos, su planta de origen es llamada "medicina de los hombres tristes".

El enfoque etnofarmacológico requiere de especial atención porque ha demostrado que es más eficiente que el screening al azar, en la investigación de nuevas moléculas bioactivas en plantas (42). Por ejemplo, cuando los extractos vegetales fueron ensayados al azar para la actividad anticáncer, el 10% dió resultados positivos. Cuando las plantas fueron ensayadas sobre la base de su uso etnofarmacológico, dieron: un 20% de respuestas positivas para tratar el cáncer; 20% de las plantas usadas como antihelmínticas; 30% de plantas usadas como piscicidas y 52% de plantas usadas para envenenar flechas (43). Como otro ejemplo tenemos, cuando las plantas

fueron ensayadas su actividad anti-*in vitro*, el 6% de las plantas colectadas al azar mostraron actividad, mientras que el 25% de las plantas ensayadas sobre la base del uso etnofarmacológico mostraron actividad positiva (44). Entonces hay una necesidad urgente para registrar el conocimiento etnofarmacológico de países como el nuestro (45, 15).

La más reciente contribución de la etnofarmacología al arsenal terapéutico mundial es el artemisinín, un sesquiterpeno endoperóxido inusual, extraído de la hierba medicinal *Artemisia annua* "qinghaosu" (la hierba verde) por científicos chinos en 1972. Su estructura fue elucidada por Lin *et al* (46) utilizando medios espectroscópicos y químicos; y confirmada por cristalografía de rayos X (47). La planta, una hierba perenne, ha sido usada en la medicina tradicional china como remedio para los escalofríos y fiebres por más de 2000 años. Aunque originalmente del norte de China, la planta crece silvestremente en muchos países.

Los chinos han desarrollado el artemether y sus productos han sido aprobados como medicinas en China, Burma, Brazil, Thailandia, y Zimbabwe. El arteether, que es tan efectivo como artemether, esta siendo investigado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Walter Reed Army Institute of Research (USA) para su uso en clínica. Arteether es efectivo contra *Plasmodium knowlesi* y *P. cynomolgy* en monos (48) y cepas resistentes de *P. yoelii* en ratones (49).

Rhone-Poulenc Rorer ha desarrollado Paluther (artemether) para uso oral, intramuscular, e intravenoso. Sus productos son registrados como medicinas en cinco países africanos y planifican obtener el registro de sus productos en otros países africanos y en países de Sudamérica.

Son numerosos los descubrimientos de esta naturaleza que seguirán ocurriendo.

En ese sentido el país -como el nuestro- que ha preservado una gran biodiversidad y es poseedor de una gran experiencia en el manejo de las plantas medicinales, puede contribuir con su conocimiento a los actuales programas de desarrollo de medicamentos y aportar ventajas, tanto para la resolución de los problemas de salud de nuestro propio país, así como en la búsqueda de la nueva generación de fármacos propuesta por los países industrializados. Compete a la industria farmacéutica y a la iniciativa privada entrar en esta área fascinante y atractiva del desarrollo de fitofármacos, para lo cual proponemos una mayor interacción con otras instituciones como la Universidad (15).

DISCUSIÓN

Recientemente se ha revivido el interés por las plantas medicinales y los productos naturales en la mayoría de las compañías farmacéuticas debido al innovativo desarrollo de bioensayos *in vitro*. Estos tipos de ensayo se manejan mecanísticamente, requieren pocas cantidades de material vegetal, son simples de ejecutar, los procedimientos son fácilmente automatizados, y los costos son bajos. Desde finales del siglo pasado ya es común ver a un laboratorio industrial con una capacidad de conducir bioensayos *in vitro* sobre 1000-5000 muestras diferentes por día (50, 20). Este método que se está instaurando en las empresas farmacéuticas se opone al método clásico del diseño racional, está basado en la disponibilidad de un gran número de moléculas (extractos) obtenidas en forma rápida y económica sin que sea importante los aspectos relativos a la pureza, sino encontrarle algún tipo de actividad biológica (32).

