



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO QUIMICO Y EVALUACION BIOLÓGICA DE *Cirsium jorullense*

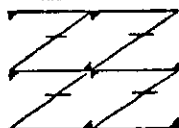
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

LOURDES ALICIA BUSTAMANTE GARCÍA

DIRECTOR: M. EN C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1999

277952



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

BUSTAMANTE GARCIA LOURDES ALICIA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Estudio químico y evaluación biológica de Cirsium jorullense.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE M. en C. MANUEL FAUSTINO RICO BERNAL

VOCAL M. en C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

SECRETARIO Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN

SUPLENTE Q. MA. GUADALUPE MIRANDA JIMENO

SUPLENTE Q. SAMUEL SOSOL MENDEZ

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a 23 de Marzo de 1999.

Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

INDICE	PAGINA
INDICE	i
NOTACIONES EMPLEADAS	vi
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	3
II. FUNDAMENTACION DEL TEMA	6
II.1 Generalidades de la familia Compositae	7
II.2 Generalidades del género <i>Cirsium</i>	9
II.2.1 Generalidades botánicas del género <i>Cirsium</i>	9
II.2.2 Generalidades químicas del género <i>Cirsium</i>	9
II.2.3 Ejemplos del uso de diferentes especies de <i>Cirsium</i> para diversos padecimientos en México	20
II.3 Características de los flavonoides	21
II.3.1 Generalidades de los flavonoides	21
II.3.2 Propiedades químicas de los flavonoides	26
II.3.3 Propiedades biológicas de los flavonoides	26
II.4 Prueba de toxicidad frente a <i>Artemia salina</i> , para calcular -CL ₅₀ -	28
II.5 Inflamación o respuesta inflamatoria	29
II.5.1 Etapas básicas de la respuesta inflamatoria	30
II.5.2 Evaluación de las propiedades antiinflamatorias de metabolitos secundarios aislados de la familia de las Compuestas	32

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
IV. OBJETIVOS	38
V. HIPOTESIS	40
VI. MATERIAL	42
VII. METODOLOGIA	47
VII.1 Obtención de los extractos hexánico, de acetato de etilo y etanólico de parte aérea de <i>Cirsium jorullense</i>	55
VII.2 Obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico de flores de <i>Cirsium jorullense</i>	56
VII.3 Purificación de la mezcla de sólidos obtenidos por extracción con acetato de etilo de parte aérea (SOLIDO A)	57
VII.4 Purificación de la mezcla de sólidos obtenidos por extracción con etanol de parte aérea (SOLIDO B)	57
VII.5 Reacción de acetilación de la mezcla de sólidos obtenidos de la extracción con EtOH tanto de parte aérea como de flores (SOLIDOS B y C)	58
VII.6 Reacción de metilación de la mezcla de sólidos (SOLIDO C), obtenido por extracción con EtOH de flores	59
VII.7 Reacción de hidrólisis ácida de la mezcla de sólidos obtenidos de la extracción etanólica de parte aérea y flores (SOLIDO B y C)	60

VII.8	Prueba biológica de toxicidad de los extractos crudos frente <i>Artemia salina</i>	65
VII.9	Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos crudos de las partes aéreas y flores de <i>Cirsium jorullense</i>	66
VIII.	RESULTADOS	67
VIII.1	Resultados de reacciones químicas realizadas a la mezcla (SOLIDO B), obtenido de la extracción con EtOH de parte aérea	68
VIII.2	Resultados de reacciones químicas realizadas a la mezcla (SOLIDO C), obtenido de la extracción con EtOH de flores	68
VIII.3	Resultados de la prueba biológica con <i>Artemia salina</i> -CL ₅₀ -	69
VIII.4	Resultados de los extractos de <i>Cirsium jorullense</i> a la dosis de 0.5mg/ oreja en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón	70
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	71
IX.1	Purificación de los sólidos A, B y C obtenidos de la extracción con AcOEt y EtOH mediante el sistema de extracción con soxhlet	72

IX.2 Reacción de acetilación de los sólidos impuros B y C (mezclas), obtenidos de la extracción con EtOH de parte aérea y flores	73
IX.3 Reacción de hidrólisis ácida de los sólidos impuros B y C (mezclas), obtenidos de la extracción con EtOH de parte aérea y flores	73
IX.4 Obtención de la Eupatulina (3', 4', 6-Trimetoxi-5-7-dihydroxiflavona (III))	74
IX.5 Obtención de la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hydroxiflavona (I)	82
IX.6 Obtención de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hydroxiflavona (IV)	83
IX.7 Obtención de la Hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-trihydroxiflavona (II))	85
IX.8 Reacción de metilación de la mezcla (SOLIDO C), obtenido de la extracción con EtOH de flores	87

IX.9 Prueba de toxicidad de los extractos obtenidos frente <i>Artemia salina</i>	87
IX.10 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos crudos obtenidos	88
X. CONCLUSIONES	89
XI ANEXO. ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS	91
XII BIBLIOGRAFIA	108

NOTACIONES EMPLEADAS

OGlc	Enlace oxígeno-glicósido
Rha	Ramnosa
C-C	Enlace carbono-carbono
NaOH	Hidróxido de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
EtOH	Etanol
MeOH	Metanol
FeCl ₃	Tricloruro de hierro
AcOEt	Acetato de etilo
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ N ₂	Diazometano
Ac ₂ O	Anhidrido acético
Py	Piridina
HCl	Acido clorhídrico
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
v/v	unidades de volumen/volumen
g	gramos
m	masa
μl	microlitros
-CL ₅₀ -	Concentración letal media de toxicidad
<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
Ext. S-L	Extracción sólido-líquido
TEMP. AMB.	Temperatura ambiente
P.A.	Pruebas antiinflamatorias
Δ	Calentamiento
CCV	Cromatografía en columna a vacío

CCF	Cromatografía en capa fina
pf.	punto de fusión
α	axial
ec	ecuatorial
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
EM	Espectroscopía de masas
IE	Impacto electrónico
RMN- ¹ H	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ¹³ C	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
δ	desplazamiento químico
J	constante de acoplamiento
$\nu_{\text{máx}}$	Número de onda máxima
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
COSY	Correlación espectroscópica Bidimensional
M ⁺	Ión molecular
d	doblete
dd	doble de doble
t	tripleto
s	señal simple
ppm	partes por millón
M/z	relación masa/carga
NO	noroeste

RESUMEN

En el presente trabajo se dan a conocer los estudios químicos y evaluación biológica preliminar de *Cirsium jorullense*, especie vegetal de origen mexicano, de la cual no existen estudios químicos y biológicos previos que convaliden su uso popular.

El tratamiento químico consistió en obtener extractos crudos tanto de parte aérea como de flores de la planta, empleando para ello disolventes de diferente polaridad (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y etanol), y purificación e identificación de los sólidos obtenidos de la extracción con acetato de etilo y etanol de la parte aérea y de los sólidos obtenidos del extracto etanólico de flores, obteniéndose a la hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-Trihidroxiflavona, II), eupatulina (3', 4', 6-Trimetoxi-5, 7-dihidroxiflavona, III) y 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxiflavona (IV). Así mismo se identificó a la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxiflavona (I), como resultado de la reacción química de metilación realizada a la eupatulina.

Se realizaron dos pruebas para la evaluación biológica de los extractos crudos obtenidos tanto de parte aérea como de flores:

- Prueba de evaluación de toxicidad letal media -CL₅₀-, frente *Artemia salina* y
- Prueba de actividad antiinflamatoria en oreja de ratón.

Los resultados obtenidos con *A. salina* no fueron reproducibles y los obtenidos de evaluar la actividad antiinflamatoria permitió determinar que los extractos de acetato de etilo de parte aérea (69.60 %) y el extracto hexánico de flores (25.64 %), fueron los que presentaron mayor porcentaje de inhibición a la inflamación.

I. INTRODUCCION

México ocupa un lugar privilegiado en el panorama mundial de la diversidad biológica. Con una superficie de apenas 1.5% del área total de la masa continental, en su territorio se encuentran casi todos los biomas que existen en el planeta y en él viven cerca del 10% de las especies de plantas y animales terrestres que se conocen actualmente.

Un aspecto muy importante que forma parte de la gran riqueza biológica con la que cuenta nuestro país, es la del conocimiento íntimo de estos recursos que aún conservan la mayor parte de los grupos indígenas. Basta mencionar que la herbolaria medicinal de México es una de las dos o tres más ricas del mundo, al igual que el uso de las plantas para fines alimenticios.

A pesar de esta riqueza biológica y de este enorme acervo cultural, existe relativamente poca información científica acerca del empleo, composición química, ecología, etnobiología y evaluaciones biológicas de la mayoría de las especies empleadas en la medicina tradicional en México. El empleo de tales plantas es eminentemente empírico y por lo tanto, existen muchas variables que influyen en la eficiencia de las preparaciones que de ellas se hacen. Es importante señalar que la mayoría de los prototipos farmacéuticos son sustancias de origen natural, principalmente vegetal, por lo que la investigación, la búsqueda y caracterización de los constituyentes químicos bioactivos de la flora medicinal, puede cristalizar en el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos que superen en eficiencia a los ya conocidos, respecto a su toxicidad, resistencia o mecanismo de acción. Este hecho justifica la importancia de generar conocimientos — botánicos, etnobotánicos, químicos, ecológicos, farmacológicos, entre otros — sobre los recursos vegetales con que cuenta nuestro país, ya que esto permitirá valorar y utilizar racionalmente dicho recurso vegetal.

Por otro lado, la situación precaria en la economía del país y el cambio en las políticas han deteriorado, en poco más de una década, la calidad de vida de la población y ha incrementado sus necesidades de salud. Simultáneamente, los servicios han recibido un

menor financiamiento y apoyo, deteriorándose y disminuyendo su capacidad de respuesta a las demandas ciudadanas. Cabe señalar que dicha situación se agrava con la población indígena y rural, los cuales no pueden pagar servicios privados de salud.

Entre los grupos marginales de las ciudades y las zonas rurales, el sistema de la medicina tradicional y casera junto con la automedicación constituyen maneras viables y vigentes de proporcionar salud y bienestar.

Todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y una gran mayoría, desarrollados y en desarrollo, siguen haciendo uso de ellas actualmente. En las últimas dos décadas se ha producido un enorme cambio en las estrategias y políticas, tanto de los gobiernos, como de los ministerios y los organismos multilaterales encargados de atender la salud. Los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente y comienzan a establecerse programas y proyectos para la investigación, aplicación e industrialización de los productos.

Los datos indican que la medicina tradicional y las plantas medicinales serán de mayor importancia en los años venideros y se realizarán esfuerzos inusitados a fin de siglo, para llevar a cabo su complementación y articulación, dentro de los sistemas nacionales de salud, en decenas de países. Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina tradicional indígena. Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

II.1 Generalidades de la familia Compositae

Las Compuestas es una de las familias más numerosas del grupo de las fanerógamas. Está integrada por alrededor de 1000 géneros y 20 000 especies; así como incontables variedades, formas y cultivares, muchas de las cuales son de gran importancia desde el punto de vista alimenticio, farmacéutico e industrial. Sistemáticamente a la familia *Compositae* se le ha dividido en tres grupos: Lingulifloras, Labialifloras y Tubulifloras, las cuales a su vez se han subdividido en aproximadamente 14 tribus [1].

La familia *Compositae*, la cual es la más vasta dentro de las fanerógamas, se encuentra más diversificada y mejor representada en el norte y centro de la República Mexicana, esto se debe principalmente a factores ecológicos, pues el clima húmedo y caliente es el menos favorable para este grupo de plantas, que alcanzan su máxima representación en sitios secos y en lugares más frescos de las regiones montañosas. La familia de las Compuestas está constituida por hierbas, arbustos y árboles, con las hojas alternadas y opuestas, simples o divididas en forma diversa, sin estipulas. Las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, actinomorfas o cigomorfas, con cáliz ausente o sustituido por el papus o vilano que sirve para la diseminación de los frutos. Las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capítulos, éstas poseen un involucre formado de brácteas, en receptáculo plano, cóncavo, convexo o globoso sobre el que se encuentran implantadas las flores, protegidas por brácteas, llamadas páleas. Las cabezuelas que tienen flores del mismo sexo se llaman homógamas, si son de sexo diferente se llaman heterógamas [2- 4], algunos ejemplos de especies que pertenecen a esta familia se dan en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos representativos de la familia Compositae [1, 5-6]

<i>Género</i>	<i>ESPECIE</i>	<i>NOMBRE COMÚN</i>	<i>USOS</i>
<i>Lactuga</i>	<i>sativa</i>	lechuga	alimenticio
<i>Artemisia</i>	<i>absinthium</i>	ajenojo	inflamación del hígado y dolor de estómago
<i>Heterotheca</i>	<i>inuloides</i>	árnica	tratamiento de heridas e inflamaciones internas y externas
<i>Taraxacum</i>	<i>officinale</i>	diente de león	tratamiento de enfermedades relacionadas con el hígado
<i>Tagetes</i>	<i>erecta</i>	cempoalxochitl	tratamiento del susto o espanto
<i>Tagetes</i>	<i>lucida</i>	pericón	tratamiento del susto o espanto
<i>Matricaria</i>	<i>recutita</i>	manzanilla	tratamiento de la diarrea, dolor de estómago y empacho
<i>Gnaphalium</i>	<i>sp</i>	gordolobo	se emplea para el tratamiento de afecciones de las vías respiratorias
<i>Montanoa</i>	<i>tomentosa</i>	zoapatle	para favorecer el parto
<i>Calea</i>	<i>zacatechichi</i>	zacatechichi	tratamiento de cólicos abdominales, apéndice
<i>Helianthus</i>	<i>annus</i>	girasol	ornamento
<i>Dahlia</i>	<i>variabilis</i>	dalia	ornamento

II.2 Generalidades del género *Cirsium*

II.2.1. Generalidades botánicas del género *Cirsium*

El género *Cirsium* pertenece a la tribu Cynareae (Cináreas), las cuales son plantas espinosas, brácteas involucradas terminadas en espinas, estilos provistos de una coronita de pelos por debajo del punto de bifurcación.

