



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

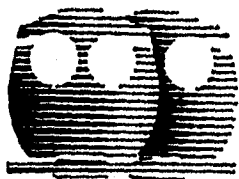
ESTUDIO FITOQUIMICO DEL  
EXTRACTO METANOLICO DE LA  
RAIZ DE *Cuphea pinetorum* BENTH

T E S I S

QUIMICA FARMACEUTICA  
BIOLOGA

P R E S E N T A:

ALMA DELIA ALANIS RIOS



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO**

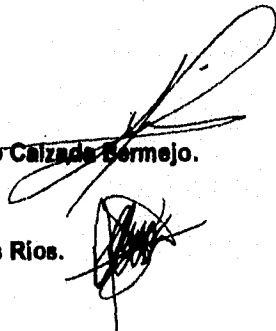
<b>PRESIDENTE</b>	<b>Caballero Arrollo Yolanda.</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Mata Essayag Rachel.</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Calzada Bermejo Fernando.</b>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<b>Castañeda López Peria Carolina.</b>
<b>2do SUPLENTE</b>	<b>Jiménez Arellanes María Adelina.</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**Unidad de Investigación Médica en  
Farmacología de Productos Naturales  
Hospital de Pediatría C.M.N.S.XXI.**

**ASESOR** **M.en C. Fernando Calzada Bermejo.**

**SUSTENTANTE** **Alma Della Alanís Ríos.**

The image shows two handwritten signatures in black ink. The first signature is larger and more elaborate, corresponding to the assessor's name. The second signature is smaller and more compact, corresponding to the presenter's name.

## DEDICATORIAS

A mis hijas:

Karen Ailed y Yaksi Carolina; por todo el amor que me brindan y por ser mi aliciente para superarme.

*Todo cabe en lo breve; pequeño es el niño y encierra al hombre, estrecho es el cerebro y cobija el pensamiento, no es el ojo más que un punto y abarca leguas.*

A mis padres:

Isidro y Estefanía; porque gracias a su amor, apoyo, paciencia y comprensión pude realizar esta meta, la cual es la herencia más valiosa que pudiera recibir.

*Nadie puede hacer por los niños lo que hacen los abuelos: los abuelos rocían polvo de estrellas en la vida de los pequeños.*

A mis hermanos:

Rocío, Sara, Elena, Marisol, Jazmín y Eduardo; por su comprensión, apoyo y cariño que me han dado durante toda mi vida.

*Nunca desesperen, pero si llegan, sigan trabajando a pesar de su desesperación.*

A mis Tias:

En especial a Cristina y Malena; por haber ayudado en mi formación religiosa, así como; por sus consejos recibidos desde mi infancia hasta el día de hoy.

*Vivir no es comer, ni beber, sino pensar y amar. El amor es la clave de Dios, de la vida y también el amor ...es la clave del hombre.*

A mis amigas:

Carmen y Claudia; por las experiencias compartidas, por apoyarnos en cada momento de nuestras vidas y por la amistad que nos une y nos unirá siempre.

*Los amigos son la familia que elegimos tener. Un amigo es alguien que se acerca y toca las puertas de tu corazón, cuando el resto del mundo te abandona.*

A todas las personas que conozco y que de alguna u otra manera estuvieron conmigo y me apoyaron durante el transcurso de mi formación profesional.

*A veces nuestro destino semeja un árbol frutal en invierno, ¿quién pensaría que esas ramas reverdecerán y florecerán? más esperamos que así sea y sabemos que así será.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Química Mariana Meckes porque gracias a su apoyo, comprensión y confianza pude realizar el presente trabajo, así como; por permitirme ser un colaborador más dentro de su unidad.

Agradezco a todas las personas con las que estuve laborando, y que me dedicaron tiempo ayudándome cuando lo necesité para terminar el presente trabajo en la UIMPN.

Agradezco al Dr. Roberto Cedillo por brindarme comprensión, conocimientos, ayuda y tiempo cuando acudí a él; y por haberme permitido trabajar conjuntamente con el personal de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

También agradezco al personal del laboratorio de Parasitología; por brindarme su apoyo, ayuda y amistad.

Agradezco a la Dra. Yolanda Caballero Arrollo y a la Dra. Rachel Mata E. de la Facultad de Química (UNAM); por la revisión y comentarios a este manuscrito.

*Reunirse en equipo es el principio, mantenerse en equipo es el progreso y trabajar en equipo es el éxito.*

Agradezco el apoyo que me brindó la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del CMN S XXI (IMSS); por permitirme realizar el proyecto de investigación para la existencia de este trabajo.

Asimismo; agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo financiero a través del proyecto 0147P-M.

Agradezco al Fondo de Fomento de la Investigación (FOFOI) del CMN S XXI (IMSS); por su apoyo financiero a través del proyecto 0147P-M FP 0038/61.

*El conocimiento le llega a quien siempre está con los ojos abiertos y las manos siempre trabajando. Todo conocimiento es importante, actúa valientemente, ten fe y sé paciente.*

Agradezco de manera especial al M. en C. Fernando Calzada Bermejo, mi asesor de tesis; el cual me brindó sus conocimientos, experiencias, apoyo y amistad durante la realización de mi trabajo y gracias a esto me transmitió su cariño hacia el estudio de los Productos Naturales.

Gracias por todo.

Gracias a Dios por darme todo lo que tengo.

*Un maestro no se esfuerza en explicarte su punto de vista, en vez de ello, solo te invita a colocarte a su lado a que veas por ti mismo.*

*Vive como si fuera para siempre y ten sin embargo, preparadas tus maletas y en orden tus asuntos, dispuesto a partir a todo prisa.*



## INDICE

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ESQUEMAS.....	v
LISTA DE ESPECTROS.....	vi
LISTA DE ABREVIACIONES.....	vii
INTRODUCCION.....	1
HIPOTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	3
I. ANTECEDENTES.....	5
1.1. Generalidades de <i>Cuphea plinetorum</i> Benth.....	5
1.2. Análisis biológicos y químicos.....	8
I.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	12
2.1. EVALUACIONES BIOLÓGICAS.....	18
2.1.1. Determinación de la actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> contra los trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> y/o <i>Giardia lamblia</i> .....	18
2.1.1.1. Bioensayo.....	19
2.1.2. Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> L.....	19
2.1.2.1. Bioensayo.....	19
III FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO METANOLICO.....	20
3.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS.....	22
3.1.1. Aislamiento y purificación de glucosa <u>22</u> y sacarosa <u>23</u> .....	22

3.1.2. Aislamiento y purificación de los compuestos camperol <u>3</u> y quercetina <u>24</u> .....	22
3.1.3. Aislamiento y purificación de manitol <u>15</u> .....	24
3.2. PREPARACION DE DERIVADOS.....	24
3.2.1. Reacción de acetilación.....	24
3.2.2. Reacción de metilación.....	24
IV RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
4.1. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.....	28
4.1.1. Identificación de camperol <u>3</u> .....	28
4.1.2. Identificación de quercetina <u>24</u> .....	35
4.1.3. Identificación de glucosa <u>22</u> , sacarosa <u>23</u> y manitol <u>15</u> .....	41
V RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	42
VI BIBLIOGRAFIA.....	44

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.-Especies del género <i>Cuphea</i> que se encuentran localizadas en México.....</b>	7
<b>Tabla 2.-Sistemas de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....</b>	17
<b>Tabla 3.-Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto metanólico de la raíz de <i>Cuphea plinetorum</i> Benth (columna original).....</b>	21
<b>Tabla 4.-Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción combinada F-2 de la columna original.....</b>	23
<b>Tabla 5.-Rendimiento y toxicidad de los compuestos aislados de <i>Cuphea plinetorum</i>..</b>	28
<b>Tabla 6.-Constantes espectroscópicas y espectrométricas de camperol 3.....</b>	32
<b>Tabla 7.-Constantes espectroscópicas y espectrométricas de quercetina 24.....</b>	37

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Ejemplar de herbario de <i>Cuphea pinetorum</i> Benth.....	6
Figura 2.- Compuestos aislados de <i>Cuphea sp.</i> .....	9
Figura 3.- Compuestos aislados de <i>Cuphea balsamona</i> .....	10
Figura 4.- Compuestos aislados de algunas especies del género <i>Cuphea</i> ....	11
Figura 5.- Reacción de acetilación de camperol y quercetina.....	25
Figura 6.- Reacción de metilación de camperol y quercetina.....	26
Figura 7.- Hidróxilo fenólico quelatado.....	29
Figura 8.- Anillo aromático tetrasustituido.....	29
Figura 9.- Anillo disustituido del flavonol.....	30
Figura 10.- Anillo aromático C.....	30
Figura 11.- Correlación ABX del anillo aromático trisustituido.....	36
Figura 12.- Compuestos identificados de la fracción combinada 1-3 de la columna II (22 y 23) y de la fracción combinada F-3 (15).....	41

## LISTA DE ESQUEMAS

v

	Pág.
<b>Esquema 1.- Preparación del extracto para la determinación de alcaloides</b> en <i>Cuphea pinetorum</i> Benth.....	13
<b>Esquema 2.- Obtención del extracto metanólico de la raíz de <i>Cuphea pinetorum</i></b> Benth .....	14
<b>Esquema 3.- Fraccionamiento del extracto metanólico y purificación de los</b> compuestos obtenidos de la raíz de <i>Cuphea pinetorum</i> Benth.....	15

**LISTAS DE ESPECTROS**

	Pág
<b>Espectro 1.- Espectro de RMNP de camperol.....</b>	<b>33</b>
<b>Espectro 2. Espectro de RMN<sup>13</sup>C de camperol.....</b>	<b>34</b>
<b>Espectro 3. Espectro de RMNP de quercetina.....</b>	<b>38</b>
<b>Espectro 4. Espectro de RMNP COSY de quercetina.....</b>	<b>39</b>
<b>Espectro 5. Espectro de RMN<sup>13</sup>C de quercetina.....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIACIONES

MHz	Mega Hertz
nm	Nanómetros
eV	Electrón volts
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ g	Microgramos
c/u	Cada uno
hrs.	Horas
ppm	Partes por millón
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria cincuenta
DL <sub>50</sub>	Dosis letal cincuenta
I.R.	Infrarojo
EMIE	Espectro de masas de impacto electrónico
RMNP	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
$\delta$	Desplazamiento químico
s	Singulete
m/z:	Relación masa - carga
KBr	Bromuro de potasio
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido hexadeuterado
H <sub>2</sub> O	Agua

HCl	Acido clorhídrico
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amonio
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
anh.	Anhídrido
CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Diazometano
OH	Hidróxilo
<b>GI</b>	<i>Giardia lamblia</i>
<b>Eh</b>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<b>As</b>	<i>Artemia salina</i>
mg	Milligramos
g	Gramos
ml	Millilitros
sol.	Solución
ac.	Acido
conc.	Concentrado
TMS	Tetrametil silano



## INTRODUCCION

Las plantas siempre han sido una fuente de remedios, tanto en la forma de preparaciones tradicionales como de principios activos puros. En años recientes, a nivel mundial el interés sobre las propiedades curativas de las plantas, ha aumentado por la importancia que se reconoce a estos recursos en el desarrollo y producción de nuevos medicamentos, aún más si se considera que aproximadamente el 60% de los habitantes de la población total utilizan plantas medicinales para tratar diferentes enfermedades <sup>1-6</sup>. En el mundo existen entre 750,000 y 250,000 especies de plantas, de ellas se estima que el 10% se emplean en la medicina tradicional de algunos países. Sin embargo, se ha descrito que sólo al 1% se le ha comprobado de manera experimental su valor terapéutico <sup>7</sup>. En el caso particular de México, en la actualidad se considera que hay 7,000 especies vegetales de aplicación en la medicina tradicional y tan solo el 1.5% de estas especies han sido estudiadas experimentalmente <sup>3,8</sup>.