Pero, con la investigación fitoquímica clásica que todavía se practica en nuestras universidades que consiste en determinar el compuesto más abundante del vegetal, asignarle a su familia química (alcaloides, flavonoides, saponinas, etc) y luego especular algún uso terapéutico. Con esta metodología son limitadas las posibilidades de éxito, se encarece la metodología y requiere grandes cantidades del extracto de la

planta, la cual no puede estar disponible en las primeras etapas del proceso del descubrimiento. Hoy, podemos ser guiados por el bioensayo y dirigir nuestra atención hacia los compuestos verdaderamente importantes presentes en una planta. La mayoría de bioensayos son extremadamente sensibles, de modo que el compuesto activo puede estar presente en cantidades diminutas. Afortunadamente, las técnicas estructurales modernas requieren de sólo cantidades minúsculas del material. La cristalografía de rayos X es una gran elección, pero en la ausencia de cristales apropiados o aún sin el compuesto puro, la estructura puede ser establecida por espectrofotometría de masa combinada con cromatografía de gases (HPLC) o con otros estudios espectroscópicos; todos conectados *on line* a una librería espectral computarizada (20).

En los laboratorios de las Universidades de los países desarrollados, es muy común la existencia de estos equipos, donde el aislamiento y la elucidación de las estructuras químicas de extractos vegetales no es problema como el hecho de conseguir los extractos, ya que las plantas prometedoras generalmente proceden de países del tercer mundo y de áreas tropicales que hoy día afrontan el fantasma de la extinción.

Lamentablemente nuestros laboratorios no poseen estos equipos y su adquisición es casi un sueño... tampoco existen equipos multidisciplinarios integrados al estudio científico de nuestra flora medicinal. Ni siquiera en el INMETRA (Instituto Nacional de Medicina Tradicional) se cuenta con investigadores bien entrenados en las destrezas necesarias para iniciar un screening etnofarmacológico de los remedios tradicionales que se vienen usando en nuestro país. Una razón, se debe al poco incentivo que recibe la investigación por parte del Estado. Los pocos fondos destinados a esta actividad hacen que exista una alta competencia por alcanzarlos y promueve el intrusismo y hasta la irracionalidad alentada por los incentivos económicos que otorgan algunos organismos internacionales financiados por poderosas compañías

que están buscando moléculas bioactivas en las plantas con potenciales aplicaciones farmacéuticas y otras comerciales.

Esto no está mal, sólo que, debe existir una planificación y una política al respecto, para que las universidades y sus investigadores se vean beneficiados. El beneficio puede ser en (i) **Información bibliográfica:** que va a permitir actualizar nuestras metodologías, técnicas y enfoques modernos en la investigación científica de nuestras plantas medicinales (ii) **Transferencia tecnológica:** que implica el equipamiento mínimo de laboratorios, tendientes por lo menos a realizar ciertos bioensayos y determinaciones fitoquímicas preliminares; y (iii) **Capacitación:** a los investigadores y alumnos que destaquen en el estudio de las plantas medicinales y los productos naturales.

Lourdes Hernández, investigadora del Instituto Politécnico Nacional de México, ha logrado publicar varias investigaciones de trabajos desarrollados conjuntamente con investigadores norteamericanos (51) y ha extendido la colaboración hacia el Perú. Entonces, es necesario que las personas que dirigen las instituciones científicas tengan la mentalidad abierta al tiempo; aún es tiempo, hay que repensar y replantear nuestras metodologías. Para los científicos de los países en desarrollo - como el nuestro- comienza una era en la que se prevé las plantas ocuparán un lugar privilegiado y su estudio será de interés nacional. Esto debe motivarnos a incrementar nuestro esfuerzo en la investigación etnofarmacológica y desarrollar nuevas y mejores drogas de plantas para la elaboración de fitoterapéuticos de uso humano y veterinario (15). Gran parte de estos descubrimientos será el resultado del trabajo de instituciones y científicos entusiastas, apasionados y consagrados a esta magna tarea.