Cirsium jorullense es conocida comúnmente como "cardo", es una hierba erecta de hojas oblongas, de 6-9 cm de largo, lobuladodentadas, espinosas en el margen con cabezuelas agrupadas en el extremo de las ramas, las cuales llegan a medir unos 2 cm y presentan flores violáceas [2].

II.2.2. Generalidades químicas del género *Cirsium*

A partir del género *Cirsium* se han aislado diversos metabolitos secundarios como puede apreciarse en la tabla 2 Entre ellos se encuentran los flavonoides, poliacetilenos, poliolefinas y en menor grado alcaloides, sesquiterpenos y saponinas [7-19].

Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados del género *Cirsium*

Nombre de la especie	COMPUESTOS QUÍMICOS	Referencia
<i>Cirsium chlorolepis</i>	5-Hidroximetil-2-furancarboxaldehído (1)* 5-Metoximetil-2-furancarboxaldehído (2) Cirsiumaldehído (3) Cirsiumósido (5-hidroximetil-2-metoxifurilalcohol-O-β-D-pirano glucósido) (4)	[7]

* ESTRUCTURA QUÍMICA

NOMBRE CIENTÍFICO	COMPUESTOS QUÍMICOS	REF.
<i>Cirsium japonicum</i>	8,9, 10-Trihidroxi-heptadeca-1-en-11,13-diino (5)	[8]
	Dihidroaplotaxano (6)	[9]
	Aplotaxano (7)	
	Tetrahidroaplotaxano (8)	
	Hexahidroaplotaxano (9)	
	1-Pentadeceno (10)	
	Caryophylleno (11)	
	Thujopseno (12)	
	Cirineol A (13)	[10]
	Cirineol B (14)	
	Cis-8,9-epoxi-heptadeca-1-en-11,13-diin-10-ol (15)	
	Cirineol C (16)	
	4'-Glucósido de la cirsimarina (17)	[11]
	7-Rutinósido de la acacetina (18)	
<i>Cirsium hypoleucum</i>	Epóxido del aplotaxano-11,12-epoxiheptadeca-1,8,14-trieno (19)	[12]
	Pentaineno (20)	
	1,11-tridecadien-3,5,7,9-tetraeno (21)	
	Furanosquiterpeno (22)	

Tabla 2. Continuación

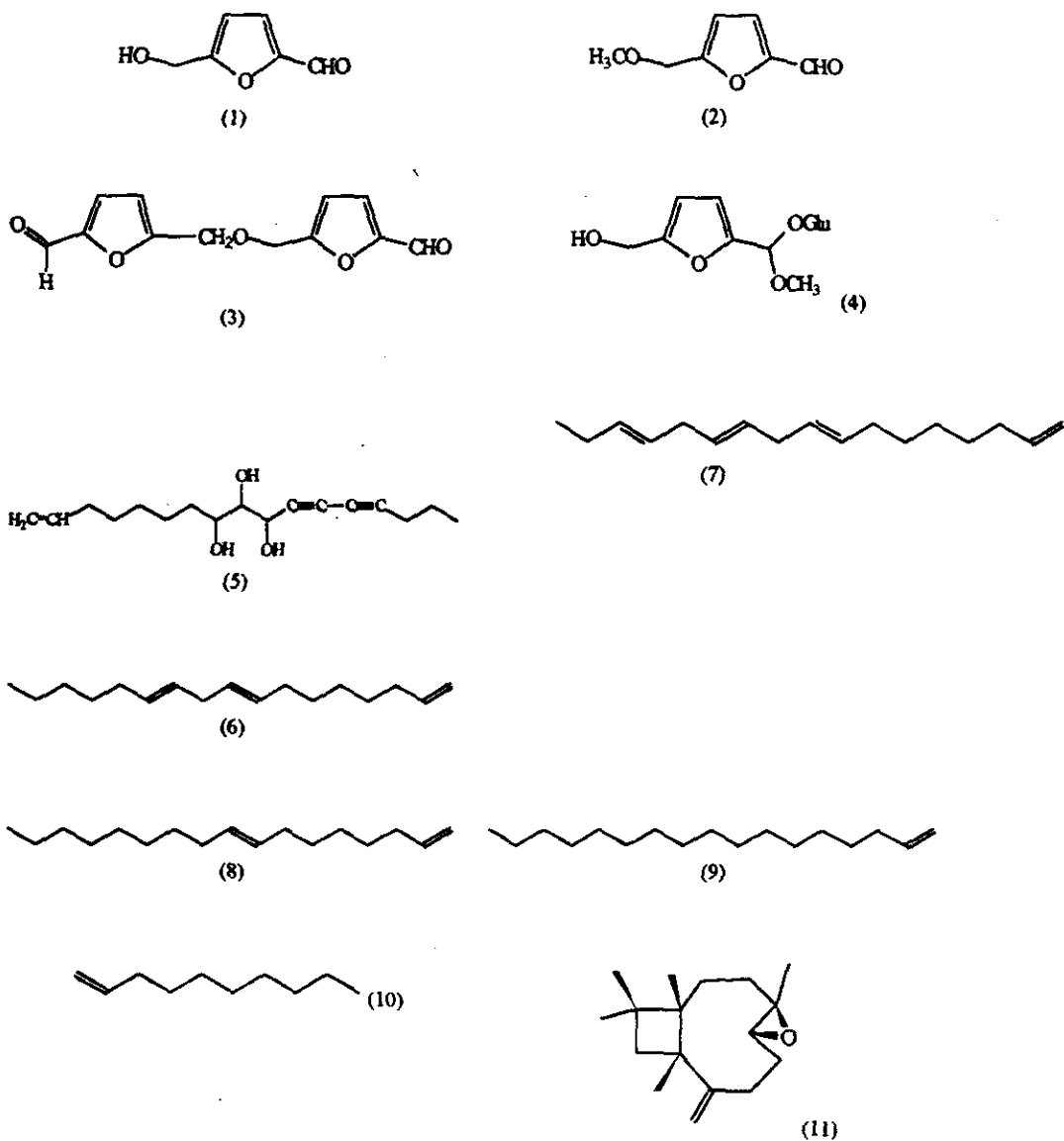
NOMBRE CIENTIFICO	COMPUESTOS QUIMICOS	REF.
<i>Cirsium canum</i>	Acetato de Lupeol (23) Acetato de taraxasterilo amida (24)	
<i>Cirsium carolinium</i>	Guayanolides (25) Flavonas (26 a- c)	
<i>Cirsium helenioides</i>	8,9-Diacetoxi-heptadeca-1,11,14-trieno (27) 8-Acetoxi-9-hidroxi-heptadeca-1,11,14-trieno (28) 9-Acetoxi-8-hidroxi-heptadeca-1,11,14-trieno (29) 8,9-Dihidroxi-heptadeca-1, 11, 14-trieno (30) 8,9-Epoxi-heptadeca-1, 11, 14-trieno (31) Dihidroaplotaxano (32) Tetrahidroaplotaxano (33) Poliacetilenos (34 a-d)	[13]
<i>Cirsium nipponicum</i> (var. <i>Shikokianum</i>)	9-Acetoxi-10-hidroxi-heptadeca-1,11,14-trieno (35) 9-Acetoxi-8-hidroxi-heptadeca-1, 11, 14-trieno (36) 9,10-Dihidroxi-heptadeca-1, 11,14-trieno (37) Eschikokiol A (38)	[14]

Tabla 2. Continuación

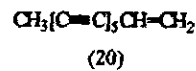
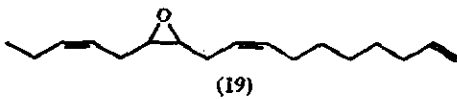
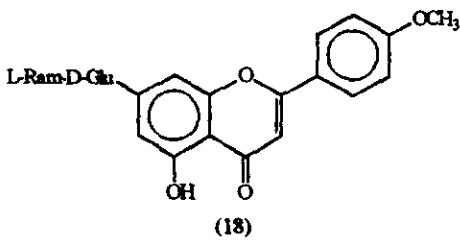
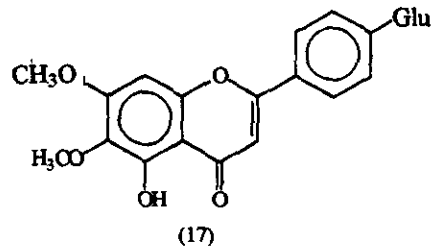
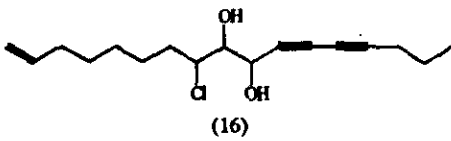
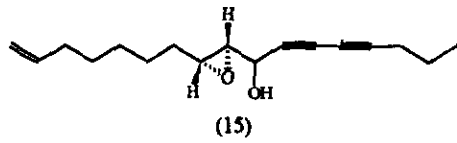
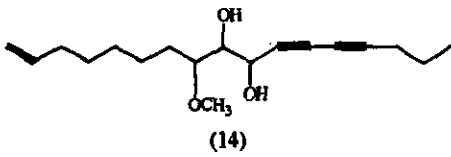
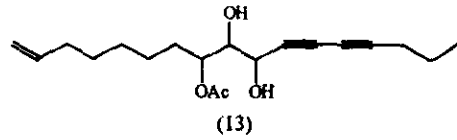
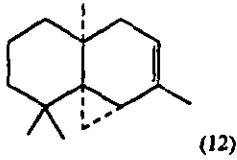
NOMBRE CIENTÍFICO	COMPUESTOS QUÍMICOS	REF.
<i>Cirsium lanceolatum</i>	Eschikokiol B (39) Eschikokiol C (40) 3-O-Glucósido del kaemferol (41) 3-O-Glucósido de la quercetina (42) 3-O-Galactósido de la quercetina (43) 7-O-Diglucósido de la apigenina (44) Acido caféico (45) Acido p-hidroxibenzóico (46)	[15]
<i>Cirsium arvense</i>	5-O-Glucósido de la tricina (47) 3-O-Digalactósido de la quercetina (48) 3-O-Galactósido del kaemferol (49) 3-O-Ramnoglucósido de la quercetina (50)	[16]
<i>Cirsium maritimum</i> , <i>C. aomurensis</i> y <i>C. tanaka</i>	4'-O-Glucósido cirsimaritina (51)	
<i>Cirsium brevicaulis</i>	Cirsiumamide (52)	[17]
<i>Cirsium coloradense</i>	7-O-Rutinósido de acetina (53)	[18]
<i>Cirsium lineare</i>	4', 5-Dihidroxi-6,7,3'-trimetoxi flavona (Cirsilineol) (54) 3', 4', 5-Trihidróxi-6,7-dimetoxiflavona (Cirsiliol) (55)	[19]

Tabla 2. Continuación

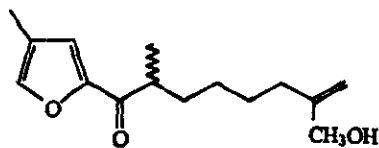
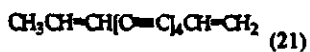
Estructuras químicas de metabolitos secundarios aislados del género *Cirsium*



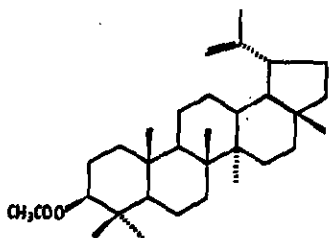
Esquema 1. Estructuras químicas de metabolitos secundarios aislados del género *Cirsium*



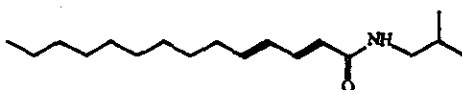
Esquema 1. Continuación



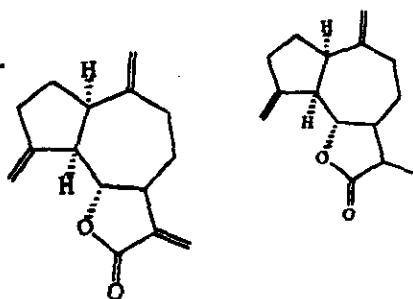
(22)



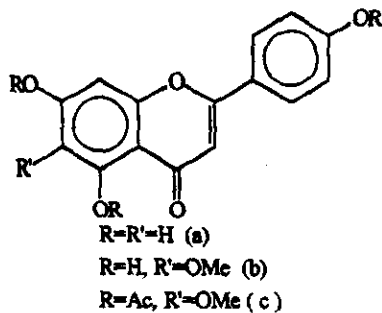
(23)



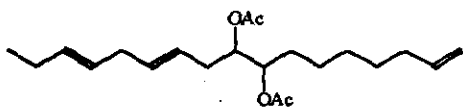
(24)



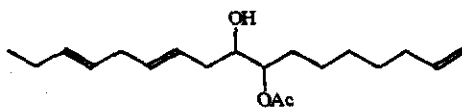
(25)