En la actualidad con la ayuda del avance de la ciencia y la tecnología se han logrado separar e identificar un mayor número de compuestos en las plantas. Por ejemplo, en el campo de la espectroscopía y la espectrometría <sup>9-10</sup> se cuenta actualmente con técnicas más sensibles. Y para la realización de las pruebas biológicas se cuenta con ensayos más específicos <sup>1,6,8</sup>. Aún más para saber los mecanismos de acción que median la actividad biológica, se cuenta también con ensayos de unión radio-ligando que utilizan enzimas específicas y receptores <sup>5-8,9-10</sup>.

Otro importante avance se ha logrado en el campo de la biotecnología, ya que los cultivos de células y de tejidos pueden constituir una mejor alternativa para encontrar compuestos con actividad biológica. La ventaja de esto es que el crecimiento de las células o tejidos se puede controlar y mantenerse en condiciones estándar y no están sujetos a variaciones de clima<sup>9</sup>. Por los avances antes mencionados, el estudio y conocimiento en torno a las propiedades químicas y farmacológicas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana, sigue el patrón propuesto por la comunidad académica internacional, es decir; es una labor interdisciplinaria en colaboración con químicos, botánicos, farmacólogos, médicos y farmacognostas, por tan solo mencionar algunos<sup>11-12</sup>. Hay una planificación cuidadosa para la implementación de estos estudios, considerando principalmente la investigación de plantas medicinales que permitan la obtención de fármacos potenciales con propiedades farmacológicas, que puedan ser aprovechados en la terapéutica, para aliviar aquellas enfermedades de mayor incidencia en el país<sup>4,6,9,13</sup>. También debe tomarse en cuenta la disponibilidad de medicamentos útiles para el tratamiento de las enfermedades<sup>1-2</sup>.

Por lo anteriormente mencionado, se decidió realizar el estudio de *Cuphea pinetorum* Benth, una de las plantas utilizada en la medicina tradicional, de los altos de Chiapas, para aliviar diversos padecimientos, entre los que destaca la diarrea con sangre y moco, padecimiento producido en algunos casos por *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

#### HIPOTESIS

La especie vegetal *Cuphea pinetorum* contiene compuestos con actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, los cuales pueden ser aislados mediante un método fitoquímico biodirigido.

#### OBJETIVOS

##### **Objetivo general.**

Obtener los compuestos con actividad antiprotozoaria presentes en el extracto metanólico de la raíz de *Cuphea pinetorum*.

Para el cumplimiento del objetivo general propuesto se contemplan los siguientes objetivos específicos:

Revisar y recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de *Cuphea pinetorum* Benth y especies relacionadas.

Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación de los extractos vegetales.

Preparar el extracto metanólico mediante maceración exhaustiva de la raíz y fraccionarlo mediante cromatografía en columna de manera bidirigida.

Determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* del extracto vegetal, fracciones y compuestos aislados contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

Determinar la toxicidad para el crustáceo de *Artemia salina* Leach del extracto, fracciones y compuestos activos aislados.

Separar y purificar los compuestos de las diferentes fracciones bioactivas.

Identificar mediante métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos los compuestos aislados.

Correlacionar los resultados obtenidos con las propiedades atribuidas a la especie vegetal *Cuphea pinetorum*.

Fortalecer el conocimiento sobre los constituyentes químicos de la vegetación de México con posibilidades de uso terapéutico.

## I. ANTECEDENTES

### 1.1. Generalidades de *Cuphea pinetorum* Benth.

La familia de las Litráceas se encuentra fundamentalmente distribuida en las zonas trópicas y subtropicales de América, está constituida por 24 géneros y cerca de 500 especies. El género más grande es el de *Cuphea* con alrededor de 200 especies<sup>14</sup>. En el caso particular de México, se cuenta con 48 especies localizadas en los estados de Chiapas, Durango, Guadalajara, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz (ver Tabla 1)<sup>15-18</sup>. Es de hacer notar que varias de estas especies presentan problemas de índole taxonómico, por lo cual es importante hacer su estudio fitoquímico y apoyar así su clasificación<sup>19</sup>.

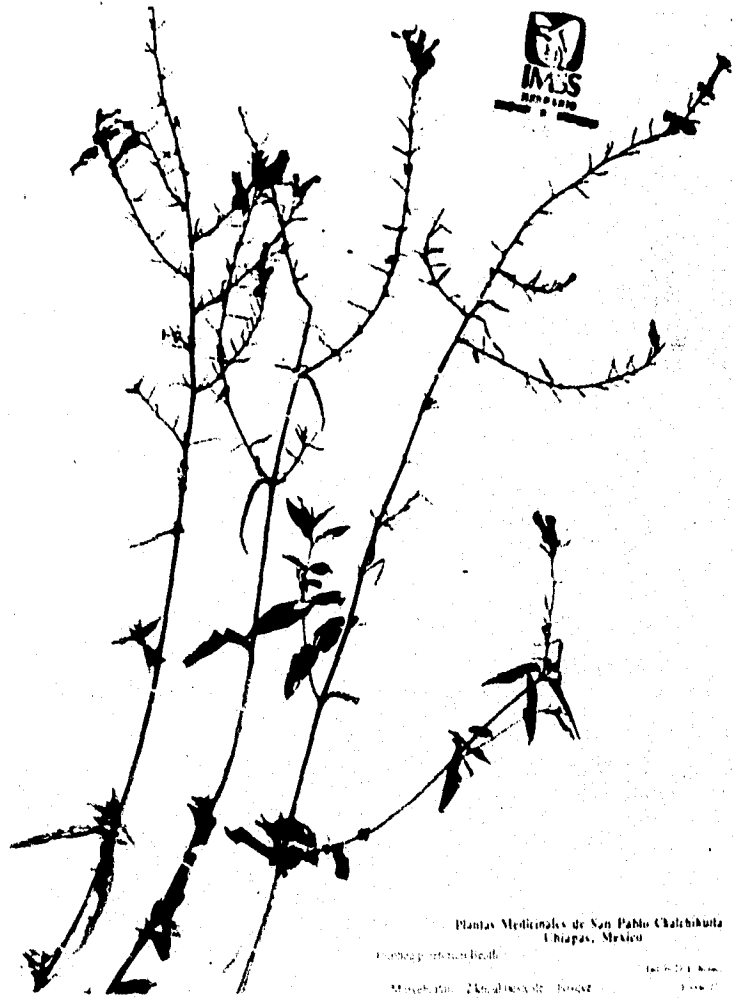
*Cuphea pinetorum* representa una de las especies de la familia que es endémica de México<sup>15-18</sup> y se le consigue en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Puebla<sup>16,17</sup>.

*Cuphea pinetorum* es conocida por los habitantes de los altos de Chiapas como: Back momol y Vach'uet. La hoja tierna de la planta con flor roja es usada para tratar infecciones de la boca, diarrea líquida con sangre y como antitumoral. La hoja tierna de la planta con flor amarilla se utiliza contra el enfraquecimiento y el marasmo. La flor se emplea contra las infecciones de la lengua.

Carmelino Santíz hace la siguiente descripción de la planta: Arbusto de entre 30cm a 1.50m con flores rojas o amarillas<sup>18</sup>(ver Figura 1).



Figura 1.- Ejemplar de herbario de *Cuphea pinetorum* Benth.



6

Figura 1.- Ejemplar de herbario de *Cuphea pinetorum* Benth.

Tabla 1.- Especies del género de *Cuphea* que se encuentran localizadas en México.

<i>C. aequalpetala</i>	<i>C. laminuligera</i>
<i>C. angustifolia</i>	<i>C. lanceolata</i>
<i>C. appendiculata</i>	<i>C. leptopoda</i>
<i>C. avigera</i>	<i>C. llavea</i>
<i>C. bolssierana</i>	<i>C. lobbophora</i>
<i>C. bustamanta</i>	<i>C. lozanii</i>
<i>C. caesilae</i>	<i>C. lutea</i>
<i>C. calcarata</i>	<i>C. micranta</i>
<i>C. calophylla</i>	<i>C. micropetala</i>
<i>C. cartagenensis</i>	<i>C. mimuloides</i>
<i>C. chiapensis</i>	<i>C. nelsonii</i>
<i>C. cristata</i>	<i>C. nitidula</i>
<i>C. cyanea</i>	<i>C. oreophila</i>
<i>C. decandra</i>	<i>C. ownbeyi</i>
<i>C. elliptica</i>	<i>C. palmeri</i>
<i>C. epilobifolia</i>	<i>C. pinetorum</i>
<i>C. gracilliflora</i>	<i>C. quaternata</i>
<i>C. heterophylla</i>	<i>C. sanguinea</i>
<i>C. hookeriana</i>	<i>C. secundiflora</i>
<i>C. hyssopifolia</i>	<i>C. subulgera</i>
<i>C. ignea</i>	<i>C. toluicana</i>
<i>C. jorullensis</i>	<i>C. trochilus</i>
<i>C. infundibulum</i>	<i>C. vesiculigera</i>
<i>C. intermedia</i>	<i>C. wrightii</i>



## 1.2.- ANALISIS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS.

Estudios farmacológicos han demostrado las propiedades antiprotozoarias de los extractos metanólicos de la raíz y el tallo de *Cuphea pinetorum* Benth contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* <sup>20</sup>.

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie *Cuphea pinetorum* no ha sido objeto de estudios previos; sin embargo, de especies relacionadas se han aislado: ácidos grasos, antocianidinas, esteroides, flavonoides, hidrocarburos y triterpenos y un polialcohol.