Por supuesto, compete al Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales (UNMSM) jugar un rol

protagónico en la investigación científica de la flora medicinal peruana y el desarrollo de fitomedicamentos de uso humano y veterinario. La Farmacia conjuga la destreza artesanal y la ciencia para preparar sustancias apropiadas y convenientes de fuentes naturales para usarlas en el tratamiento de enfermedades, llamadas medicamentos. En ese sentido es necesario que se extiendan los convenios de colaboración con otras instituciones universitarias como el Centro de Investigaciones IVITA que cuenta con estaciones experimentales en Iquitos, Pucallpa, Cusco, Huancayo y Huaral; así como también crear las condiciones mínimas necesarias para acceder al financiamiento de proyectos internacionales con instituciones del extranjero que ahora cuentan como una capacidad instalada de procesar más de 100 000 extractos diarios.

Ahora más que nunca, se debe prestar la debida atención a la “Base de Datos de Plantas Medicinales y Tóxicas que crecen en el Perú – DAPLAMEP” (52) y fortalecer el desarrollo de este valioso y estratégico instrumento como piedra angular que nos puede permitir tener presencia en la nueva sociedad de la información que se viene desarrollando en este mundo globalizado.

Para la mayoría de nosotros, el día de creer que ya hemos alcanzado todo lo que el reino vegetal tiene que ofrecer, está muy lejos. **¡La búsqueda continúa!**

CONCLUSIONES

El enfoque etnofarmacológico en la investigación moderna de moléculas bioactivas en plantas, conjuga principalmente dos componentes: (i) análisis del conocimiento indígena referente a las plantas y sus remedios tradicionales; y (ii) el fraccionamiento guiado por el bioensayo, de las plantas usadas por las comunidades indígenas.

Como una consecuencia del renovado interés en la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural como

candidatas potenciales en el desarrollo de fitomedicamentos, se ha incrementado el desarrollo de la etnofarmacología y la necesidad de expertos en esta área. Las posibilidades del éxito dentro de este campo, se incrementaría y la investigación se volvería más eficiente con una intensa colaboración entre los investigadores de diferentes disciplinas e instituciones científicas; ese es el reto histórico para el Instituto.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Abelson PH** (1990) Medicine from plants. *Science*, 247: 513.
2. **Academia Sinica** (1980) Crystal structure and absolute configuration of qinghausu. *Scientia Sinica* (English Edition), 23(3): 380-396.
3. **Akerele O** (1993) Nature's medicinal bounty: don't throw it away. *World Health Forum*, 14: 390-95.
4. **Angulo HP** (1996) La Etnofarmacología y los medicamentos del siglo XXI. Segundo symposium sobre "Plantas Medicinales y Medicamento Vegetal en el Perú". 27/31 oct. Lima.
5. **Angulo HP** (1997) *La Medicina Tradicional en el Desarrollo de Fitomedicamentos, el enfoque Etnofarmacológico*. Editorial De Mar - Lima 157 pp.
6. **Angulo HP** (1998) *Proyecto de Desarrollo de una Base de Datos de Plantas Medicinales y Tóxicas en el Perú*. Tesis Maestría. Fac de Farm y Bioq Univ Nac Mayor San Marcos. Lima. 86p.
7. **Angulo HP** (1999) La Amazonía como fuente de medicamentos para el tercer milenio. En *Memorias del Seminario "Promoción y Comercio de Plantas Promisorias con Principios Activos Especiales de la Selva del Perú"*. Proyecto IICA-GTZ "Orientación de la Investigación Agraria hacia el Desarrollo Alternativo". PP 21-22, 69-72. **Angulo HP** (2001) *La Etnofarmacología y los Bioensayos como Estrategia Actual en la Investigación Fitoquímica*. En prensa.
8. **Angulo HP, Andamayo FDE, Matas CP, Miguez SMP** (2001) acción *in vitro* de la uña de gato (*uncaria tomentosa* y *uncaria guianensis*) sobre el nitrito y el óxido nítrico. *En prensa*.
9. **Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR** (1993) Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: *Human Medicinal Agents from Plants*. Am Chem Soc Symposium Series 534, edited by AD Kinghorn, MF Balandrin. Washington, DC. Amer Chem Soc, pp 2-12.
10. **Balick MJ** (1990) Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. In: D.J. Chadwick and J. Marsh (Eds.), *Bioactive Compounds from Plants*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 22-39.
11. **Bohlin Lars** (1993) Research on pharmacologically active natural products at the Department of Pharmacognosy, Uppsala University. *Journal of Ethnopharmacology*, 38: 225-231.
12. **Bruhn, JC, Holmstedt B** (1981) Ethnopharmacology: objectives, principles and perspectives. In *Natural Products as Medical Agents*, eds E. Reinhard & J.L. Beal. Hippocrates, Stuttgart, 405-430.
13. **Cooks RG, Kondrat RW, Youssefi M, McLaughlin JL** (1981) Mass-analyzed ion kinetic energy (MIKE) spectrometry and the direct analysis of coca. *J Ethnopharmacol*, 3: 299-312.
14. **Cox A, Sperry LR, Tuominen M, Bohlin L** (1989) Pharmacological activity of the Samoan ethnopharmacopoeia. *Econ Bot*, 43: 487 - 497.
15. **Cox Alan** (1990) Ethnopharmacology and the search for new drugs. In *Bioactive Compounds from Plants*, Chadwick DJ, Joan Marsh, editors. A Wiley-Interscience Publication. Pp 40-47.