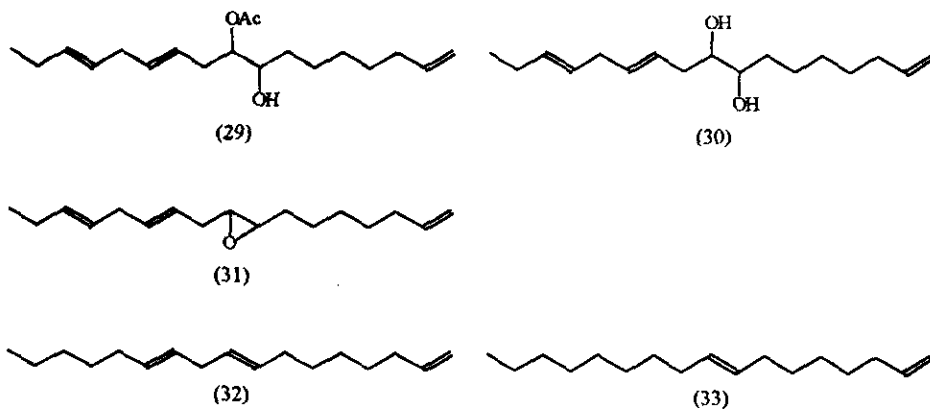
(26)



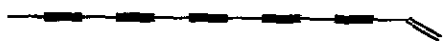
(27)



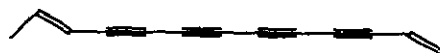
(28)



(34)



a) trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino



b) trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino

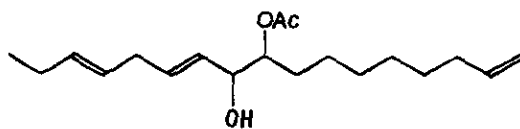


c) trideca-1,3-dien-5,7,9,11-tetraino

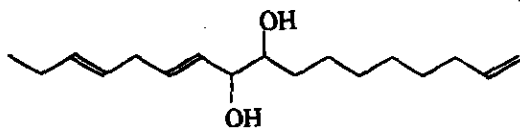
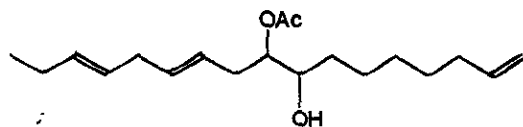


d) trideca-1,3,5-trien-7,9,11-triino

Esquema 1. Continuación

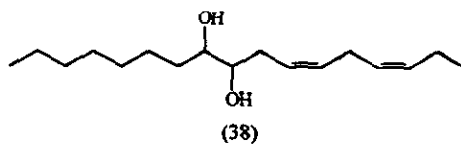


(35)

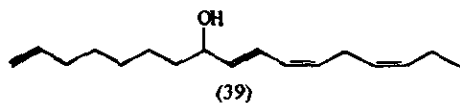


(36)

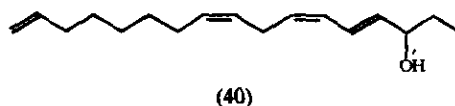
(37)



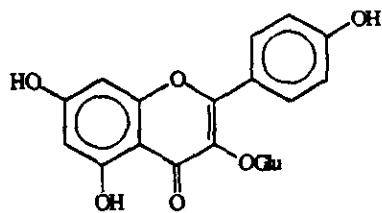
(38)



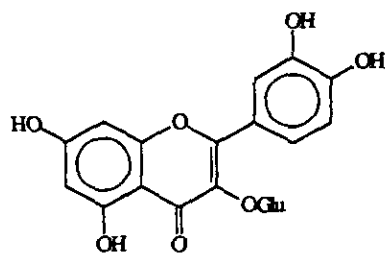
(39)



(40)

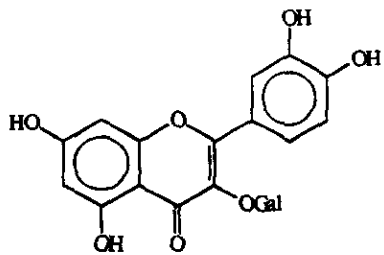


(41)

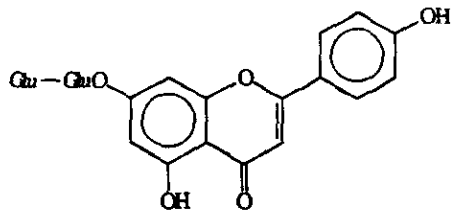


(42)

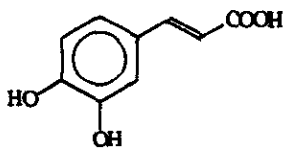
Esquema 1. Continuación



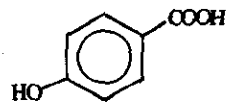
(43)



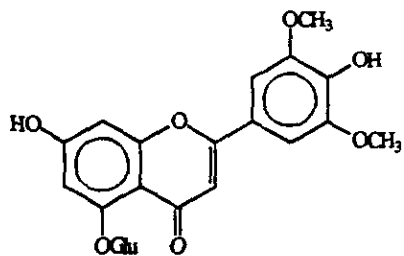
(44)



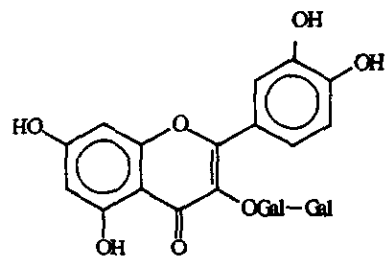
(45)



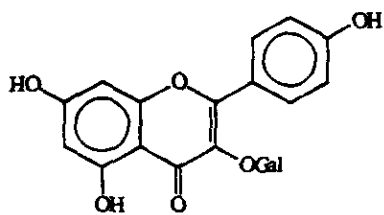
(46)



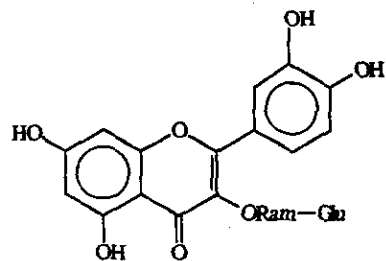
(47)



(48)

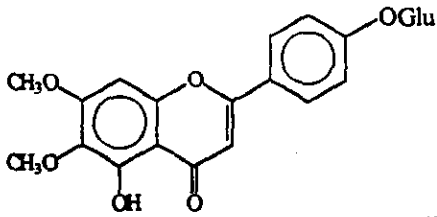


(49)

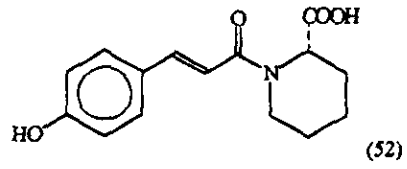


(50)

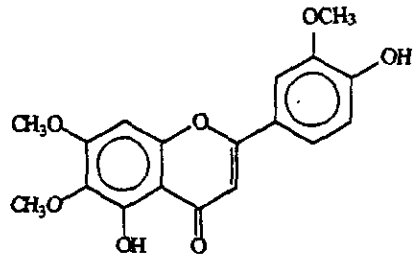
Esquema 1. Continuación



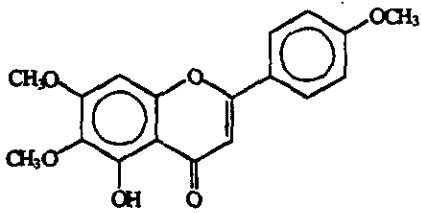
(51)



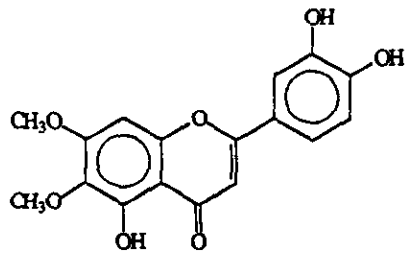
(52)



(54)



(53)



(55)

II.2.3 Ejemplos del uso de diferentes especies de *Cirsium* para diversos padecimientos en México.

En nuestro país se han identificado diferentes especies de *Cirsium* empleadas en el tratamiento de diversos padecimientos como se puede apreciar en la tabla 3.

Particularmente *C. jorullense* es empleada para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias por los habitantes de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.

Tabla 3. Usos de las diferentes especies de *Cirsium* que forman parte de la medicina tradicional mexicana [20]

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	LOCALIDAD	PADECIMIENTO Y USO	PORTE UTILIZADA	PREPARACIÓN	VÍA DE ADMINISTRACIÓN
<i>Cirsium conspicuum</i>	Cardo santo	Quimixtlán, Pue.	dolor de corazón y pulmón.	flor	cocimiento	oral
	Cardo santo	Tuzamapan de Galeana, Pue.	tosferina	s/i	s/i	s/i
<i>Cirsium medicatum</i>	Cardo santo	Sta. Catarina del Monte, Edo. de Mex	calentura	flor	infusión	oral
	Cardo santo	Misantla, Ver.	diabetes	raíz	cocimiento	oral
<i>Cirsium cf. pinetorum</i> Greenm	Cardo santo	Tlaxcala	desinflamación de heridas cutáneas	s/i	infusión	local
<i>Cirsium raphilepis</i>	Cardo santo	Huitil, Hgo.	diabetes, riñón	flor	infusión	oral
<i>Cirsium subcoreanum</i>	Cardo santo	Benito Juárez, Oaxaca	tos	botón blanco	s/i	s/i
	Cardo santo	Nauzontla, Pue.	tos	flor	cocimiento	oral
<i>Cirsium sp.</i>	Cardo santo	Quimixtla, Pue.	dolor de pulmón	flor	hervir	oral

s/i= sin información

II.3 Características de los flavonoides

II.3.1 Generalidades de los flavonoides

Los flavonoides, compuestos fenólicos, son en su mayoría pigmentos reponsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos. Ampliamente distribuidos en el reino vegetal —briofitas— generalmente en la forma soluble de heterósidos, están ausentes en las algas.

Sintetizados a nivel de los plastidios citoplasmáticos, los flavonoides se acumulan en el jugo vacuolar. Se encuentran en el mesófilo y la epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y en otros órganos, principalmente jóvenes [21].

Los flavonoides glicosilados (aquellos que tienen en su estructura molécula (s) de azúcares) pueden encontrarse en diversas formas estructurales, conteniendo quince átomos de carbono como núcleo base $C_6-C_3-C_6$, en los cuales dos núcleos bencénicos están unidos por tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo. Por conveniencia los anillos son llamados A, B y C, como puede apreciarse en la figura 1 [22].

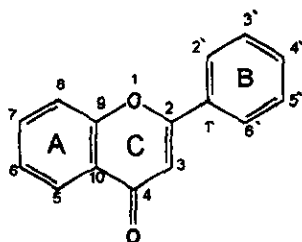


Fig. 1. Estructura química base de los flavonoides

El anillo A casi siempre es fluoroglucinol (derivado trihidroxilado) y sólo en algunos casos de resorcinol (derivados dihidroxilado), mientras que el anillo B puede presentar diversas modificaciones [23].

Las variantes en los tipos de flavonoides se relacionan con una biosíntesis común que incorpora precursores del ácido siquímico y del acetato malonato como se ilustra en el esquema 2 [22].

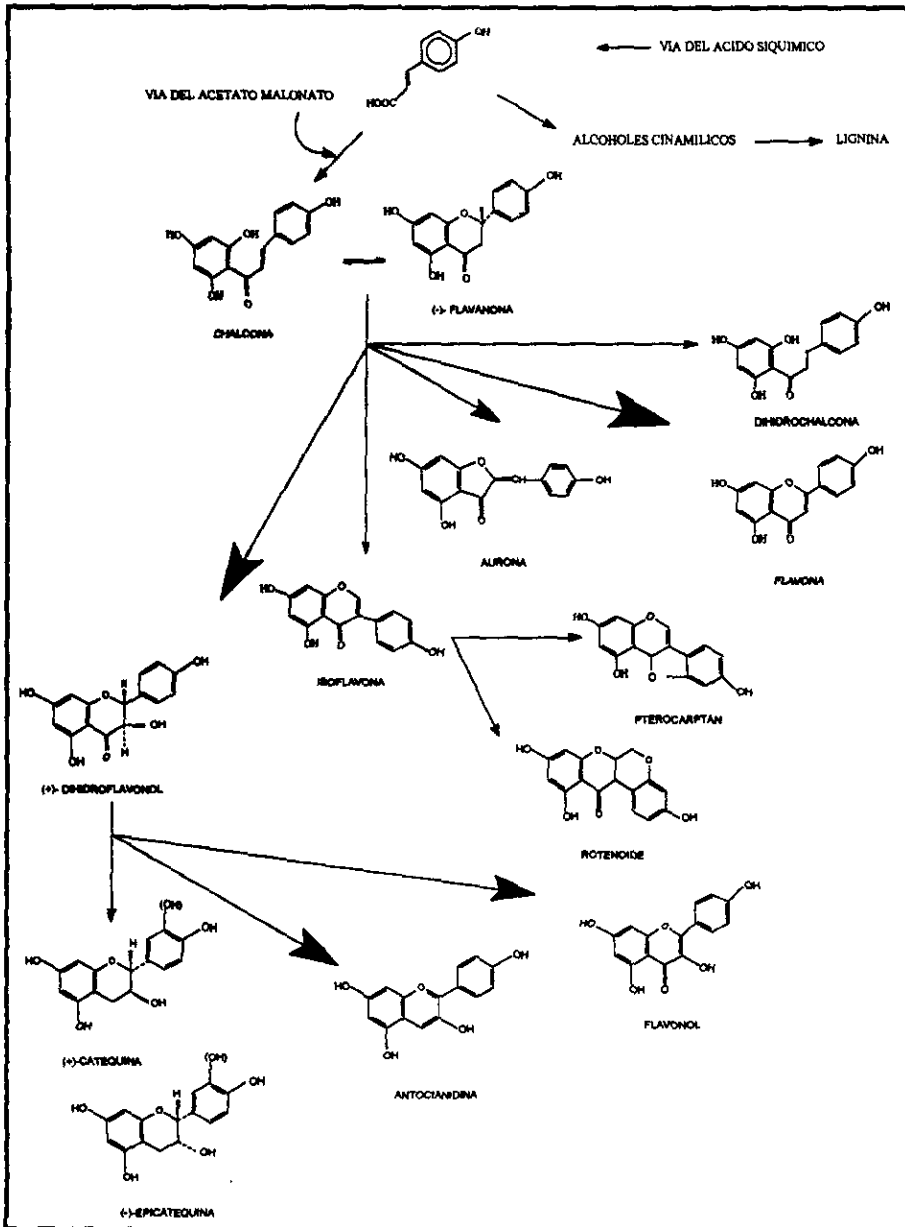
La biosíntesis de los flavonoides se inicia con el *p-cumaroil Co A* [21], el cual puede seguir dos caminos, como se muestra en el esquema 2, uno de ellos puede ser la formación de la *chalcona* —intermediario común de los flavonoides—, la cual da lugar a los diferentes flavonoides y la modificación del esqueleto base puede ocurrir a través de reacciones de hidroxilación, metilación de grupos hidroxilo presentes en el flavonoide, dimerización (para producir biflavonoides) y glicosilación de grupos hidroxilo (para producir flavonoides O-glicosilados) o glicosilación del núcleo flavonoide (para producir flavonoides C-glicosilados) [22].