De *Cuphea sp* se aislaron e identificaron cuatro flavonoides: ramnetina 1, isoramnetina 2, camperol 3 y mirecitina 4 <sup>21-22</sup>, (ver Figura 2).

De la especie *Cuphea balsamona* Lin., se aislaron e identificaron siete hidrocarburos alifáticos saturados (heptacosano 5, octacosano 6, nonacosano 7, triacontano 8, henetriacontano 9, docotriacontano 10, tricotriacontano 11), dos esteroides (esligmasterol 12 y  $\beta$ -sitosterol 13), un triterpeno (friedelina 14) y un polialcohol (manitol 15), <sup>23</sup> (ver Figura 3).

De *Cuphea hookeriana*, *C. ilavia*, *C. ilavea*, *C. painteri*, *C. pulcherrima*, *C. schumannii* y *C. viscosissima* se identificaron tres ácidos grasos (ácido n-octanoico 16, ácido n-nonanoico 17, ácido n-decanoico 18) <sup>24-26</sup>.

De *Cuphea ignea* se han aislado dos antocianidinas (malvidin-3,5-diglucósido 19 y pelargonidin-3,5-diglucósido 20) <sup>21</sup>.

De *Cuphea carthagenensis*, *C. epilobifolia* y *C. infundibulum* se ha aislado un triterpeno: cartagenol (3 $\beta$ -hidroxifriedel-7-ene 21), <sup>27</sup> (ver Figura 4).

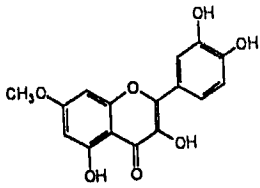
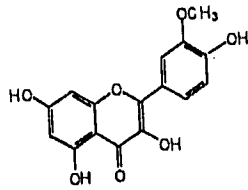
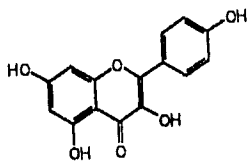
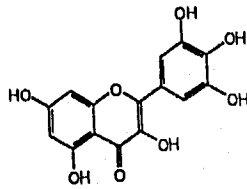
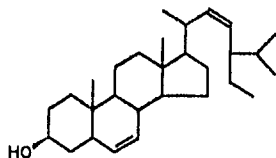
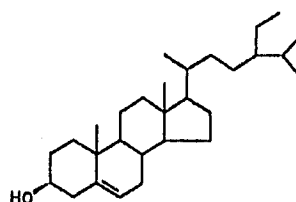
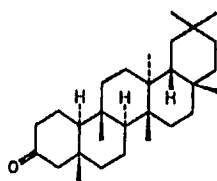
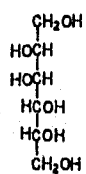
1234

Figura 2.- Compuestos aislados de *Cuphea* sp.

n-C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>5n-C<sub>28</sub>H<sub>58</sub>6n-C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>7n-C<sub>30</sub>H<sub>62</sub>8n-C<sub>31</sub>H<sub>64</sub>9n-C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>10n-C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>1112131415

**Figura 3.-** Compuestos aislados de *Cuphea balsamona*.

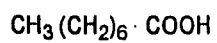
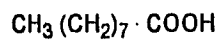
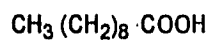
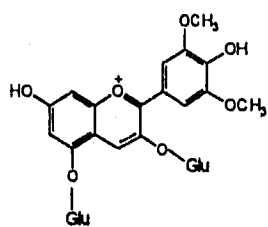
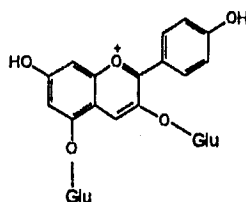
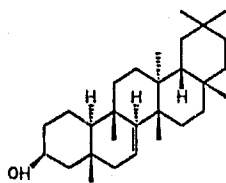
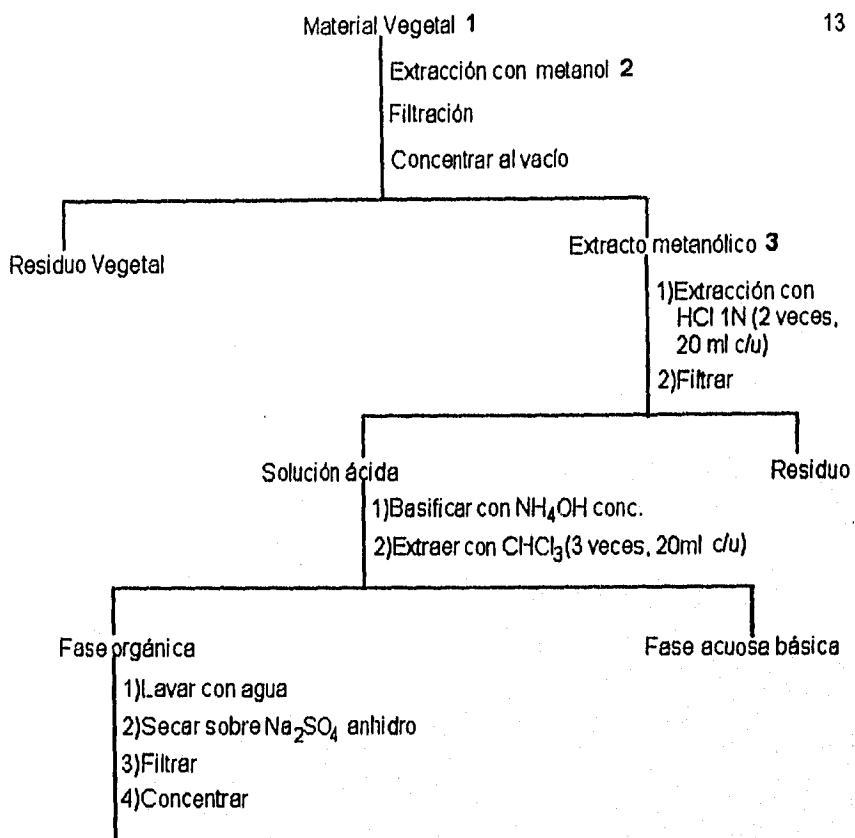
161718192021

Figura 4.- Compuestos aislados de algunas especies del género *Cuphea*.

## II. PARTE EXPERIMENTAL.

Se realizó el estudio de la raíz de la planta medicinal *Cuphea plinetorum* Benth, empleando la prueba de la determinación antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*<sup>20,28-30</sup>, para obtener los compuestos bioactivos. Adicionalmente se determinó la prueba de toxicidad a la *Artemia salina* L., considerando que esta prueba permite predecir otras actividades biológicas<sup>31-33</sup>. El material vegetal (232g) seco y molido, se extrajo exhaustivamente vía maceración con 2L de metanol en períodos de 48hrs., eliminándose el disolvente por destilación a presión reducida, la reunión de estos extractos proporcionó 25.3g de residuo. Con 2.5g de extracto se determinó la presencia o ausencia de alcaloides siguiendo el Esquema 1. El extracto orgánico total obtenido, (20g) se fraccionó en mezclas menos complejas, mediante una cromatografía en columna empleándose 180g de celulosa microcristalina ( [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sub>n</sub> Avicel, Merck ) como adsorbente; la elución se realizó aumentando el grado de polaridad utilizando como disolventes: acetato de etilo, acetona, metanol y agua en diferentes proporciones. El volumen de las fracciones obtenidas fue de 200ml c/u, se colectaron un total de 35 fracciones las cuales se concentraron a presión reducida a 40°C. Una vez obtenidas se analizaron por el método de cromatografía en capa fina analítica para determinar su composición y homogeneidad. Las fracciones obtenidas se reunieron utilizando criterios cromatográficos, a éstas se les realizó la prueba para determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* y la prueba para determinar la toxicidad contra *Artemia salina* L. Aquella fracción que resultó con mayor actividad fue posteriormente purificada. La metodología general del estudio se resume en los Esquemas 2 y 3.



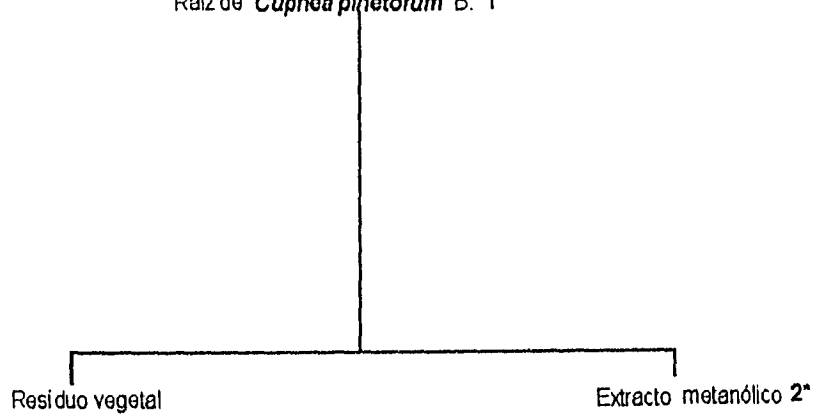
Extracto orgánico crudo donde supuestamente podrían encontrarse alcaloides.

- 1 Cantidad de material vegetal 232g.
- 2 Extracción vía maceración (250 ml de metanol, 2 días).
- 3 Cantidad de extracto metanólico 2.51g.

**Esquema 1.-** Preparación del extracto para la determinación de alcaloides en *Cuphea pinetorum* Benth.

Raíz de *Cuphea plietorum* B. 1\*

14



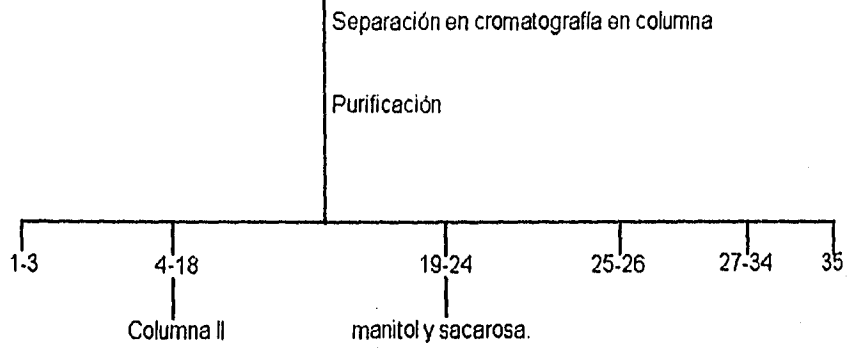
1\* 232g de raíz

2\* 25.3g de residuo

**Esquema 2.-**Obtención del extracto metanólico de la raíz de *Cuphea plietorum* Benth.

Extracto metanólico 3\*

15



3\* 20g de extracto

**Esquema 3.**-Fraccionamiento del extracto metanólico y purificación de los compuestos obtenidos de la raíz de *Cuphea pinetorum* Benth.