16. **Cox Alan** (1990) Samoan ethnopharmacology. In: Wagner, H., Farnsworth (eds) *Economic and Medicinal Plant Research*, vol 4: Plants and Traditional Medicine. Academic Press, London, p 123-139.
17. **Croom EM** (1983) Documenting and evaluating herbal remedies. *Econ Bot*, 37: 13-27.
18. **De Smet PAGM, Rivier L** (1989) A general outlook on ethnopharmacology. *J Ethnopharm*, 25: 127-138.
19. **Dragendorff G** (1884) *Plant Analysis: Qualitative and Quantitative*, p. 8-98. Bailliere, Tindall, Cox, London.
20. **Dutta GP, Bajpai R, Vishwakarma RA** (1989a) Comparison of antimalarial efficacy of artemisinin (qinghaosu) and arteether against *Plasmodium cynomolgi* B infection in monkeys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 56-57.
21. **Dutta GP, Bajpai R, Vishwakarma RA** (1989b) Antimalarial efficacy of arteether against multiple drug resistant strain of *Plasmodium yoelii nigeriensis*. *Pharmacology Research*, 21 (4): 415-419.
22. **Efron DH, Holmstedt B, Kline NS** (eds) (1976) Ethnopharmacological search for psychoactive drugs. *Publ 1645, US Department of Health, Education and Welfare*. Government Printing Office, Washington DC.
23. **Farnsworth NR** (1990) The role of the ethnopharmacology in drug development. In *Bioactive Compounds from Plants*, Chadwick, D. J., and Joan Marsh, editors. John Wiley & Sons Ltd, England. Pp 2-21.
24. **Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS et al** (1985) Medicinal Plants in Therapy. *Bulletin of the World Health Organization - Bulletin del 'Organization Mondiale de la Sante*, 63(6): 965-981.
25. **Farnsworth NR, Kaas CJ** (1981) An approach utilizing information for traditional medicine to identify tumor-inhibiting plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 3: 85-99.
26. **Harbone JB** (1990) Role of secondary metabolites in chemical defence mechanisms in plants. In Chadwick D.J. and Joan Marsh (eds) *Bioactive Compounds from Plants*, Wiley, Chichester, England. pp 126-139.
27. **Harborne JB** (1993) *Introduction to Ecological Biochemistry*, Ed 4. Academic Press, London, 318 pp.
28. **Harvey AL** (1999) Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery *Trends Pharmacol Sci*, 20(5): 196-197.
29. **Hernández De Jesús L** (1999) Bioactive compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteracea). *Natural Products Letters*. En Prensa.
30. **Hostettmann K, Hamburger M, Hostettmann M, Marston A** (1991) New developments in the separation of natural products. In *Modern phytochemical methods* (ed. NH Fischer, MB Isman, HA Stafford), pp. 1-31. Plenum Press, New York.
31. **Huxtable RJ** (1992) The pharmacology of extinction. *Journal of Ethnopharmacology* 37: 1-11.
32. **Lin JM, Ni MY, Fan JF, Tu YY, Wu ZH, Wu YL, Chou WS** (1979) Structure and reaction of arteannuin. *Hua Hsueh Hsueh Pao*, 37(2): 129-143.
33. **Malone MH** (1977) Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. In: H. Wagner and P. Wolff (eds.), *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 23-53.
34. **Malone MH, Carrano RA** (1970) Hippocratic and pharmacodynamic screening. In: *Compilation of Symposium Papers presented at the Fifth National Meeting of the A. Ph.A. Academy of Pharmaceuticals Sciences*. American Pharmaceutical Association, Washington, DC, pp. 149-176.