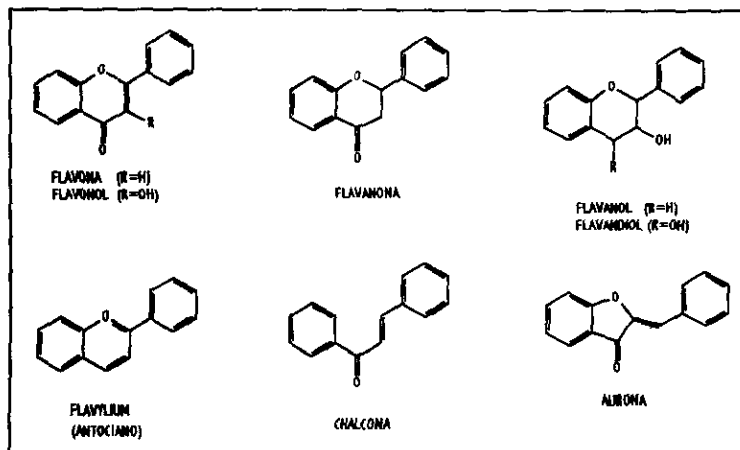
Por lo tanto, las diferencias entre los distintos grupos de flavonoides se presentan en la estructura básica —tipo de compuesto, grado de hidroxilación, metilación y/o isopentenil sustitución, el grado de polimerización (monómero, dímero y oligómero)— y el tipo de conjugación —glucósidos, ésteres malónicos, sulfato de ésteres— [23].

El término flavonoide se aplica a estructuras muy diversas, como se puede observar en el esquema 3 :

- 2-fenil-cromonas: flavonas, flavonoles, flavanonas y dímeros como biflavonoides.
- 2-fenil- cromanos (flavanos): 3-flavanol (catecoles) y 3,4-flavandioles.
- Flavilios: antocianos
- Chalconas: formas isoméricas abiertas de las flavanonas
- Auronas, homólogos de las flavonas con heterociclo pentagonal (2-bencilideno cumaranonas) [21].

Esquema 2. Biosíntesis de los flavonoides





Esquema 3. Estructuras químicas de flavonoides

Los O-glicosiflavonoides, son compuestos en los cuales uno o más grupos hidroxilo de un flavonoide se encuentra unido a un azúcar o azúcares por un enlace hemiacetalico, mientras que los C-glicosiflavonoides son sustancias que presentan un azúcar ó azúcares unidos directamente a los anillos bencénicos a través de un enlace C-C. Hasta ahora se han encontrado exclusivamente C-glicosiflavonoides que presentan el azúcar unido en las posiciones 6 y 8 del núcleo flavonoide, los cuales son muy restringidos y ocasionalmente en la literatura se informa de su aislamiento y caracterización en forma de isoflavonas, flavanonas y flavonas. En las tablas 4 y 5 se muestran algunos ejemplos de O-glicosiflavonoides y C-glicosiflavonoides [24]:

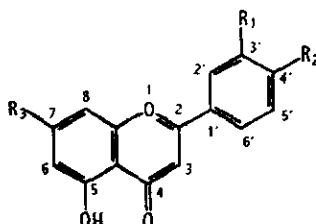
Fig. 2 . Posiciones de R₁, R₂ y R₃

Tabla 4. Ejemplos de O-glicosiflavonoides

	R ₁	R ₂	R ₃
Prunina	H	OH	OGlc
Naringenina	H	OH	OGlc(1-2)Rha
Neohesperidina	H	OMe	OGlc(1-2)Rha
Hesperidina	OH	OMe	OGlc(1-6)Rha

Tabla 5. Ejemplos de C-glicosiflavonoides

NOMBRE TRIVIAL	AGLICONA	ESQUELETO	C-6	C-8
Vicenina-1	Apigenina	Flavona	Xilosa	Glucosa
Vicenina-3	Apigenina	Flavona	Glucosa	Xilosa
Violantina	Apigenina	Flavona	Glucosa	Ramnosa
Isoorientina	Luteolina	Flavona	Glucosa	--

II.3.2. Propiedades químicas de los flavonoides

Los C y O-glicosiflavonoides son muy solubles en agua, en general, son solubles en alcoholes de bajo peso molecular como metanol, etanol y poco solubles en la mayoría de los demás disolventes orgánicos. La posición ocupada por la porción de azúcar influye en la solubilidad de la molécula. Estos flavonoides son sólidos cristalinos color amarillo principalmente.

Los grupos fenólicos influyen en las propiedades de los flavonoides, así como en las geninas que son solubles en NaOH y con cloruro férrico dan colores violáceos generalmente.

Debido al sistema de dobles enlaces conjugados, tanto las flavonas como los flavonoles son de color amarillo, mientras que las flavanonas (hidroflavonas) son incoloras [25].

Su extracción se realiza con solventes muy polares (EtOH, MeOH) y los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante su solubilidad y reacciones químicas específicas [26], como por ejemplo, el FeCl_3 acuoso o etanólico forma con la mayoría de los compuestos fenólicos productos coloridos, lo cual permite utilizarlo como un revelador específico de dichos compuestos.¹

II.3.3. Propiedades biológicas de los flavonoides

La propiedad biológica más importante atribuida a los flavonoides es la vitamínica P, que se le denomina también factor vitamínico P ó factor P que es capaz de disminuir la permeabilidad de los capilares y reforzar su resistencia. Las propiedades de dicho factor se atribuyen a polifenoles: flavonoides, antocianósidos y oligómeros flavánicos. La noción de

¹ Una coloración verde sugiere derivados del catecol, un color azul, derivados del pirogalol

factor P se debe a la observación de que ciertas manifestaciones hemorrágicas del escorbuto, curadas administrando jugo de limón, no ceden administrando únicamente ácido ascórbico, el cual no puede actuar más que en presencia de un factor "P" o "C2", la citrina.

Entre otras funciones biológicas se encuentran: acción diurética, antiespasmódica, *antiedematosa*, protección hipocolesteromianta, inhibición de la aldosa reductasa (de la cual se conoce su papel en la etiología de las cataratas en diabéticos —acción enzimática— efecto antioxidante y protector frente a radiaciones solares [21]).

La acción de los flavonoides podría ser explicada por numerosas actividades demostradas *in vitro*:

- Acción sobre la reducción del ácido dehidroascórbico vía glutatión ² [27] frente al cual se comportarían como dadores de hidrógeno. El ahorro de vitamina C es tanto mayor conforme a la capacidad reductora del flavonoide. De manera más general, estos o-difenoles protegen al organismo contra las oxidaciones, ya que captan los radicales libres originados por la inflamación, las irradiaciones, entre otros. Se sabe que estos radicales, principalmente el radical superóxido O₂⁻ y el radical hidroxilo OH[•], son el origen de fenómenos peroxidativos sobre los fosfolípidos, que ocasionan, entre otras cosas alteración de las membranas
- Inhibición de la catecol O-metil transferasa (COMT): esta acción no es específica; numerosas sustancias que pueden ser metiladas por la COMT provocan una elevación transitoria de la resistencia capilar. La duración de la acción de las catecolaminas en la contracción de las fibras de los vasos, elevación de la resistencia vascular, entre otros, se encuentra prolongada.

²Glutatión (GSH): Tri péptido que contiene ácido L-glutámico, L-cisteína y glicina. Una de sus funciones es la de actuar como reductor de los peróxidos tóxicos por acción de la peroxidasa del glutatión. También actúa como cofactor en unas pocas reacciones enzimáticas, pero no se le considera una coenzima, se ha postulado la intervención de la glutatión en el transporte de los aminoácidos a través de la membrana celular.

- Acción a nivel del colágeno: determinados polifenoles, estimulan a la prolina hidroxilasa, favoreciendo el establecimiento de puentes entre las fibras de colágeno reforzando así su solidez, su estabilidad y oponiéndose a su desnaturalización. Existe también una acción anti-elastasa, quizá consecutiva a la acción sobre el metabolismo de las prostaglandinas [21].

II.4 Prueba de toxicidad frente *Artemia salina*, para calcular $-CL_{50}$ -

Los compuestos bioactivos son generalmente tóxicos en altas dosis. La letalidad de dichos compuestos puede ser monitoreada en organismos vivos simples como la *Artemia salina*, la cual es una larva de camarón, cuyos huevecillos pueden durar un largo tiempo (hasta años) en estado seco y son de bajo costo, por lo que la realización de la prueba de toxicidad para determinar la $-CL_{50}$ - resulta fácil y práctica en su manejo por tratarse además de un organismo de fácil manipulación, así mismo, un gran número de compuestos bioactivos conocidos han sido probados con éste método y los resultados obtenidos demuestran la utilidad del bioensayo con compuestos químicos de estructuras muy diversas.

La prueba de *A. salina* es un método de evaluación muy simple, los extractos crudos, eluatos o compuestos químicos puros son evaluados en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm ($\mu\text{g} / \text{ml}$).

Después de las 24 horas, se procede a determinar el número de larvas vivas, los resultados obtenidos se les procesa mediante el programa Finney para cada dosis y se calcula la $-CL_{50}$ - mediante un programa de cómputo que utiliza el análisis de probitas de Finney [28].

II.5 Inflamación o respuesta inflamatoria

La inflamación o respuesta inflamatoria es una reacción del organismo frente a microorganismos, agentes físicos o químicos cuando lesionan a las células.

La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de reparación, ya que es útil para destruir, diluir y localizar al agente patógeno y, al mismo tiempo, inicia una cadena de acontecimientos que, dentro de lo posible, curan y reconstruyen el tejido lesionado.

La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica a los constituyentes celulares y extracelulares del mismo, incluyendo el plasma, las células circulantes (*neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos y plaquetas*) y los vasos sanguíneos. Las células del tejido conjuntivo son las *células cebadas*, que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos, los *fibroblastos* formadores del propio tejido conjuntivo y ocasionales *macrófagos y linfocitos residentes*.

El tejido conjuntivo extracelular está constituido por las proteínas fibrilares estructurales (*colágeno, elastina*), glucoproteínas adhesivas (*fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, entactina, tenascina*), así como también por la membrana basal, constituida a su vez por glucoproteínas adhesivas y proteoglicanos.

La respuesta vascular y celular de la inflamación está mediada por factores químicos procedentes del plasma o de las células, los cuales son activados por el propio estímulo inflamatorio. La inflamación termina cuando se elimina el estímulo lesivo y desaparecen o quedan inhibidos los mediadores de la misma. Dentro de estos mediadores químicos se encuentran:

La histamina : Dilata los vasos sanguíneos y aumenta su permeabilidad.

La serotonina : Cuyo efecto es similar a la histamina.

Las quininas: Pequeños péptidos básicos que alteran el tono vascular, aumentan la permeabilidad e inician o potencian la liberación de otros mediadores desde los leucocitos. La mejor conocida es la bradiquinina.

Otra clase de mediadores actúan sobre la motilidad y el metabolismo de los leucocitos: los leucotrienos y las prostaglandinas, éstos junto con fosfolípidos también causan la agregación de las plaquetas de la sangre, paso importante en la detención de las hemorragias [29, 30].

La inflamación se caracteriza por cuatro síntomas fundamentales: enrojecimiento, dolor, calor e hinchazón. Uno más sería la pérdida de función del área lesionada, cuyo surgimiento depende del sitio y la magnitud de la lesión.

II.5.1 Etapas básicas de la respuesta inflamatoria

Las etapas básicas de la respuesta inflamatoria son:

II.5.1.1 Vasodilatación y aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos:

La vasodilatación es el aumento en el diámetro o calibre de los vasos sanguíneos, mientras que el aumento en la permeabilidad significa que pueden atravesar la pared de los vasos sanguíneos las sustancias que normalmente se retienen en la sangre. La vasodilatación permite un mayor flujo de sangre al área de la lesión, mientras que el aumento en la permeabilidad posibilita el paso de sustancias defensivas presentes en la sangre al área lesionada, entre estas sustancias se incluyen los leucocitos y los factores químicos que forman el coágulo. El aumento en el riego sanguíneo también sirve para eliminar los productos tóxicos y células muertas, con lo que se evita la complicación de la lesión.

La vasodilatación y aumento en la permeabilidad son el resultado de la liberación de los mediadores químicos.