Los análisis en capa fina se realizaron en placas Merck (DC-Fertigplatten kieselgel 60), y placas de celulosa (DC-Alufolien 25), usando varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénos los cuales se encuentran resumidos en la Tabla 2.

Los puntos de fusión se determinaron en el aparato Fisher Johns y no están corregidos.

La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de la técnica de espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE), técnicas espectroscópicas de infrarojo (IR), resonancia magnética nuclear protónica (RMNP) y de  $C^{13}$  (RMN $^{13}C$ ). Los espectros de RMNP fueron obtenidos a 300 MHz, según se indica en cada espectro, utilizando un espectrómetro analítico (Varian XR-300), utilizando como disolvente DMSO- $d_6$  y tetrametil silano (TMS) como referencia interna. Los espectros de infrarojo fueron obtenidos en pastillas de KBr, usando un espectrofotómetro (Perkin-Elmer 283-B). Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro (Hewlet Packard 5985-B) utilizando la técnica de impacto electrónico a 70 eV. La determinación de la viabilidad de las células se realiza con un haemocitómetro (Propper lumicype). Los estándares utilizados: manitol, glucosa, sacarosa (Merck), quercetina y camperol (Sigma).

Tabla 2.- Sistema de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES		
SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
I	AcOEt	100%
II	acetona : MeOH	50:50
III	AcOEt : MeOH : agua	7:2:1
IV	AcOEt : ac. acético : MeOH : agua	6:1.5:1.5:1

AGENTES CROMOGENOS*		
REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico (A)	12g sulfato cérico 22.2ml ac.sulfúrico conc. 350g de hielo.	34
Tricloruro de Aluminio (B)	Solución 5% de tricloruro de aluminio.	35
Dragendorff's (C)	2.6g carbonato de bismuto básico 7g yoduro de sodio 25 ml ac. acético glacial 89 ml AcOEt 0.5 ml de agua.	34
Tricloruro de Fierro (D)	Solución 10% acuosa	36
Vainillina-Ac.Sulfúrico (E)	5% ac. sulfúrico etanólico (Sol. I) 1% vainillina etanólica (Sol. II)	36

\* En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas con luz U.V. de una lámpara modelo UV GL-58 a longitudes de onda de 254 y 365nm.

## 2.1.-EVALUACIONES BIOLÓGICAS.

### 2.1.1. Determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y/o *Giardia lamblia*.

La determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* del extracto, fracciones combinadas y compuestos aislados, se realizó siguiendo el bioensayo descrito por Cedillo y col. para los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* <sup>20,28-30</sup>.

Las cepas de los microorganismos utilizados en el ensayo fueron *Entamoeba histolytica* (HMI - IMSS) y *Giardia lamblia* (IMSS:0989:1). La cepa de *Entamoeba histolytica* fue mantenida en medio TYI-S-33 adicionado con 10% de suero bovino y *Giardia lamblia* fue cultivada en medio modificado TYI-S-33, adicionado con 10% de suero de ternera. Ambas cepas fueron mantenidas axénicamente y para el ensayo fueron empleadas en fase de crecimiento logarítmico, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Parasitología en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría del IMSS.

Las muestras ( extracto, fracciones combinadas y compuestos aislados), se disolvieron en DMSO y se ajustan con medio TYI-S-33 a concentraciones adecuadas. Posteriormente se transfieren a 5 tubos (con 4ml de medio c/u) de manera independiente 20,40,80,120,160µl de la solución a evaluar; los cuales corresponden a concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200µg/ml del compuesto respectivamente.

#### 2.1.1.1.- Bioensayo.

A los tubos anteriormente preparados, se les adicionó el inóculo del trofozoito en prueba, *Entamoeba histolytica* o *Giardia lamblia* (aproximadamente 50,000 trofozoitos/ $\mu$ l ). Los tubos se incuban a 37°C durante 48hrs y se determina la viabilidad de las células por cuenta directa en el haemocitómetro. Los resultados se procesan mediante un análisis probit para calcular la concentración inhibitoria cincuenta (  $CI_{50}$  ). La prueba se realiza por triplicado y se repite un mínimo de tres veces.

#### 2.1.2.-Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* L.

La determinación de la toxicidad del extracto, fracciones combinadas y compuestos aislados, se hizo siguiendo el bioensayo descrito por Anderson para el crustáceo *Artemia salina* L. 31-33.

Se pesaron 20mg del compuesto puro, fracción o extracto, disolviéndose en 2ml de solvente apropiado. Se transfirieron a tres viales de manera independiente (500,50 y 5  $\mu$ l), que corresponden a concentraciones de (1000,100 y 10  $\mu$ g/ml) respectivamente. Se realizó por triplicado, dejándose evaporar a sequedad para asegurar la eliminación completa del disolvente.

#### 2.1.2.1.-Bioensayo.

Después de haber desarrollado los crustáceos en un medio salino artificial durante 48hrs., se transfieren diez individuos a c/u de los viales, conteniendo además de la muestra a evaluar, 5ml de agua salada, 24hrs. más tarde se registraron el número de organismos sobrevivientes. Los resultados se procesan mediante un análisis probit <sup>32</sup> para calcular la dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ).

### III.- FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO METANOLICO.

A 20g del extracto metanólico bioactivo (  $Cl_{50} Eh=73.23$  ppm,  $Cl_{50} Gl=74.73$  ppm,  $DL_{50} As= 3.06$  ppm ) fue fraccionado mediante una cromatografía en columna, utilizando como adsorbente celulosa microcristalina (180g), a esta columna la llamaremos columna original. El proceso de elución se realizó utilizando como disolvente acetato de etilo, acetona, metanol y agua en diferentes proporciones. De este fraccionamiento se obtuvieron un total de 35 fracciones de 200ml c/u, que se concentraron en un rotaevaporador (Buchi Re 111). Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares, resultando de este análisis seis fracciones. A su vez, cada una de las fracciones combinadas fueron evaluadas biológicamente utilizando la prueba de actividad antiprotozoaria y toxicidad antes mencionadas. En la Tabla 3 se resumen los sistemas eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con c/u de ellos, las fracciones combinadas y los resultados obtenidos de las pruebas biológicas.

Con base en los resultados mostrados en la Tabla 3, se observó que la fracción combinada F-2 fué la que mostró mayor actividad antiprotozoaria, por lo cual se decidió separarla en sus constituyentes individuales. La fracción combinada F-2 (16.01071g) de la columna original (ver Tabla 3) , se purificó mediante una cromatografía en columna (columna II) utilizando como soporte 48g de Sephadex LH-20 y como eluyentes agua, etanol, acetona y metanol en diferentes proporciones. Se obtuvieron 88 fracciones de 5ml c/u.( ver Tabla 4).

**Tabla 3.-** Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto metanólico de la raíz de *Cuphea plinetorum* Benth (columna original).

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
AcOEt	100%	1-3 4-13	F-1 (1-3) F-2 (4-18)
A: MeOH	50:50	14-20	F-3 (19-24)
MeOH	100%	21-27	F-4 (25-26)
MeOH:H <sub>2</sub> O	75:25	28-35	F-5(27-34) F-6(35)

Fracciones combinadas	Resultados del Bioensayo		
	Cl <sub>50</sub> (ppm)		DL <sub>50</sub> (ppm)
	<i>Gi</i>	<i>Eh</i>	<i>As</i>
F-1	397.54	556.31	42.94
F-2	86.08	100.18	13.02
F-3	2324.00	1118.63	*
F-4	**	**	**
F-5	**	**	27.81
F-6	288.00	356.12	12.42

\*\* poca cantidad

*Gi*=*Giardia lamblia*

*As*=*Artemia salina*

\* DL<sub>50</sub> mayor a 1000 ppm

*Eh*=*Entamoeba histolytica*

A = acetona

### **3.1.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS.**

#### **3.1.1.-Aislamiento y purificación de glucosa 22 y sacarosa 23.**

La fracción combinada 1-3 (1.11 g) de la columna II (ver Tabla 4), se purificó mediante una cromatografía en columna, utilizando como soporte Sephadex LH-20 (10x 2.5 cm) y como eluyentes cloroformo, metanol y agua en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 34 fracciones de 20 ml cada una, de las fracciones eluidas con metanol se obtuvo glucosa ( 0.072 g) y sacarosa (0.54 g). Las cuales fueron identificadas por comparación con un estándar mediante cromatografía en capa fina.

#### **3.1.2. Aislamiento y purificación de los compuestos camperol 3 y quercetina 24 .**

La fracción combinada 15-18 (1.03 g) de la columna II (ver Tabla 4), se purificó mediante una cromatografía en columna, utilizando como adsorbente 20 g de sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck) y como eluyentes mezclas de acetato de etilo y metanol en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 39 fracciones de 20 ml cada una.

De la fracción combinada 1-2, eluída con acetato de etilo al 100% se obtuvo camperol ( 0.00153 g).

De la fracción 3, eluída con acetato de etilo al 100% se aisló quercetina (0.00226g)

**Tabla 4.- Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción combinada F-2 de la columna original.**

<b>Eluyente</b>	<b>Proporción</b>	<b>No. de fracciones</b>	<b>Fracciones combinadas</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>100%</b>	<b>1 - 11</b>	<b>1-3</b>
			<b>4</b>
			<b>5</b>
			<b>6 - 11</b>
<b>H<sub>2</sub>O:EtOH</b>	<b>50:50</b>	<b>12 - 38</b>	<b>12 - 14</b>
			<b>15 - 18</b>
			<b>19 - 22</b>
			<b>23 - 27</b>
			<b>29 - 33</b>
			<b>34 - 38</b>
<b>H<sub>2</sub>O:EtOH</b>	<b>60:40</b>	<b>39 - 48</b>	<b>39 - 58</b>
<b>H<sub>2</sub>O:EtOH</b>	<b>80:20</b>	<b>49 - 59</b>	
<b>A:H<sub>2</sub>O</b>	<b>70:30</b>	<b>60 - 75</b>	<b>59 - 61</b>
			<b>62 - 88</b>
<b>A:MeOH</b>	<b>50:50</b>	<b>76 - 80</b>	
<b>MeOH</b>	<b>100%</b>	<b>81 - 88</b>	

**A = acetona.**



### 3.1.3. Aislamiento y purificación de manitol 15.

De la fracción combinada F3 (0.26g) de la columna original (ver Tabla 2), cristalizó de manera espontánea un sólido blanco aperlado con un punto de fusión = 164-166°C, el cual al ser comparado con un estándar se comprobó que se trataba del polialcohol manitol. La presencia de sacarosa en las aguas residuales se demostró por análisis en cromatografía en capa fina.