35. **Malone MH, Robichaud RC** (1962) A Hippocratic screen for pure of crude drug materials. *Lloydia*, 25: 320-332.
36. **Marston A and Hostettmann K** (1991) Modern separation methods. *Natural Products Reports* 8: 391-423.
37. **Marston A and Hostettmann K** (1993) Counter-current chromatography as preparative tool-applications and perspectives. *Journal of Chromatography*, 658: 315-41.
38. **McChesney JD, Adams RP** (1985) Co-evaluation of plant extracts as petrochemical substitutes and for biologically active compounds. *Econ Bot* 39: 74-86.
39. **McLaughlin JL** (1991) Bench-top bioassays for the discovery of bioactive compounds in higher plants. *Brenesia*, 34: 1-14.
40. **Nityanand S** (1985) Natural Products and Drug Development. Krogsgaard Larsen, S. Brogger, K. Koford, Munkagaars, Copenhagen. Pp 78-139.
41. **O'Neil, Lewis** (1993) The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. In *Human Medicinal Agents from Plants*, Balandrin MF (ed.). American Chemical Society. Washington DC.
42. **Rivier L, Bruhn JG** (1979) Editorial. *J Ethnopharmacol*, 1:1.
43. **Samuelson G, Kyerematen G, Farah MH** (1985) Preliminary chemical characterization of pharmacologically active compounds in aqueous plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 14: 193-210.
44. **Sandoval CHM, Okuma NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM, Miller MJS** (2001) La actividad antiinflamatoria y antioxidativa de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) es independiente del contenido de alcaloides. En *Resúmenes de la I Reunión Internacional del Género Uncaria*, 16-18 agosto, pag 34. Iquitos, Perú: RIPROFITO-CYTED.
45. **Schultes RE, Raffauf RF** (1990) *The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. Dioscorides Press, Portland. OR. 484 pp.
46. **Spjut RW, Perdue RE** (1976) Plant folklore: a tool for predicting sources of antitumor activity? *Cancer Treatment Reports*, 60: 979-985.
47. **Tyler VE** (1986) Plant drugs in the twenty-first century. *Econ Bot*, 40: 279-288.
48. **Valencia OC** (1995) *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas, México. Pag 24.
49. **Vegas Gallo E** (1994) Flora nacional constituye un gran potencial agroindustrial. *El Comercio*, octubre 2 Lima.
50. **Wagner H** (1993) Leading structures of plant origin for drug development. *Journal of Ethnopharmacology*, 38: 105-112.
51. **Wink M, Meibner C, Witte L** (1995) Patterns of quinozilidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. *Phytochemistry*, 38 (1): 139-153.