El cuerpo también suele responder mediante aumento en el metabolismo y aceleración de la frecuencia cardíaca, de modo que circule más sangre cada minuto al área lesionada, además de las respuestas locales. La aceleración del metabolismo y la circulación, y de manera especial, la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad de los capilares, originan calor, enrojecimiento e hinchazón.

El calor es resultado del elevado volumen de sangre caliente que se acumula en el área y, en cierta medida, de la energía térmica que producen las reacciones metabólicas. El gran volumen de sangre del área lesionada es otra causa del enrojecimiento de la misma.

El dolor, es un síntoma cardinal de la inflamación que puede resultar de lesiones de fibras nerviosas o de la irritación causada por la liberación de sustancias tóxicas de microorganismos.

II.5.1.2 Migración de fagocitos:

Por lo general, en la hora subsecuente al inicio de la inflamación, los fagocitos llegan al área de la lesión. Al disminuir el flujo de sangre, los neutrófilos empiezan a adherirse a la superficie interna del endotelio que reviste a los vasos sanguíneos. Después, los neutrófilos atraviesan la pared del vaso para llegar al área de la lesión y destruir los microorganismos invasores por fagocitosis, además de contener sustancias químicas con actividad antibiótica.

II.5.1.3 Liberación de nutrimentos:

Los nutrimentos almacenados en todo el cuerpo se emplean para apoyar a las células defensivas y también en las reacciones metabólicas aceleradas de las células atacadas por los microorganismos.

II.5.1.4 Formación de la fibrina:

El aumento en la permeabilidad de los capilares hace que el fibrinógeno pase a los tejidos donde se convierte en fibrina, cuya función es interceptar microorganismos invasores y formar el coágulo.

II.5.1.5 Formación de pus:

En todas las inflamaciones, excepto las muy leves, tiene lugar la formación de pus, la cual es una sustancia semilíquida que contiene leucocitos vivos y muertos, así como desechos de otros tejidos necróticos [31].

II.5.2 Evaluación de las propiedades antiinflamatorias de metabolitos secundarios aislados de la familia de las Compuestas

En relación a estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados a varias especies de la familia *Compositae*, se han aislado metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria de probada eficacia, tal es el caso los triterpenos como el ϕ -taraxasterol y taraxasterol de las flores de *Carthamus tinctorius*, *Chrysanthemum morifolium* y *Helianthus annuus*, los cuales mostraron considerable actividad antiinflamatoria frente al 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) probado en orejas de ratón, a una dosis de 1 μ g del TPA y 0.1 a 0.8 mg del triterpeno por oreja. De la misma manera, se han probado otros triterpenos como el helianol, α -amirina, β -amirina, lupeol, teraxerol, cicloartenol, 24-metil-enecicloartanol, tirucalla-7,24-dienol y dammaradienol, todos ellos con actividad antiinflamatoria, obtenidos de diferentes especies de compuestas.

El helianol, un alcohol *seco*-triterpénico, constituye el componente más predominante (29-86%) de las flores de *Calendula officinalis*, *Carthamus tinctorius*,

Cosmos bipinnatus, *Chrysanthemum morifolium*, *Helianthus annuus* y *Matricaria matricarioides*. Este compuesto probado frente al tratamiento con TPA (con 0.1 mg del triterpeno), ha mostrado un efecto antiinflamatorio similar al efecto producido por fármacos comerciales como la indometacina y la hidrocortisona.

La metodología empleada en ésta investigación empleando TPA, consistió en disolver 1 μg del 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en 20 μl de Me_2CO aplicando en la oreja derecha de ratón con una micropipeta. La muestra del triterpeno disuelto en MeOH-CHCl_3 (1:1, 20 μl) fue aplicado tópicamente 30 minutos antes de cada tratamiento con TPA. La aplicación del triterpeno inhibió el efecto inflamatorio que provoca el TPA [32].

En otro estudio realizado a *Diospyros leucomelas*, se aislaron tres triterpenos que fueron identificados como betulina, ácido betulínico y ácido ursólico, los cuales mostraron actividad antiinflamatoria en pruebas realizadas frente al TPA y carrageenina, siendo el ácido betulínico el de mayor actividad antiinflamatoria (86.2% de inhibición). Cuando estos compuestos fueron administrados oralmente a 100 mg/Kg frente a la prueba con carrageenina, el ácido betulínico mostró el mayor efecto antiinflamatorio (45.6% de inhibición), la betulina y el ácido ursólico mostraron el 35.5% de inhibición.

La actividad antiinflamatoria de estos compuestos fue similar al efecto producido por la fenilbutazona en la prueba con carrageenina y similar a la indometacina en la prueba con TPA.

El extracto con CH_2Cl_2 y MeOH de la planta fueron evaluados en ratones en los dos modelos de inflamación arriba mencionados, a una dosis de 0.5 mg/oreja (administración tópica) para el TPA y 100 mg/ Kg para la prueba con carrageenina en pata de ratón (administración oral), dando como resultado que el extracto con CH_2Cl_2 indujo un 90% de reducción de la inflamación frente al TPA y 46.3% de reducción a las tres horas frente a la carrageenina . Del extracto con MeOH sólo se obtuvo el 71% de inhibición frente al TPA.

La metodología de la prueba con TPA consistió en inducir un edema en la oreja derecha de ratón por aplicación tópica de 2.5 µg/oreja de TPA en acetona. La oreja izquierda fue tomada como control aplicándole acetona o EtOH al 70%. Los triterpenos suspendidos en EtOH al 70% fueron aplicados tópicamente (0.5 mg/oreja) simultáneamente con el TPA. El efecto antiinflamatorio fue medido a la 1, 3 y 5 hrs. después de la aplicación.

En la prueba con carrageenina, se indujo un edema en la planta de la pata del ratón, inyectando 0.05 ml de solución al 3% de carrageenina en solución salina al 0.9%. La medición del efecto inflamatorio fue medido a la 1, 3 y 5 hrs. después de la inducción con un pletismómetro y el edema fue expresado como un aumento en el volumen de la pata debido a la carrageenina. Dos grupos de referencia fueron tratados con indometacina (7 mg/Kg) y fenilbutazona (100 mg/Kg) respectivamente. Los triterpenos fueron disueltos en EtOH/ Tween 80/ H₂O (2:2:20) y fueron administrados oralmente a 100 mg/Kg (0.50 ml) 1 hr antes de la inyección de carrageenina. Un grupo control recibió únicamente el vehículo [33].

Con respecto al género *Cirsium*, de *C. subcoriaceum*, se ha aislado a la pectolinarina – flavonoide glicosilado mayoritario de la planta- y se ha evaluado su efecto antiinflamatorio. Este estudio fue realizado con la carrageenina como inductor de la inflamación. La dosis de pectolinarina empleada fue de 2.5, 10 y 50 mg/Kg y la indometacina usada como referencia fue con 1, 2.5, 5 y 7.5 mg/Kg.

Los animales de control recibieron solución salina al 0.9% o el vehículo usado en las mismas condiciones experimentales. Sesenta minutos después de la inyección de la pectolinarina y la indometacina, en grupos de ratas por separado, cada una de éstas, recibió en la planta de la pata, una inyección de 0.1 ml de una suspensión de carrageenina al 1%. La variación en el volumen de la planta de la pata fue calculada de 3 a 4 mediciones 1, 2, 3, 4 y 5 hrs. después de la inyección del agente antiinflamatorio.

Los resultados obtenidos mostraron una actividad antiinflamatoria por debajo de la efectividad de la indometacina, ya que a las tres horas se observó una variación en el

volumen del edema de 18.3 ml para la pectolinarina y 14.8 ml para la indometacina con una dosis de 2.5 mg/Kg para ambos compuestos [34].

Con estos antecedentes se puede observar, que las compuestas, son una familia que posee metabolitos secundarios con una efectiva actividad antiinflamatoria, así mismo, se han encontrado las mismas propiedades en el género *Cirsium*, por lo que se le realizaron pruebas de actividad antiinflamatoria a *C. jorullense*.

México es un país con gran diversidad biológica, tanto vegetal como animal. Su riqueza en flora hace y ha hecho de él un país con una gran tradición herbolaria desde épocas precolombinas; sin embargo, el estudio químico de las plantas medicinales es aún muy deficiente y fragmentado, aún en sus aspectos básicos – descripción botánica, estudios químicos, toxicológicos, farmacológicos, entre otros –.

El conocimiento químico de las plantas medicinales puede aportar mayor información sobre sustancias con actividad terapéutica en la cura de diversas enfermedades o mejorar las ya establecidas, es por eso, que los estudios químicos son de gran valor en el conocimiento de dichas especies vegetales; además, los productos naturales pueden servir como prototipos en el diseño de nuevos fármacos.

Dentro de la rica y variada flora mexicana se encuentra *Cirsium jorullense*, la cual es una planta medicinal muy empleada en el tratamiento de enfermedades a nivel del aparato circulatorio y respiratorio, entre otras, de la cual no se cuenta con ningún estudio químico informado previamente en la literatura especializada. Sin embargo, a partir del género *Cirsium* se han aislado diversos metabolitos secundarios como flavonoides, poliacetilenos, poliolefinas, alcaloides, sesquiterpenos y saponinas. Entonces, en el presente proyecto, se propone el estudio químico de los extractos con acetato de etilo y etanol de las partes aéreas y extracto etanólico de flores de *Cirsium jorullense*, con la finalidad de aislar, purificar, caracterizar e identificar sus constituyentes químicos mayoritarios, y evaluar su actividad citotóxica frente a *Artemia salina*, así como sus propiedades antiinflamatorias.

IV.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio químico y evaluación citotóxica frente a *A. salina*, así como la evaluación antiinflamatoria de *Cirsium jorullense*, la cual es empleada frecuentemente en la medicina tradicional, con la finalidad de caracterizar e identificar los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto con acetato de etilo y etanol de las partes aéreas y extracto etanólico de flores.

IV.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Realizar la investigación bibliográfica de 1980-1996, sobre los estudios químicos y farmacológicos de la familia *Compositae* y del género *Cirsium*.
2. Participar en la recolección e identificación del material vegetal.
3. Preparar los extractos con disolventes de diferente polaridad: n-hexano, cloroformo, etanol y acetato de etilo.
4. Determinar la $-CL_{50}$ - de los diferentes extractos obtenidos frente *Artemia salina*.
5. Separar y purificar los diferentes metabolitos que constituyen los extractos con acetato de etilo y etanol de las partes aéreas y extracto etanólico de flores.
6. Identificar y caracterizar las sustancias puras aisladas de los diferentes extractos.
7. Determinar las propiedades antiinflamatorias de los extractos crudos obtenidos.

El estudio químico de las plantas medicinales puede aportar información sobre sustancias con actividad terapéutica y menor toxicidad en el tratamiento de diversas enfermedades. En relación al género *Cirsium*, estudios químicos previos informan que se han aislado flavonoides, poliacetilenos, poliolefinas, alcaloides, sesquiterpenos y saponinas como metabolitos secundarios característicos de dicho género. Entonces, por medio de la aplicación de las técnicas de aislamiento y purificación; así como de las técnicas que ayuden a su caracterización e identificación, se podrá determinar la naturaleza química de los metabolitos mayoritarios presentes en los extractos con acetato de etilo y etanol de las partes aéreas y del extracto etanólico de flores de *Cirsium jorullenses*. Además de poder determinar su $-CL_{50}$ frente a *A. salina* y propiedades antiinflamatorias de los extractos crudos obtenidos.

Es importante señalar, que *Cirsium jorullense* es una planta originaria de México, de la cual no se conoce ningún estudio químico o biológico de dicha especie. Por lo cual, los resultados que se deriven del presente proyecto, aunados con los descritos en la literatura química, coadyuvarán a un conocimiento más científico de dicho género.

A) Material vegetal:

Cirsium jorullense (partes aéreas y flores), fue colectada en un bosque de pinos a 2740 m snm., a 3 Km al NO del poblado de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.

B) Material para la extracción, aislamiento, purificación, caracterización e identificación de los metabolitos secundarios.

Material de vidrio:

- Equipo para destilación simple y fraccionada
- Matraz balón junta esmerilada 24/40 con capacidad para 100, 250, 1 000 y 2 000 ml.
- Matraz con junta esmerilada esférica para rotavapor con capacidad para 1 000 ml.
- Extractor Soxhlet con junta esmerilada
- Refrigerantes de vidrio junta esmerilada 24/40
- Matraz Erlenmeyer con capacidad para 25, 50, 100, 250, 500 y 1 000 ml.
- Matraz Kitazato con capacidad para 125, 250, 500 y 1 000 ml.
- Columnas de vidrio para cromatografía.
- Pipetas Pasteur.
- Pipeta graduada de 1, 2, 5 y 10 ml
- Cámara de elución para cromatofolios con capacidad para 100, 200 y 400 ml de volumen total.
- Placa de toque de vidrio.
- Embudo de separación de 60 y 250 ml.
- Embudo de vidrio de tallo corto y largo.
- Probeta de vidrio de 10 y 250 ml.

- Frascos viales para muestreo cromatográfico cilíndricos con capacidad para 2 ml.

Equipo:

- Balanza analítica Ainsworth DE Series Mod. 100 A.
- Balanza semianalítica OHAUS Mod. E400.
- Balanza granataria OHAUS Triple Beam 800 series
- Aparato Fisher Johns
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética
- Lámpara de luz U.V. mineralight modelo UVGL-25 UV 254/366 nm
- Rotavapor Büchi
- Mantilla eléctrica ADRY para matraz balón con capacidad de 100 y 250 ml.