## 3.2.-PREPARACION DE DERIVADOS.

### 3.2.1.- Reacción de Acetilación.

Para formar los derivados acetilados, se empleó 1ml de piridina y 1ml de anhídrido acético por cada 100mg de muestra. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó reaccionar por 12 hrs. a temperatura ambiente y al cabo de el tiempo señalado se procesó de manera habitual <sup>36-37</sup>(ver Figura 4).

### 3.2.2. Reacción de Metilación .

Por cada 100mg de muestra a metilar, se utilizarón 20ml de una solución de diazometano preparada con 4ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%, 20ml de éter etílico y 2g de N-nitroso-N-metil-urea. En todos los casos el producto a metilar se disolvió en 10ml de metanol o etanol, dejando reaccionar la mezcla a temperatura ambiente durante 12 hrs. <sup>34,38-39</sup> (ver figura 5).

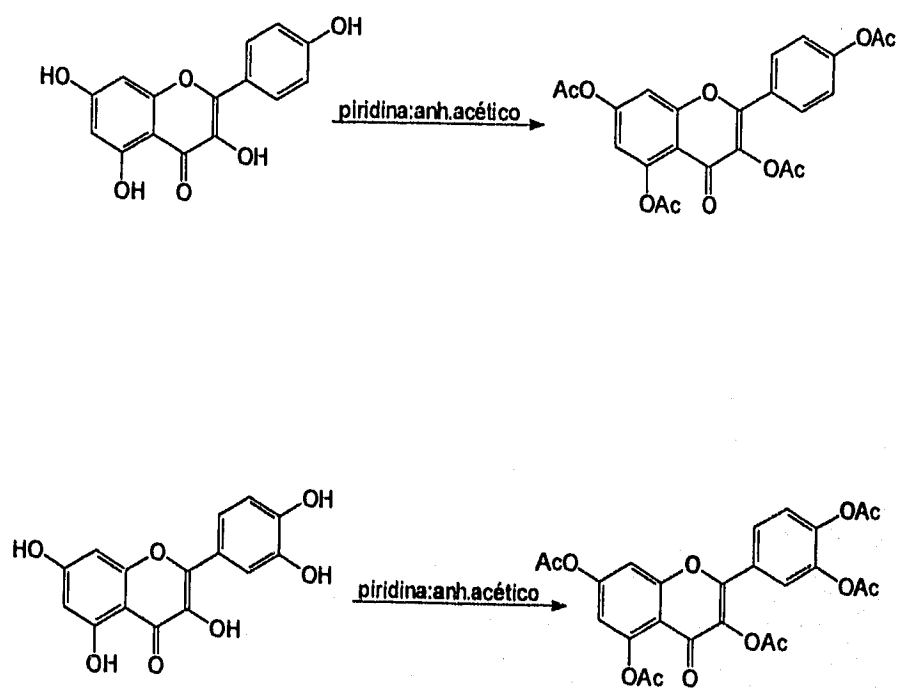


Figura 5.- Reacción de acetilación de camperol y quercetina.

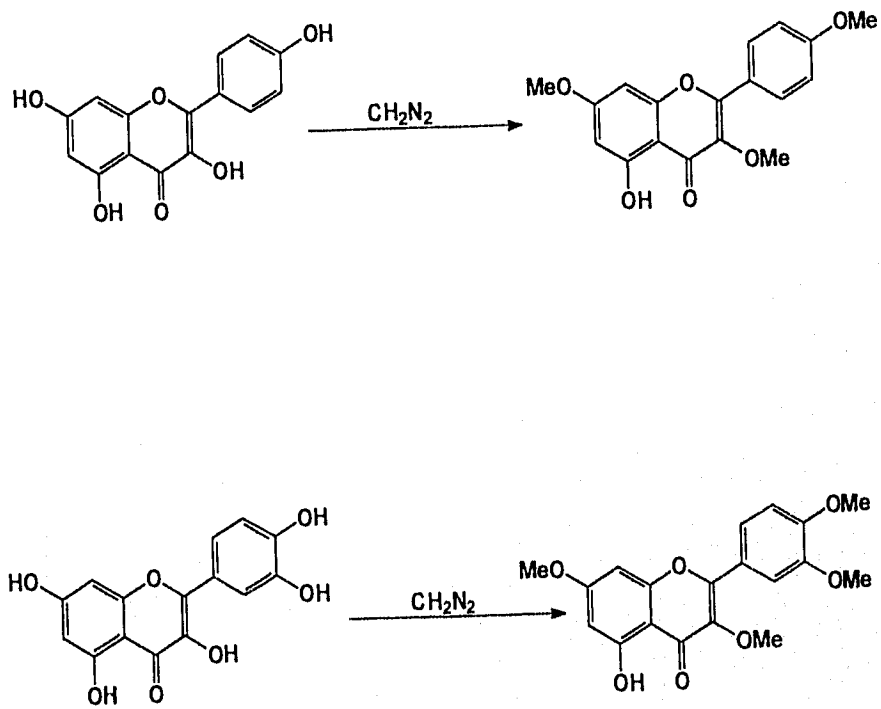


Figura 6.- Reacción de metilación de campherol y quercetina.

#### IV RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio biodirigido del extracto metanólico de la raíz de *Cuphea pinetorum* Benth; usando la prueba de la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, condujo al aislamiento y caracterización de dos flavonoles (camperol y quercetina), dos azúcares (glucosa y sacarosa) y un polialcohol (manitol). El camperol resultó ser el compuesto con mayor actividad contra los trofozoítos *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En el caso de la quercetina solo resultó activo contra *Entamoeba histolytica*. En la prueba de la determinación de toxicidad contra *Artemia salina* ambos flavonoles mostraron actividad moderada. El rendimiento de los compuestos aislados y los resultados de las actividades biológicas se muestran en la Tabla 5. El extracto dió resultado negativo para la presencia de alcaloides.

La caracterización de los dos flavonoles aislados se realizó mediante el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos. La identificación de los azúcares se hizo por cromatografía en capa fina, utilizando reactivos específicos de coloración y estándares de referencia. A continuación se discuten las evidencias que permitieron identificar los constituyentes de *Cuphea pinetorum*.

**Tabla 5.- Rendimiento y resultados de la actividad biológica de los compuestos aislados de *Cuphea pinetorum*.**

Nombre	Cantidad Obtenida (mg)	% en relación al peso seco de la planta	Resultado del Bioensayo		
			Cl <sub>50</sub> (ppm)		DL <sub>50</sub> (ppm)
			<i>Eh</i>	<i>Gi</i>	<i>As</i>
Quercetina	22.6	0.0089	12.75	26.63	16.57
Camperol	15.3	0.0060	7.93	8.73	6.16

*Eh* = Entamoeba histolytica    *Gi* = Giardia lamblia    *As* = Artemia salina

#### 4.1.- IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

##### 4.1.1. Identificación de camperol 3.

El compuesto 3 de fórmula molecular C<sub>15</sub> H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> establecida por espectrometría de masas, se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo oro, soluble en metanol y DMSO. Sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se incluyen en la Tabla 6. El análisis global de los datos de la Tabla 6 permitió establecer que este sólido era el flavonol, camperol 34-35,38-39. El comportamiento cromatográfico en capa fina usando el sistema de elución IV, el reactivo específico B y el espectro de U.V. indicaron en principio que el compuesto 3 era un flavonol 34-39.

El espectro de RMNP en DMSO- $d_6$  (Espectro 1), confirmó que se trataba de un flavonol y en el se observaron las siguientes señales: en  $\delta$  12.6 y 10.1 se observaron dos señales para tres OH de naturaleza fenólica, la primer señal es característica para un hidróxilo fenólico quelatado en la posición 5 del anillo A.

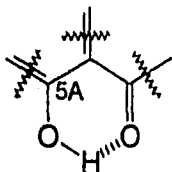


Figura 7.- Hidróxilo fenólico quelatado.

También se observaron cuatro dobletes en  $\delta$  7.98, 6.84, 6.37 y 6.13; las dos señales a campo alto que integran cada una para un protón, se observan como un sistema AB fácilmente asignable a los hidrógenos 8A y 6A del anillo aromático tetrasustituído.

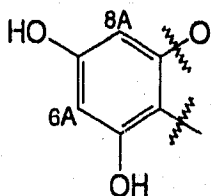


Figura 8.- Anillo aromático tetrasustituído.

Las dos señales restantes se observan como un sistema  $A_2 B_2$  atribuible a los hidrógenos, 2B, 6B, 3B y 5B del anillo B del flavonol.

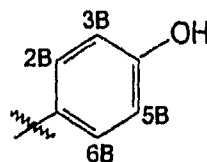


Figura 9.- Anillo disustituído del flavonol.

El espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 2), mostró señales para trece carbonos, la señal a  $\delta$  177.23 se asignó al carbonilo de la  $\gamma$  pirona del anillo C; las señales para los carbonos base de oxígeno 2C, 3C, 5A, 7A, 9A y 4B se observaron a  $\delta$  144.90, 132.95, 161, 164.07, 156.20 y 159.83. Los carbonos restantes se asignaron por comparación con los descritos en la literatura <sup>35,38-39</sup>.

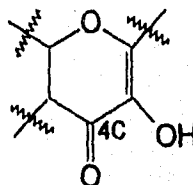


Figura 10.- Anillo aromático C.