Sustancias químicas:

I. Sólidos:

- Tricloruro férrico
- Nitrato de plata
- Vainillina
- Celite 545.
- Cromatofolios recubiertos con sílica gel Merck Si-Gel 60F₂₅₄
- Sílica gel para capa fina 60 G

- Silica gel para cromatografía en columna
- D-Galactosa ($C_6H_{12}O_6$), cristales
- L-Rhamnosa ($C_6H_{12}O_5$), cristales
- D-Fructosa ($C_6H_{12}O_6$), cristales
- D-Xylosa ($C_5H_{10}O_5$), cristales
- D-Glucosa ($C_6H_{12}O_6$), cristales

II. Líquidos:

- n-Hexano (C_6H_{14}), grado técnico
- Cloroformo ($CHCl_3$), reactivo analítico
- Etanol (CH_3CH_2OH), grado técnico
- Acetato de etilo ($CH_3COOCH_2CH_3$), grado técnico
- Metanol absoluto (CH_3OH), reactivo analítico
- Acetona, grado técnico
- Diclorometano (CH_2Cl_2), grado técnico
- Acido clorhídrico concentrado (HCl), reactivo
- n-Propanol ($CH_3CH_2CH_2OH$)
- Acido acético glacial (CH_3COOH)
- Anhídrido acético ($(CH_3CO)_2O$)
- Dimetilformamida (DMF)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Agua desionizada

C) Material para pruebas biológicas:

PRUEBA DE *Artemia salina*

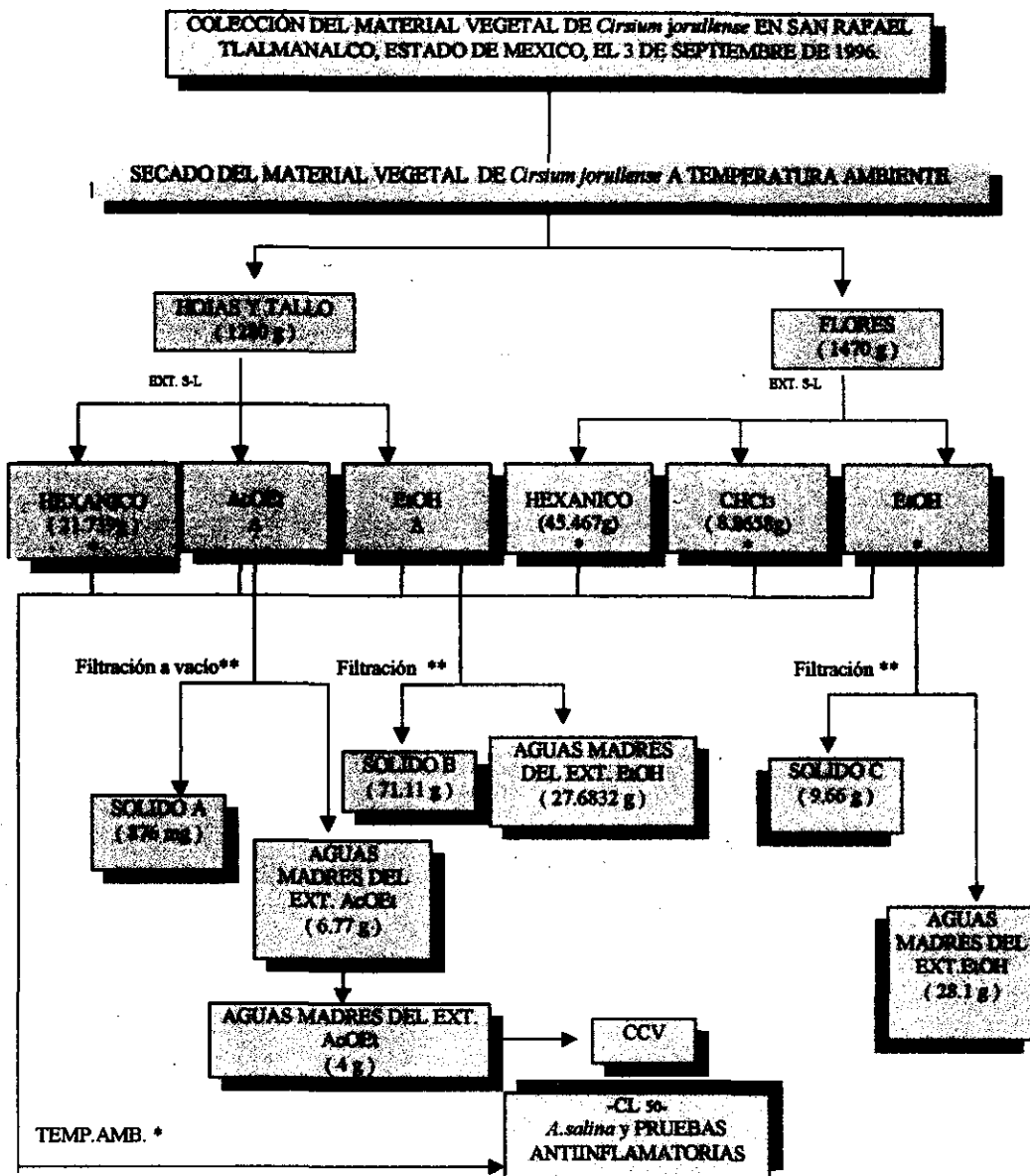
- Huevecillos deshidratados de *Artemia salina*
- Sal marina
- Pecera de 12x12x20 cm
- Pecera especial para prueba de *A. salina* según indicaciones de la bibliografía [28]
- Viales de vidrio de capacidad de 10 ml
- Jeringas de vidrio de 25 y 100 μ l

PRUEBA ANTIINFLAMATORIA

- Ratones albinos de 28 a 30 g
- Solución acetónica de TPA (12-O-tetradecanoilforbol acetato)
- Jeringas de vidrio de 25 μ l
- Sacabocado

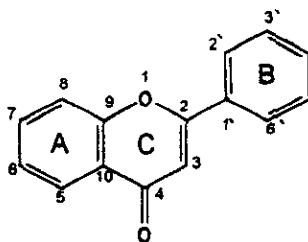
METODOLOGIA GENERAL

1. DIAGRAMA GENERAL

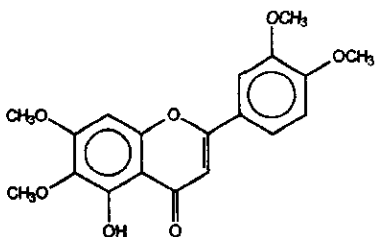


Esquema 4

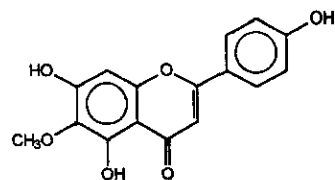
Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas y de flores de *Cirsium jorullense*



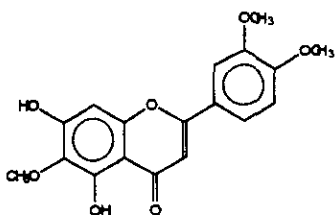
Estructura base de los flavonoides



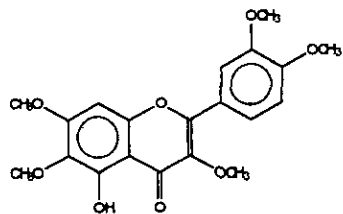
3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (I)



6-Metoxi-4', 5, 7-trihidroxi-flavona Hispidulina (II)



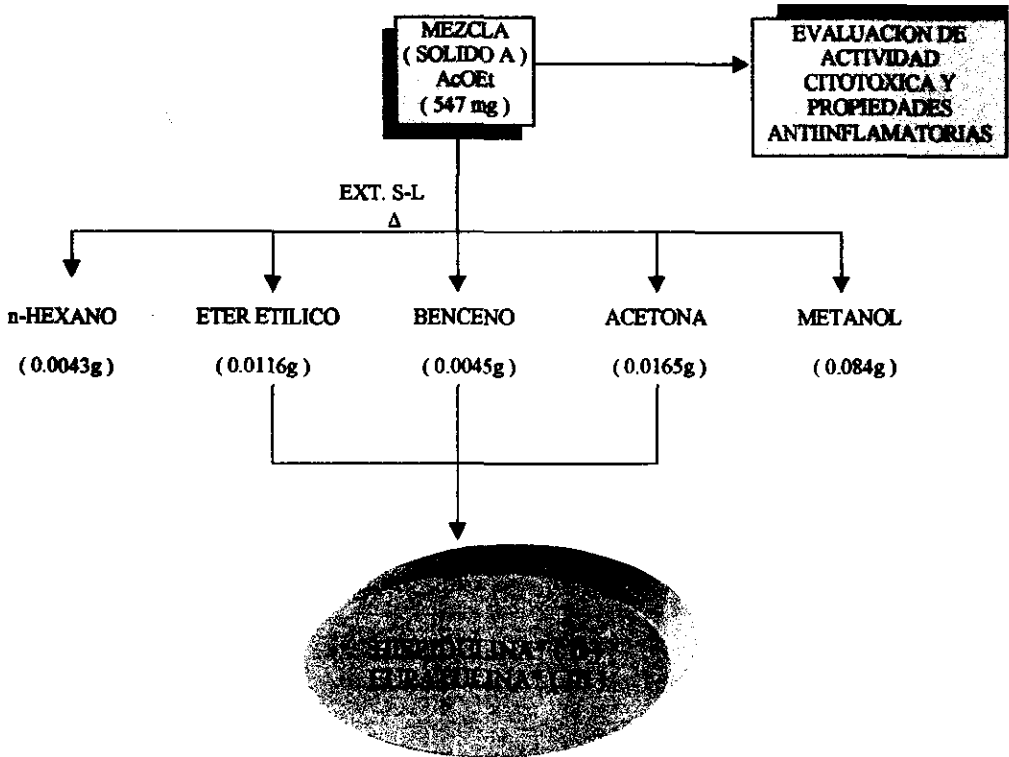
3',4',6-Trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona Eupatulina (III)



3',4',3,6,7 -Pentametoxi-5-hidroxi-flavona (IV)

DIAGRAMA 2.

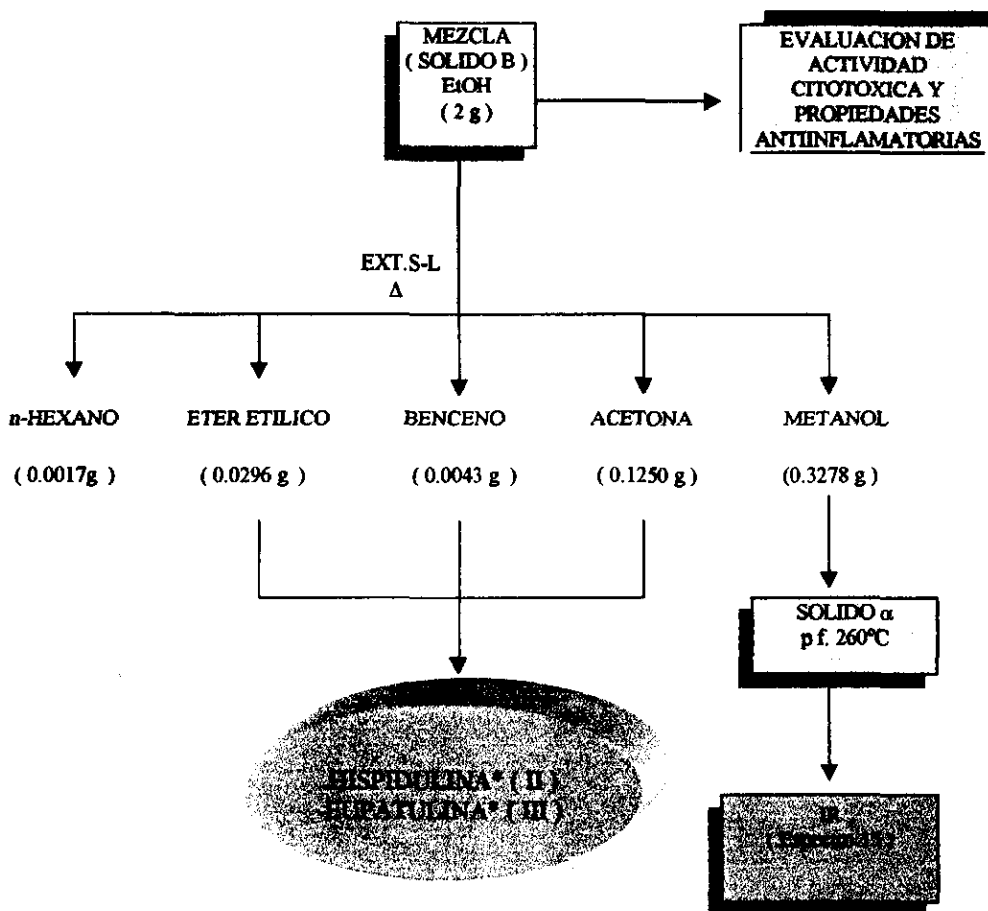
Tratamiento de la mezcla (sólido A), obtenido por extracción con AcOEt de las hojas y tallos de *Cirsium jorullense*.



* La identificación de la hispidulina y eupatulina se llevó a cabo mediante CCF empleando como revelador una solución de FeCl_3 en EtOH al 1%, empleando diferentes sistemas de elución y comparando contra estándares puros.

DIAGRAMA 3.

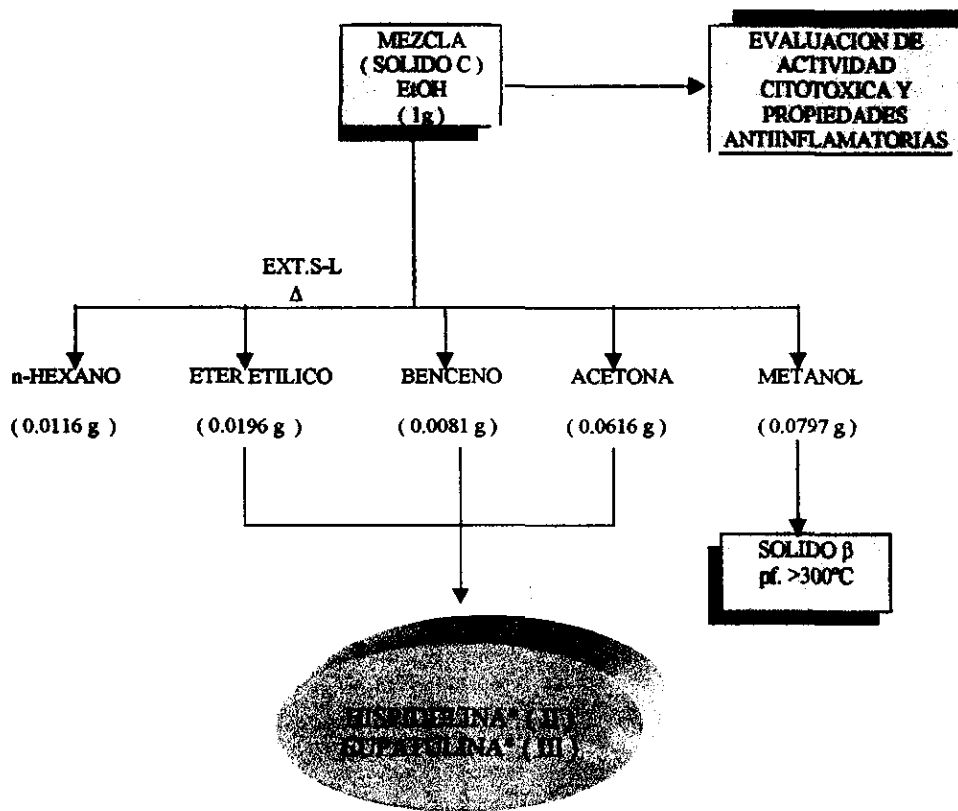
Tratamiento de la mezcla (sólido B), obtenido por extracción con EtOH de las hojas y tallo de *Cirsium jorullense*



* *idem*

DIAGRAMA 4.

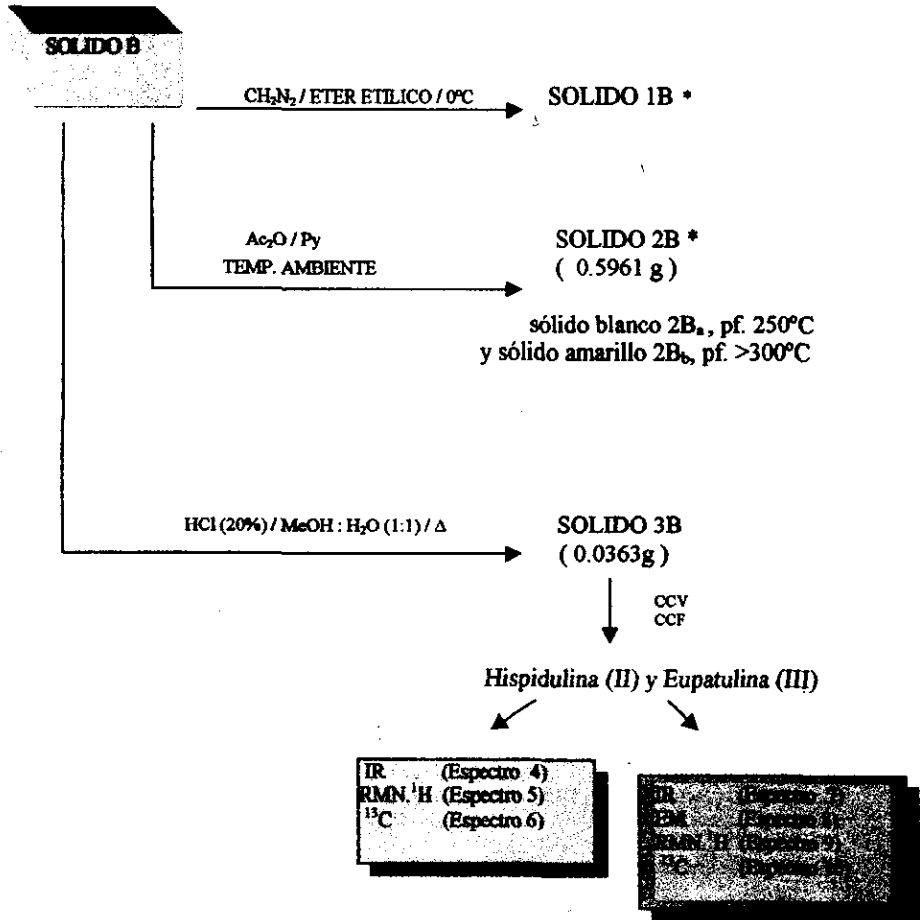
Tratamiento de la mezcla (sólido C), obtenido por extracción con EtOH de las flores de *Cirsium jorullense*



* *idem*

DIAGRAMA 5.

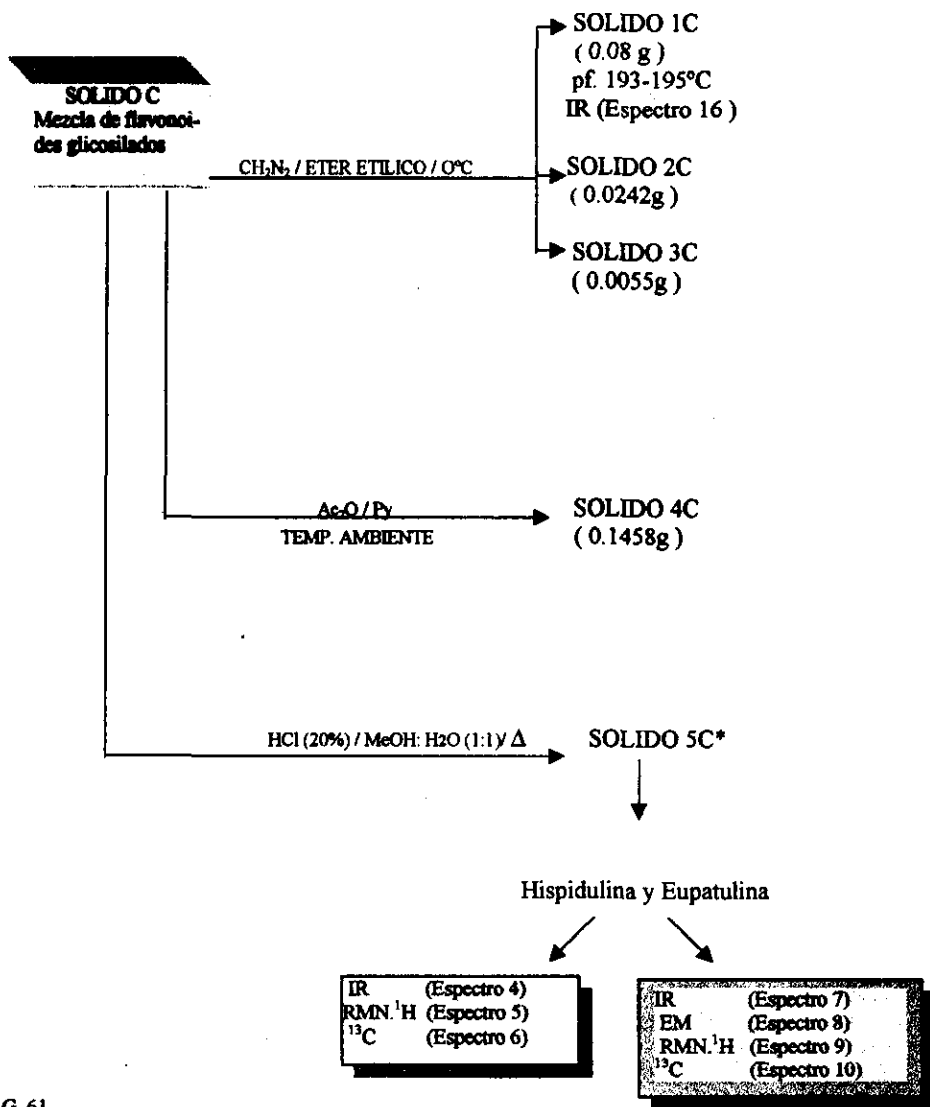
Reacciones químicas de la mezcla (sólido B), obtenido de las hojas y tallos de *Cirsium jorullense*.



*MEZCLAS DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS

** VER PAG. 68, TABLA 6

DIAGRAMA 6.

Reacciones químicas de la mezcla (sólido C), obtenido de las flores de *Cirsium jorullense*

* VER PAG. 61

**VER PAG. 68, TABLA 7

*Cirsium jorullense*³ (Compositae) fue colectada en un bosque de pinos a 2740 m snm. Se colectó entre las 10 y 14 horas del día 3 de septiembre de 1996 por el QFB José Luis Balderas y el M. en C. Arturo Cano Flores, a 3 kilómetros al NO del poblado de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México. Fue identificada y clasificada por el B. Osvaldo Téllez del Instituto de Biología, de la UNAM.

Las **partes aéreas** y **flores** se separaron y se dejaron secar a temperatura ambiente.

VII.1 Obtención de los extractos hexánico, de acetato de etilo y etanólico de parte aérea de *Cirsium jorullense*

Una vez secas las partes aéreas de *Cirsium jorullense*, 1280 g de material vegetal molido de **parte aérea** (hojas y tallo), se sometió a una extracción sólido-líquido como se describe a continuación:

a) EXTRACTO HEXANICO

El material vegetal se dejó macerar a temperatura ambiente con n-hexano concentrando el solvente en equipo de destilación simple cada 24 hrs., finalmente se obtuvo 21.739 g de extracto hexánico, el residuo vegetal obtenido se dejó secar a temperatura ambiente.

b) EXTRACTO CON ACETATO DE ETILO

En una columna de vidrio de 70 cm de largo por 9 cm de diámetro, se depositó la planta molida una vez seca, a través de la cual se pasó acetato de etilo (AcOEt) caliente en repetidas ocasiones, el disolvente fue eliminado por destilación a baja presión, depositándose un sólido de color verde-amarillento el cual fue separado por filtración a

³. ".....originarie de México, habita en clima cálido, semicálido y templado entre los 2000 y 3900 metros snm. Crece a orillas de caminos asociada a vegetación perturbada de bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperinifolio y perinifolio; bosques de encino, de pino y mixto de pino encino.....". Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol 1. INI (1994) 334.

vacío. La cantidad de sólido obtenido fue de 876 mg de sólidos (SOLIDO A) y 6.77 g de extracto (aguas madres).

El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente. Para la separación de los metabolitos secundarios mayoritarios se emplearon 4 g de extracto (aguas madres), los cuales fueron absorbidos en 6.33 g de celita y aplicados posteriormente a una columna de vidrio para cromatografía de 6.5 cm de largo y 10 cm de diámetro, previamente empacada con 240 g de silica gel para capa fina por vía seca con ayuda de vacío [35].

c) EXTRACTO ETANOLICO

Una vez seco el material vegetal se procedió de la manera descrita anteriormente para la obtención del extracto con acetato de etilo. Después de concentrar, se obtuvieron 71.11 g de una mezcla de sólidos de color amarillo-verdoso (SOLIDO B) y 27.6832 g de residuo que corresponde a las aguas madres del extracto etanólico.

VII.2 Obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico de flores de *Cirsium jorullense*

a) EXTRACTO HEXANICO

Se colocaron 1470 g de material vegetal seco y molido a maceración con n-hexano, la eliminación del disolvente se hizo por destilación simple cada 24 hrs. Después de una serie de repeticiones de dicha operación, se obtuvieron 45.467 g de extracto crudo.

b) EXTRACTO CLOROFORMICO

Una vez seco el material vegetal del disolvente anterior, se procedió de manera similar a la obtención del extracto hexánico, hasta obtener finalmente 8.8658 g de extracto clorofórmico crudo.

c) EXTRACTO ETANOLICO

Al material vegetal seco se le adicionó etanol a temperatura ambiente, después de concentrar se obtuvo un sólido amarillo-verdoso; el cual se filtró a vacío, obteniéndose 9.66 g de sólidos (SOLIDO C) y 26.1 g de residuo (aguas madres).

VII.3 Purificación de la mezcla de sólidos obtenidos por extracción con acetato de etilo de parte aérea (SOLIDO A)

Para la purificación de la mezcla de sólidos obtenidos a partir del extracto con acetato de etilo (SOLIDO A), se procedió de la siguiente manera:

Se colocaron 547 mg de sólido impuro en un equipo de extracción Soxhlet empleando n-hexano como disolvente durante 4 hrs. Finalizada la extracción se concentró el disolvente obteniéndose 0.0043 g de extracto hexánico. Posteriormente se extrajo con éter etílico (0.0116 g), benceno (0.0045 g), acetona (0.0165 g) y metanol (0.084 g).

De la extracción con éter etílico, benceno y acetona se comprobó la presencia de la hispidulina y eupatulina, por medio de CCF comparando con estándares.

VII.4 Purificación de la mezcla de sólidos obtenidos por extracción con etanol de parte aérea (SOLIDO B)

Para purificar el sólido B impuro obtenido de la extracción sólido-líquido con etanol de **parte aérea**, se montó un sistema de extracción con un equipo soxhlet de la misma manera que para el sólido A.

Se colocaron 2 g del sólido y se inició la extracción con n-hexano como disolvente por 4 hrs., prosiguiéndose con éter etílico, benceno y acetona sucesivamente. Los rendimientos obtenidos en cada uno de los extractos se muestra en el diagrama 3 (pp. 51).