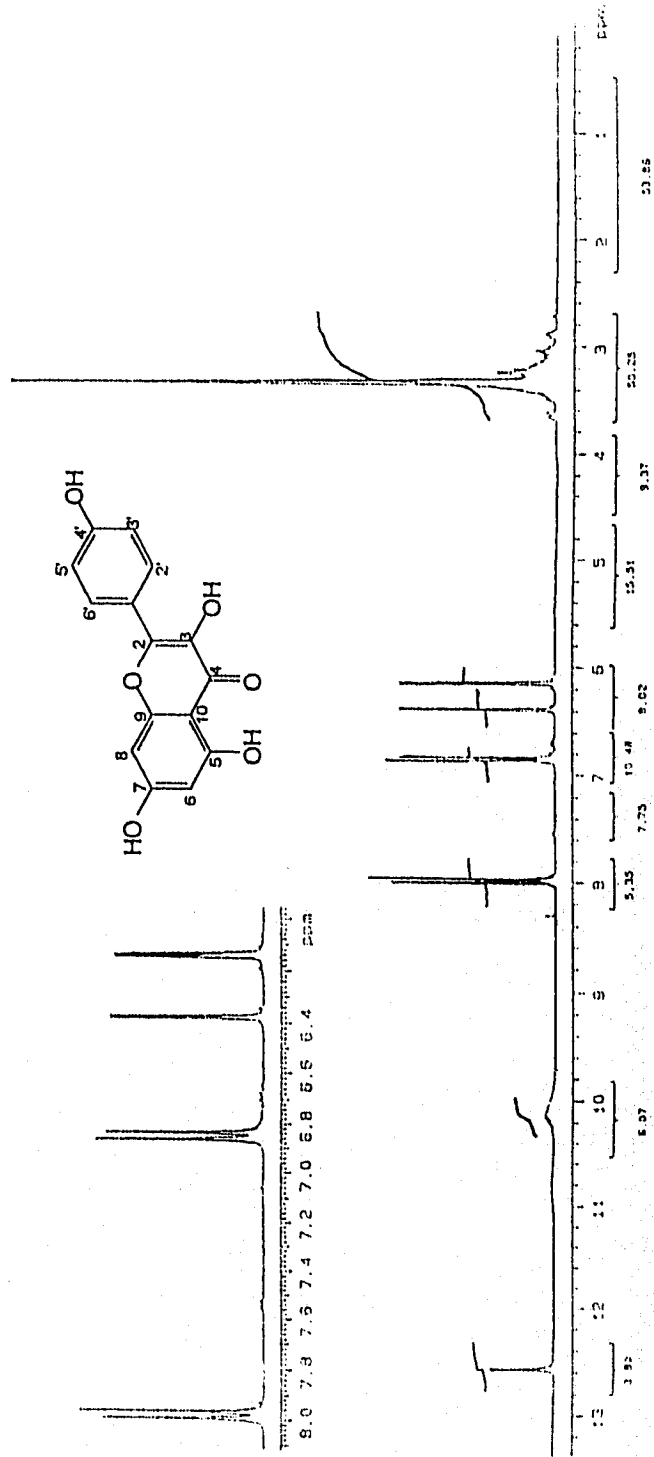
Adicionalmente se preparó el derivado acetilado y el metilado del compuesto 3 y estos se compararon mediante cromatografía en capa fina contra el derivado acetilado y el metilado obtenido de una muestra auténtica de camperol.

Con base a los análisis anteriores la estructura del compuesto 3 se estableció como la del 5,7,4'-trihidroxi-flavonol (camperol), el cual ha sido aislado previamente de diversas fuentes naturales <sup>40-48</sup>.

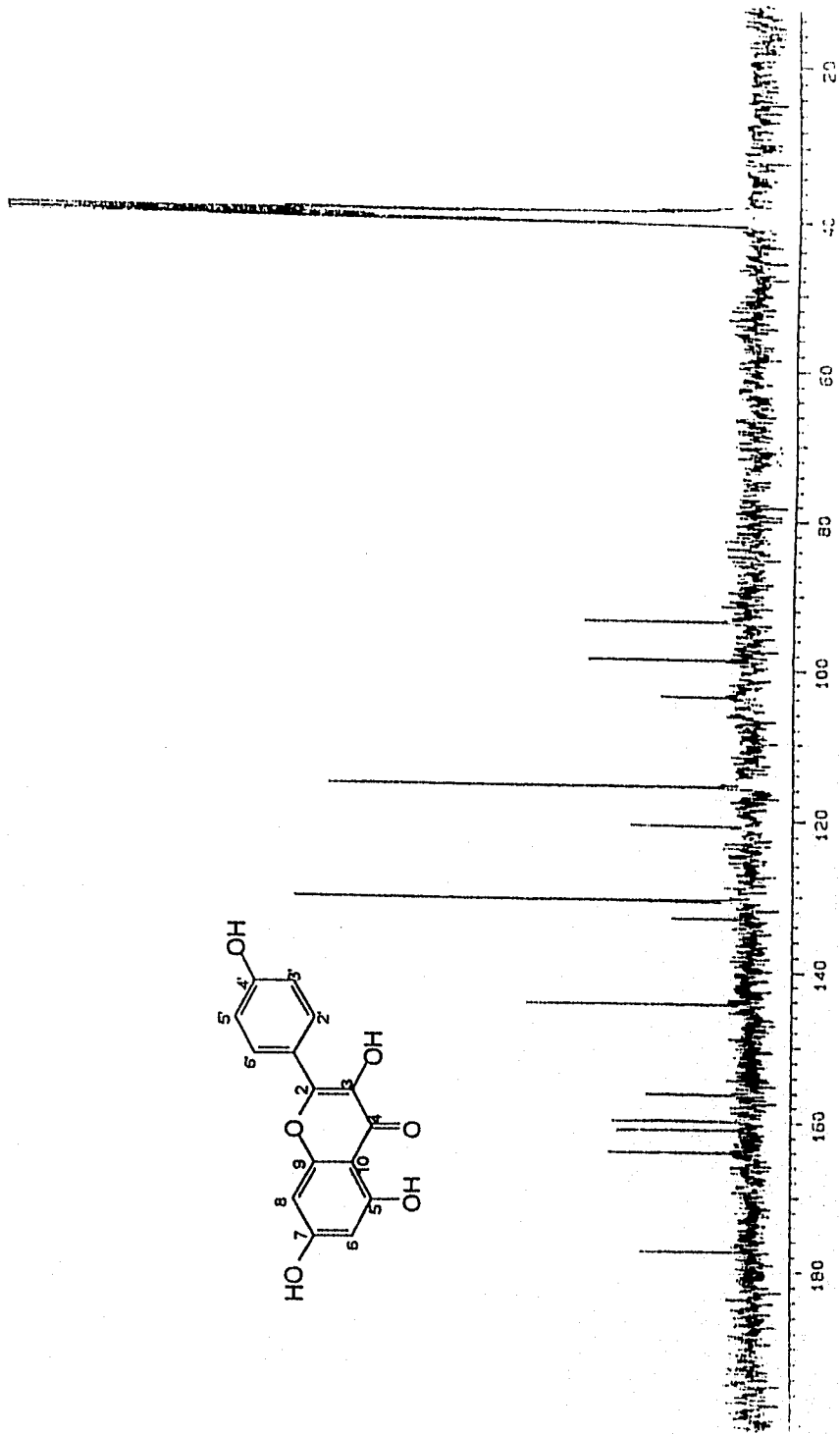
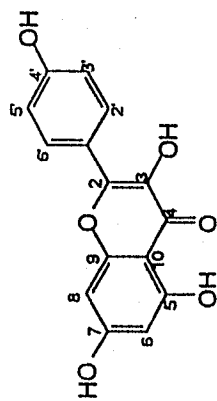


Tabla 6.-Constantes espectroscópicas y espectrométricas de camperol 3.

P. M.	:286.23
P. F.	:276 - 278°C
I. R. $\nu$ KBr (cm <sup>-1</sup> )	:3354, 1658, 1616, 1508, 1308, 1252, 1172, 818 y 640.
EMIE, m/z (%)	:286(100)[M <sup>+</sup> ], 285(36)[M <sup>+</sup> -1], 258(14), 121(44), 69(40), 65(30), 51(21) y 39(17).
RMNP (DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ , 300MHz)	:12.6(1H, s, OH-5A), 10.1(2H, s, OH-7A, OH-4B), 7.98(2H, d, J=9, H-2B, H-6B), 6.84(2H, d, J=9, H-3B, H-5B), 6.37(1H, d, J=2.1, H-8A), 6.13(1H, d, J=2.1, H-6A).
RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ , 300MHz)	:177.23(1C, C-4C), 164.07(1C, C-7A), 161(1C, C-5A), 159.83(1C, C-4 B), 156.20(1C, C-9A), 144.90(1C, C-2C), 132.95(1C, C-3C), 130.65(2C, C-2B, C-6B), 121.05(1C, C-1B), 115.64(2C, C-3B, C-5B), 103.74(1C, C-10A), 98.66(1C, C-6A) y 93.56(1C, C-8A).



Espectro 1.- RMNP de campherol.



Espectro 2.- RMN<sup>13</sup>C de camperol.

#### 4.1.2. Identificación de quercetina 24.

El compuesto 24 de fórmula molecular  $C_{15}H_{10}O_7$  establecida por espectrometría de masas, se obtuvo como un sólido amorfo de color amarillo limón, soluble en metanol y DMSO. Sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se incluyen en la Tabla 7.

El análisis global de los datos de la Tabla 7, permitió establecer que este sólido era el flavonol quercetina <sup>34-35,38-39</sup>. Su espectro de IR presentó máximos de absorción para hidróxilos a  $3404\text{ cm}^{-1}$ , anillo aromático a  $1608$  y a  $1520\text{ cm}^{-1}$ , y para carbonilo de  $\gamma$  - pirona a  $1658\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros de U.V. y de RMN en conjunto con el comportamiento cromatográfico al ser revelados con tricloruro de aluminio, permitieron también establecer que el producto natural era un flavonol.

Su espectro de masas presentó 16 unidades de masa más que el del camperol.

Los espectros de RMNP (Espectro 3) y de  $^{13}\text{C}$  resultaron muy similares a los del camperol. La principal diferencia entre los dos compuestos fué el patrón de sustitución del anillo B, el cual se apreció como un sistema ABX para un anillo aromático trisustituído en  $\delta$  7.69, 7.54 y 6.89. En el espectro COSY (Espectro 4), se confirmó la correlación de estos hidrógenos.

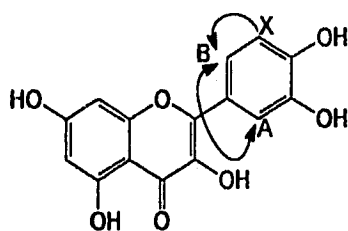


Figura 11.- Correlación ABX del anillo aromático trisustituído.

En RMN $^{13}\text{C}$  (Espectro 5), los carbonos 1B, 2B, 3B, 4B, 5B y 6B del anillo aromático trisustituído aparecen a  $\delta$  121.88, 114.99, 144.99, 147.60, 115.52 y 119.88

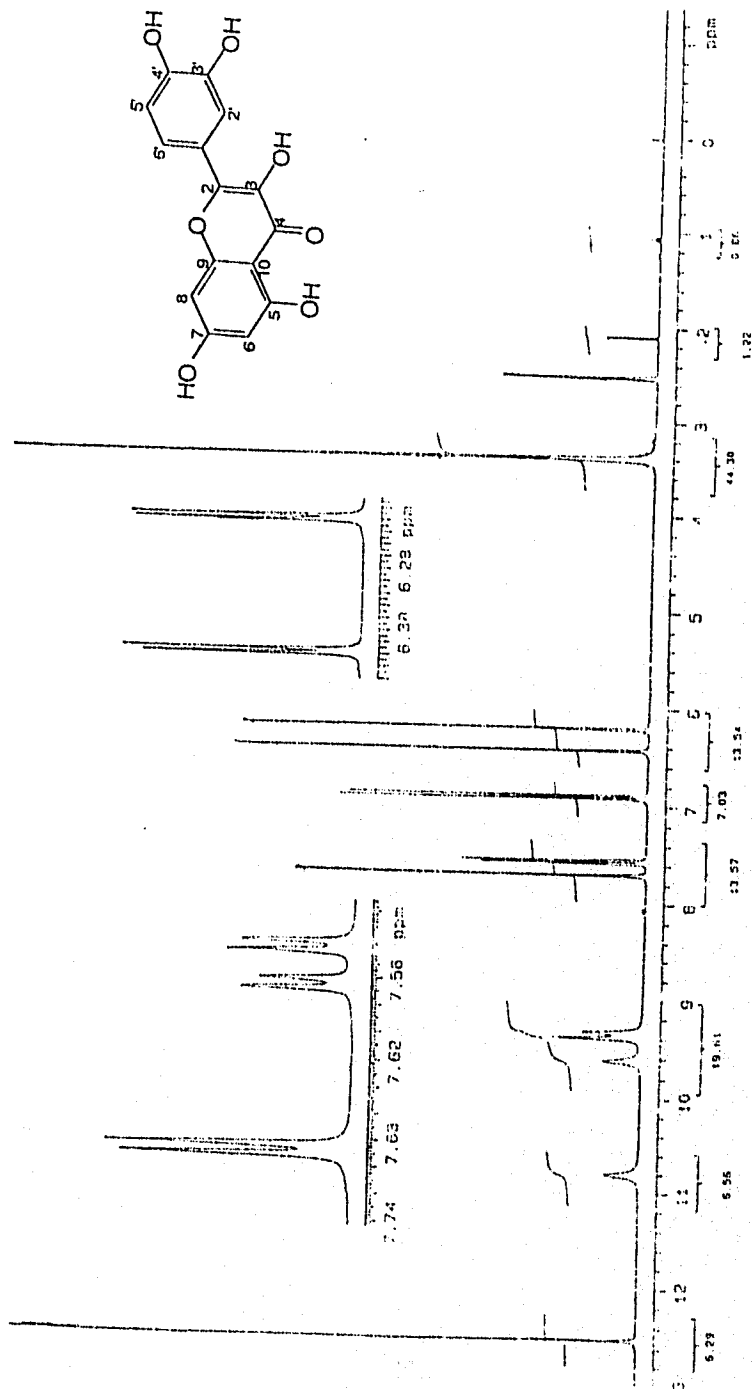
Al igual que en el caso del compuesto 3 también se prepararon los derivados acetilado y el metilado los cuales resultaron idénticos a los obtenidos a partir de una muestra auténtica.

En resumen el análisis anterior permitió establecer la estructura del compuesto 24 como el 5, 7, 3', 4' - tetrahidroxi - flavonol (quercetina) la cual ha sido aislada previamente en el laboratorio <sup>42,48</sup>.

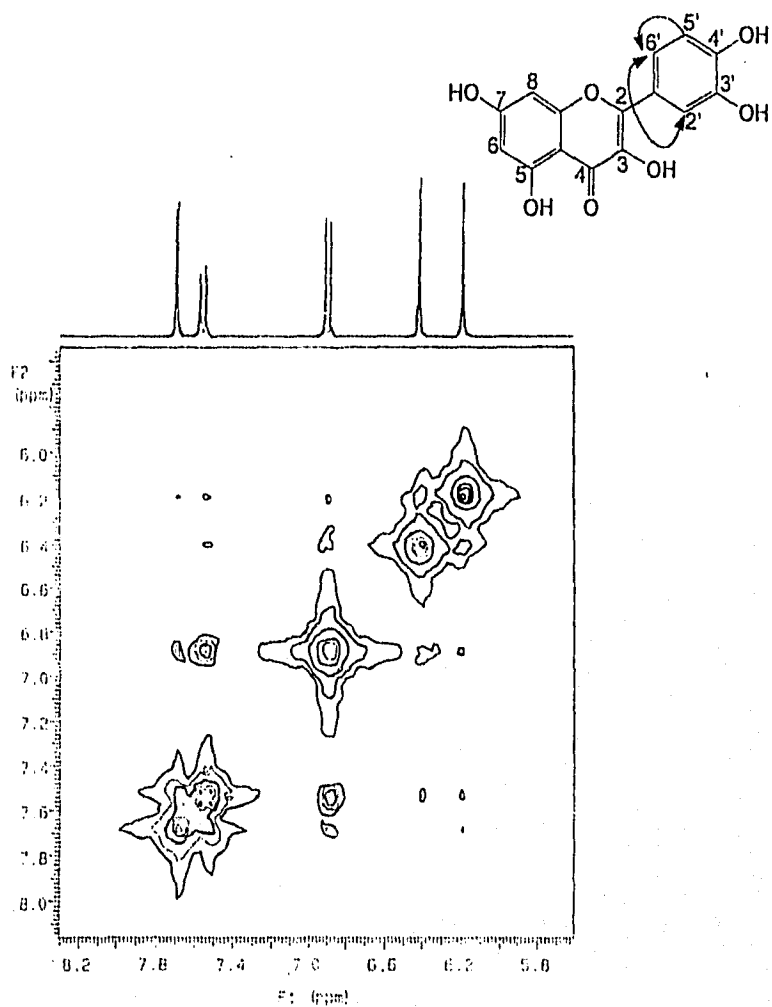
Tabla 7.- Constantes espectroscópicas y espectrométricas de quercetina

24.

P. M.	:302.23
P. F.	:312-314°C
U.V. $\lambda_{\text{MeOH}}$	:258 y 375.
I.R. $\nu_{\text{KBr}}(\text{cm}^{-1})$	:3404,1658,1608,1520,1378,1310,1260,1198,1186, 1010, 824 y 600.
EMIE, m/z (%)	:302(100)[M <sup>+</sup> ], 301(29)[M <sup>+</sup> -1], 137(25), 69(59), 53(28), 44(15).
RMNP (DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ , 300MHz)	:7.69(1H, d, J=2.10, H-2B), 7.54(1H, dd, J=2.1 y 8.4, H-6B), 6.89(1H, d, J=8.4, H-5B), 6.41(1H, d, J=2, H-8A), 6.19(1H, d, J=2, H-6A).
RMN <sup>13</sup> C (DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ , 300MHz)	:175.80(1C, C-4C), 163.77(1C, C-7A), 160.6(1C, C-5A), 156.02 (1C, C-9A), 147.6(1C, C-4B), 146.9(1C, C-2C), 144.99(1C, C-3B), 135.53(1C, C-3C), 121.88(1C, C-1B), 119.88(1C, C-6B), 115.52(1C, C-5B), 114.99(1C, C-2B), 102.94(1C, C-10A), 98.11 (1C, C-6A) y 93.25 (1C, C-8A).



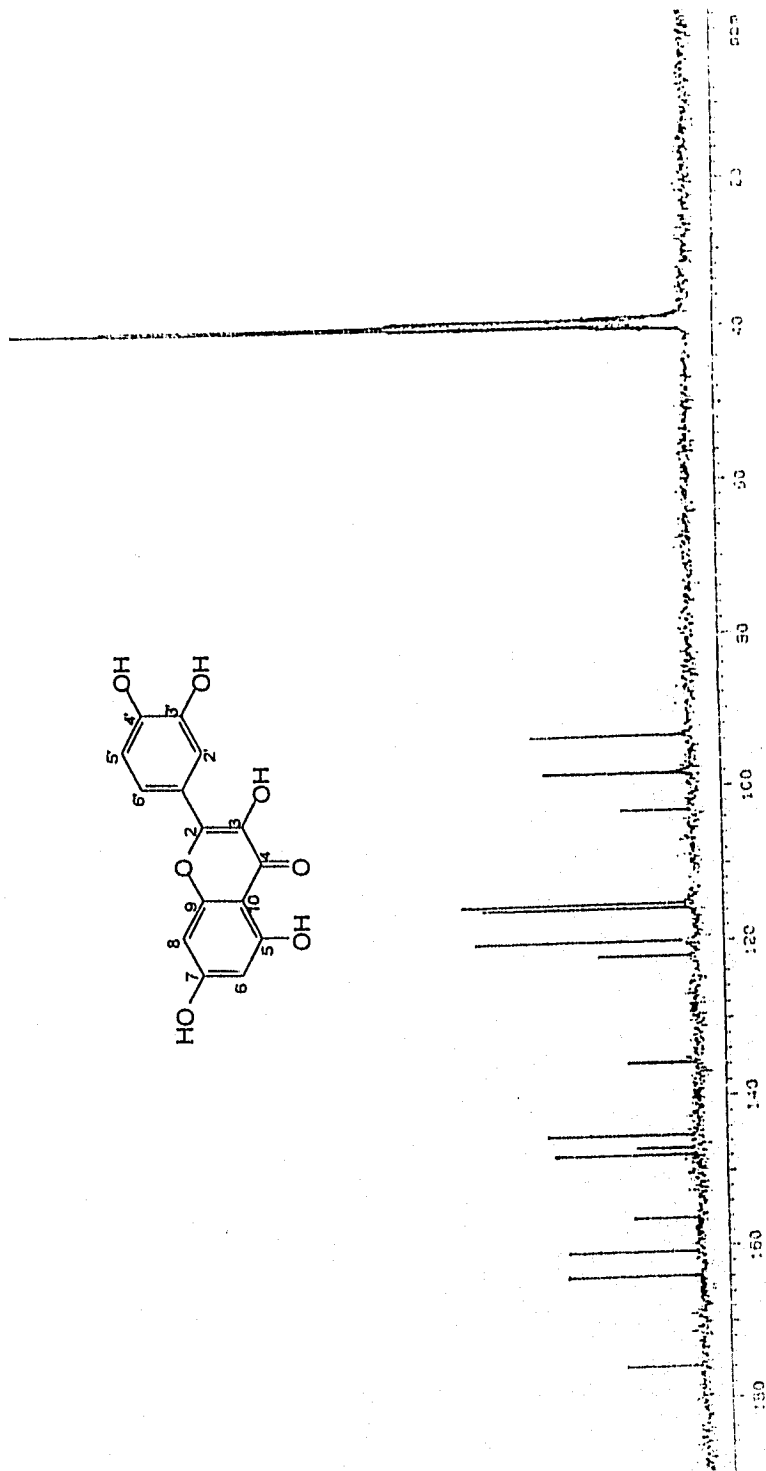
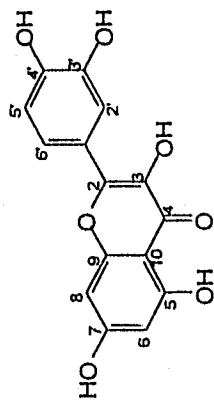
Espectro 3.- RMNP de quercetina.



Espectro 4.- RMNP modalidad COSY de quercetina.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

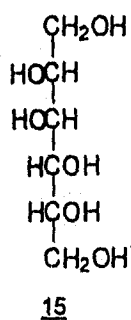
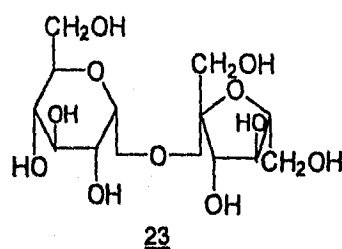
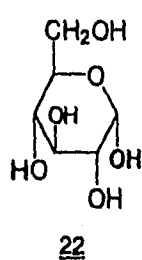




Espectro 5.- RMN $^{13}\text{C}$  de quercetina.

**4.1.3.- Identificación de glucosa 22, sacarosa 23 y manitol 15.**

La identificación de estos compuestos se hizo por cromatografía en capa fina empleado los sistemas de elución III y IV, y el agente revelador específico E; comparando contra estándares.



**Figura 12.-** Compuestos identificados de la fracción combinada 1-3 de la columna II ( 22 y 23 ) y de la fracción combinada F-3 ( 15 ).

## V RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El estudio biodirigido del extracto metanólico de la raíz de *Cuphea pinetorum* permitió la caracterización de cinco compuestos: dos flavonoles (camperol y quercetina), dos azúcares (glucosa y sacarosa) y un polialcohol (manitol). De los dos flavonoles aislados (quercetina y camperol), el camperol resultó ser el responsable de la actividad antiprotozoaria observada en el extracto metanólico original.

El camperol también resulta ser el compuesto más tóxico para *Artemia salina*. La quercetina sólo mostró actividad contra *Entamoeba histolytica*.

Sin intentar establecer una posible relación de estructura-actividad entre los dos flavonoles aislados, se demostró que para las actividades evaluadas en esta investigación, es importante el número de hidróxilos en el anillo B; ya que al disminuir el número de hidróxilos (de dos a uno), se observó un incremento en las actividades ( antilamibiana, anti giardia y toxicidad para la *Artemia salina*).

La metodología empleada permitió obtener compuestos con actividad antiprotozoaria de *Cuphea pinetorum*. Los resultados obtenidos en cuanto a los compuestos obtenidos en este estudio y los aislados en algunas especies de *Cuphea sp* y *Cuphea balsamona* son consistentes.

Los resultados obtenidos en este estudio sustentan en parte los beneficios que se le atribuyen a *Cuphea pinetorum* en el tratamiento de las diarreas con sangre y moco por los pobladores de los altos de Chiapas.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Hamburger, M. y Hostettman, K.; 1991, Bioactivity in plants.- The link between phytochemistry and medicine; *Phytochemistry*, 30(12):3864-3874.
- 2) Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A.S., Suejarto, D.D. y Guo, Z.; 1989, Las plantas medicinales en la terapéutica; *Bol of Sanit Panam*, 107(4):314-329.
- 3) Lozoya, X.; 1993, *Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI*; Secretaría de Salud, edición Conmemorativa, México, 255-270.
- 4) Farnsworth, N. R.; 1990, The role of ethnopharmacology in drug development; *Bioactive compounds from plants*, 154:2-11.
- 5) Balick, M. J.; 1990, Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest; *Bioactive compounds from plants*, 154:22-31.
- 6) Cordell, G. A.; 1993, Pharmacology - news roots for an old science; *Studies in Natural Products Chemistry*, 113:629-675.
- 7) Farnsworth, N. R.; 1984, How can the well edry when it is filled with water; *Economic Botay*, 38(1):1-13.
- 8) Zamora - Martínez. M.C. y Nieto de Pascual, C.; 1992, Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, México; *Journal of Ethnopharmacology*, 35:229-257.
- 9) Phillipson, D.J.; 1995, A matter of some sensitivity; *Phytochemistry*, 38(6):319-1343.
- 10) Marston, A, y Hostettman, K.; 1991, Modern separation methods; *Natural Product Reports*, 391-413.

- 11) Mata, R.; 1995, Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine, En: K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford, (eds.); *Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry*, Plenum Press, New York, 27: 41-64.
- 12) Cox, P.A.; 1990, Ethnopharmacology and the search for new drugs; *Bioactive compounds from plants*, 154:22-31
- 13) Cordell, G.A.; 1995, Changing strategies in natural products chemistry; *Phytochemistry*, 40(6)1585-1612.
- 14) Cronquist, A.; 1981, *An Integrated system of classification of flowering plants*; The New York Botanical Garden, Columbia University Press, New York, 629-632.
- 15) Breedlove, D. E.; 1986, *Listados Florísticos de México*; cap I - X, Instituto de Biología, UNAM, México.
- 16) Ejemplares de Herbario; Instituto de Biología, UNAM.
- 17) Breedlove, D. E.; 1986, *Listados Florísticos de México*, Flora de Chiapas y Valle de Tehuacán - Culcatlán; Instituto de Biología, UNAM, México.
- 18) Santíz, C. y Jiménez, J.C.; 1987, Muestras de Herbario; 7653, 7746, 8087, 8163 y 8537, Herbario del IMSS.
- 19) Graham, A. y Graham, S.A.; 1967, Pollen morphology and taxonomy of *Cuphea* (Ly); *Rev. Paleobot. Palynol*, 3:155-162.
- 20) Tapia - Contreras, A., Cedillo - Rivera, R., Calzada, F., Meckes, M., Muñoz, O.; Sep 1994, *Actividad antiinflamatoria in vitro de extractos de plantas medicinales*; III Reunión Nacional de Investigación Médica, IMSS, Oaxtepec, Morelos, 396.

- 21) Darnley R.; 1974, *Chemotaxonomy of Flowering Plants*; Mc Gill - Queen's, University Press, Montreal and London, 1:422,500,501,536 y 542.
- 22) Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F. y Salatino, A.; 1995, Flavonoids of species of *Cuphea* of Brazil; *Biochem. Syst. Ecol.*, Sao Paulo, Brazil, 23(1)99 - 103.(C.A.: 122:235266t).
- 23) Lin, S.; 1976, Phytochemical study on *Cuphea balsamona*; *Kauhsiung Med Coll.*, Taiwan, 2:45-49,(CA: 87:81231x, 1977).
- 24) Litchfield, C., Farguhar, M. y Reiger, R.; 1964, Analysis of triglicerides by consecutive chromatography techniques; *J. Am.Oil. Chemists' Soc.*, 41(9)588-592.(C.A.:61:10986a).
- 25) Roath, J.W.W., Widriechner, M.P. y Kleiman, R.; 1992, Morphological and agronomic variability in *C. viscosissima*; *Ind. Crops Prod.*, 1(1)5-10.(C.A.:118:120940h).
- 26) Graham, S.A. y Kleiman, R.; 1992, Composition of seed oils in some Latin American *C.* (Lytraceae); *Ind. Crops. Prod.*, 1(1)31-34.(C.A.:118:120941j).
- 27) González, A.G., Valencia, E., Siverio, E.T., Bermejo, B.J. y Gupta, M.P.; 1994, Chemical Components of *Cuphea* species Carthagenol: a new triterpene *C. carthagenensis*; *Planta Médica*, La Laguna, Spain, 60(6)592-593.
- 28) Cedillo - Rivera, R. y Muñoz, O.; 1992, *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemoterapeutic agents; *J. Med. Microbiol.*, 37:221-224.
- 29) Chávez, B., Espinoza-Cantellano, M., Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A. y Martínez-Palomo, A.; 1992, Effects of albendazole on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* trophozoites; *Archives of Medical Research*, 23(2)63-67.

- 30) Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A. y Muñoz, O.; 1992, A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*; *Archives of Medical Research*, 23(2)59-61.
- 31) Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y Mc Laughlin, J.L.; 1982, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents; *Planta Médica*, 45:31-34,
- 32) Anderson, J.E., Goetz, C.M., Mc Laughlin, J.L. y Suffness, M.; 1991, A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens; *Phytochemical Analysis*, 2:107-111.
- 33) Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P. y Phillipson, J.D.; 1992, A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp); *Planta Médica*, 59:250-252.
- 34) Stahl, E.; 1969, Thin - Layer Chromatography, *A Laboratory Handbook*; segunda edición, Springer - Veria, New York, 861-874.
- 35) Markham, K.R.; 1982, *Techniques of flavonoid identification*; Academic Press, London, New York, 36 - 51, 63 y 65.
- 36) Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M.; 1984, Plant drug analysis, *A Thin Layer Chromatography Atlas*; Springer - Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokio, 301,304.
- 37) Shriner, R.L., Fuson, R.C. y Cutin, A.; 1980, *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*; Limusa, México,
- 38) Markham, K.R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H. y Mabry, T.J.; 1978, Carbon- 13 NMR Studies of flavonoids- III; *Tetrahedron*, 34: 1389-1397.
- 39) Markham, K.R. y Ternai, B.; 1976, <sup>13</sup>C NMR of flavonoids - II; *Tetrahedron*, 32:2607-2612.

- 40)Keun, Y.J., Chul, J.D. y Kun H.S.; 1993, Kaempferol 3-O-[6"-O-(3-hidroxy-3-methylglutaronyl)glucoside] from leaves of *Polygala japonica*; *Phytochemistry*, 34(4)196-197.
- 41)Hasler, A., Gian-Andrea, G., Meier, B. y Sticher, O.; 1992, Complex flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba*; *Phytochemistry*, 31(4)1391-1394.
- 42)Calzada, F., López, R., Meckes, M. y Cedillo-Rivera, R.; 1995, Flavonoids of the aereal parts of *Hellantemum glomeratum*; *International Journal of Pharmacognosy*,33(4)351-352.
- 43)Merfort, I.;1988,Acetylated and other flavonoid glycosides from *Arnica chamissonis*; *Phytochemistry*, 27(10)3281-3284.
- 44)Ebert, M., Merfort, I. y Willuhn, G.; 1988, Flavonoid distribution in *Arnica* subgenera *montana* and *austromontana*; *Phytochemistry*, 27(12)3849-3851.
- 45)Merfort, I. y Wendisch, D.; 1992, New flavonoid glycosides from *Arnicae* flos DAB 9; *Planta Médica*, 58(4)355-357.
- 46)Bennini, B., Chulia, A.J., Kaouadji, M. y Thomasson;1992, Flavonoid glycosides from *Erca cinerea*; *Phytochemistry*, 31(7)2483-2486.
- 47)Bashir, A.K., Abdalla, A.A., Wasfi, Hassan,E.S., Amiri, M.H. y Crabb,T.A.; 1994,Flavonoids of *Limonium axillare*; *International Journal of Pharmacognosy*, 32(4)366-372.
- 47)Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A. y Alanís, A.; 1995, Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los flavonoides aislados de las partes aéreas de *Hellantemum glomeratum* Lag.; *XV Jornadas de Investigación*, V-32.