De la extracción con éter, benceno y acetona se pudo determinar la presencia de hispidulina y eupatulina por medio de CCF en comparación con estándares de referencia.

VII.5 Reacción de acetilación de la mezcla de sólidos obtenidos de la extracción con EtOH tanto de parte aérea como de flores (SOLIDOS B Y C)

La reacción de acetilación del sólido B impuro (mezcla), se realizó de la siguiente manera: En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5.0785 g de sólidos impuros con 7 ml de anhídrido acético y 2.5 ml de piridina a temperatura ambiente con agitación magnética. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF y después de 27 hrs. se dió por concluida agregando 5 g de hielo.

Posteriormente se procedió a la extracción del compuesto acetilado, para lo cual se hicieron dos extracciones con cloroformo (2x5 ml). Antes de proceder a los lavados subsecuentes, se separó por filtración a vacío un sólido amarillo ($m = 0.5961$ g, 11.74%) de $pf. > 300^{\circ}\text{C}$ soluble en dimetilformamida (SOLIDO 2B).

La fase clorofórmica se trató con una solución de ácido clorhídrico (3x5 ml) al 10% v/v y con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x5 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro.

La mezcla de producto de reacción se concentró, obteniéndose 3.93 g (11.74%). Posteriormente se montó una columna cromatográfica (36 cm de largo y 5 cm de diámetro) empacada con 94 g de gel de sílice, absorbiendo el producto en 3.93 g de celita para separar los diferentes constituyentes presentes en la misma. El resultado de esta diferenciación cromatográfica no fueron satisfactorios debido a la cantidad de producto obtenido.

Para llevar a cabo la reacción de acetilación del sólido C impuro, se colocaron 0.1520 g de la mezcla de sólidos los cuales se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina a temperatura ambiente mediante agitación magnética, la reacción fue seguida por CCF y después de 24 hrs de reacción, ésta se detuvo agregando 3 g de hielo al matraz de reacción.

Para la recuperación del producto acetilado, se siguió la misma metodología descrita en el presente trabajo para el producto 2B. El producto de reacción obtenido (0.1458 g, 96%), se absorbió en 0.1500 g de celita y aplicó a una columna cromatográfica de 32 cm de largo por 1.4 cm de diámetro empacada con 15 g de gel de sílice para lograr la separación de los constituyentes presentes en la mezcla de productos de dicha reacción.

VII.6 Reacción de metilación de la mezcla de sólidos (SOLIDO C), obtenido por extracción con EtOH de flores

Del sólido obtenido de la extracción con etanol de las **flores** de *C. jorullense*, se tomaron 228.8 mg del sólido impuro, los cuales fueron disueltos en 5 ml de EtOH absoluto a temperatura ambiente, posteriormente se agregó lentamente diazometano disuelto en éter etílico a baja temperatura (0°C). Una vez terminada la reacción se eliminó el exceso de éter etílico y se filtró a vacío, obteniéndose un sólido amarillo ($m=0.08$ g, 34.96%), de pf. 193-195°C, el cual es parcialmente soluble en una mezcla de MeOH/H₂O y soluble en DMF (SOLIDO 1C).

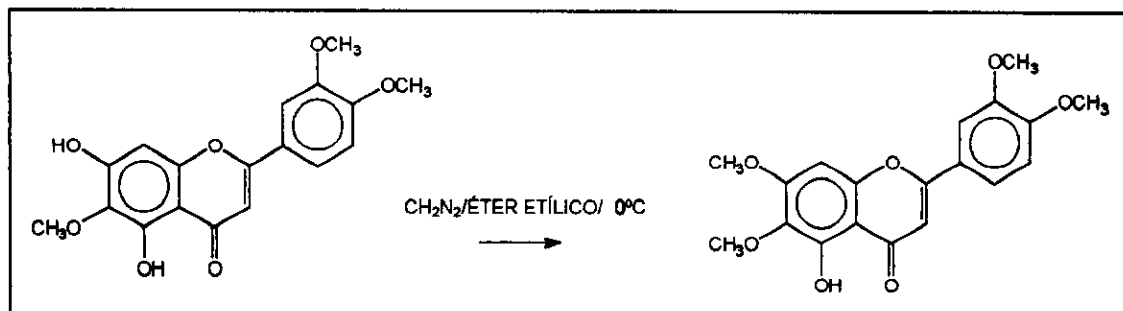
Por otro lado, se obtuvieron de la misma reacción 24.2 mg (10.58%) de un sólido cristalino blanco (SOLIDO 2C).

Así mismo, al agregar MeOH al matraz de donde se obtuvo el sólido 1C se separó un sólido blanco (5.5 mg, 2.40%) de aspecto algodonoso (SOLIDO 3C).

PREPARACION DEL DIAZOMETANO:

El CH₂N₂ se preparó en un equipo ex profeso para el caso. Se pesaron 11 g de diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida) disolviéndose en 100 ml de éter etílico anhidro en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se colocó esta solución en un embudo de adición y se agregó lentamente a un matraz balón que contenía una mezcla compuesta por 5 g de KOH, éter etílico, agua y etanol (10:10:30), sumergido en baño María (56°C).

El CH_2N_2 generado de la reacción se recogió en un volumen de 75 ml de éter etílico a 0°C (baño de hielo).



Esquema 5. Reacción de metilación de la eupatulina con CH_2N_2 en éter etílico a 0°C

VII.7 Reacción de hidrólisis ácida de la mezcla de sólidos obtenidos de la extracción etanólica de parte aérea y flores (SOLIDO B y C)

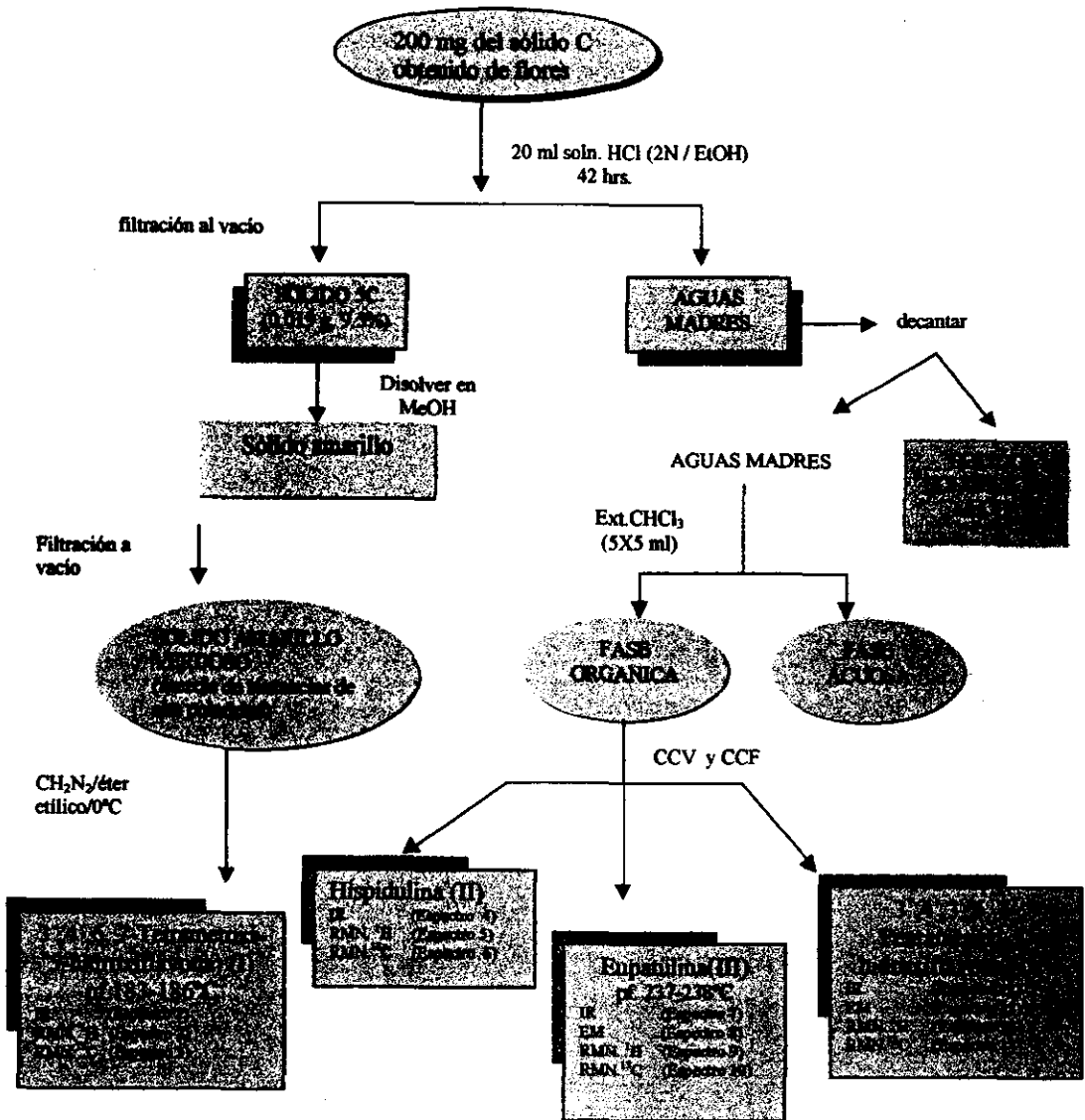
Se colocaron 0.1804 g del sólido B impuro en un matraz balón de 100 ml al que se le adicionaron 20 ml de ácido clorhídrico (20% v/v) y 20 ml de una solución $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1). La reacción se dejó con agitación reflujo durante 24 hrs. y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se separó por filtración a vacío 0.0363 g (5.44%) de un sólido verde amarillento soluble en acetona, metanol, DMF y DMSO cuya CCF reveló una mancha café con FeCl_3 en etanol al 1%. SOLIDO 3B.

El residuo se trató con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x5 ml), seguido de tres lavados con agua (5 ml), finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró.

Para el sólido C, se siguió el procedimiento que se describe en el diagrama 7:

DIAGRAMA 7. Tratamiento químico realizado al sólido C



*SOLIDO NO TRATADO

3',4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I)

El sólido separado por filtración de la hidrólisis ácida del sólido C se sometió a una reacción de metilación con CH_2N_2 en éter etílico a 0°C , dando como resultado la 3',4', 6, 7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I), cuyas características espectroscópicas y espectrométricas se enlistan a continuación:

Espectro 1 IR ν_{max} (CHCl_3) cm^{-1} : 2939, 2842, 1656, 1614, 1591, 1515, 1496, 1460, 1330, 1268, 1174, 1126.

Espectro 2 RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): δ 12.76 (s, 1H, $\text{C}_5\text{-OH}$), δ 7.53 (dd, $J=8.4$ Hz, 1H, H-6'), δ 7.34 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H-2'), δ 3.995-3.934 (s, 4 OCH_3).

Espectro 3 RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS), δ (ppm): δ 164.01 (C-2), δ 104.55 (C-3), δ 182.63 (C-4), δ 158.81 (C-7), δ 90.64 (C-8), δ 123.95 (C-1'), δ 111.36 (C-2'), δ 152.47 (C-3'), δ 153.18 (C-4'), δ 109.10 (C-5'), δ 120.12 (C-6').

La cromatografía en columna de la fase orgánica del extracto clorofórmico de las aguas madres provenientes de la hidrólisis ácida del sólido C, permitió determinar la presencia de: hispidulina (II), eupatulina (3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi flavona (III) y 3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV), cuyas características espectroscópicas y espectrométricas son las siguientes:

Hispidulina (II)

(6-Metoxi-4', 5, 7-Trihidroxi flavona)

Espectro 4 IR ν_{max} (Nujol) cm^{-1} : 3480, 3368, 1660, 1610, 1571, 1463, 1378, 1166, 1094, 822.

Espectro 5 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃+DMSO, TMS), δ (ppm): δ 13 (s, 1H, C₅-OH), δ 9.7 (s, 1H, C₇-OH), δ 7.75 (s.c., J= 8.7, 2.1 Hz, 2H, H-2 y H-6'), δ 6.96 (s.c., J= 9 y 2.1Hz, 2H, H-3' y H-5'), δ 6.54 (s, 1H, H-8), δ 6.49 (s, 1H, H-3), δ 3.974-3.921 (s, 1 OCH₃).

Espectro 6 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS), δ (ppm): δ 163.85 (C-2), δ 102.34 (C-3), δ 182.12 (C-4), δ 160.65 (C-5), δ 163.85 (C-7), δ 93.73 (C-8), δ 119.90 (C-10), δ 121.50 (C-1'), δ 127.53 (C-2'), δ 115.70 (C-3'), δ 156.38 (C-4'), δ 115.70 (C-5'), δ 127.53 (C-6').

Eupatulina (III)

(3', 4', 6-trimetoxi-5, 7-dihidroxi flavona)

Espectro 7 IR ν_{max} (Nujol) cm⁻¹: 3183, 1655, 1620, 1580, 1510, 1425, 1336, 1264, 1149, 1027.

Espectro 8 EM (IE) m/z (% de abundancia relativa): 344 [M⁺, 100%], 329 (64.84), 327 (58.59), 301 (40.62), 298 (9.37), 285 (2.34), 243 (3.12), 163 (18.75), 139 (7.81), 129 (4.68), 120 (3.12), 69 (17.18).

Espectro 9 RMN-¹H (300 Hz, CDCl₃ + DMSO, TMS), δ (ppm): δ 12.99 (s, 1H, C₅ - OH), δ 7.60 (dd, J= 8.6 y 2.1 Hz, 1H, H-6'), 7.47 (d, J= 2.1 Hz, 1H, H-2'), δ 7.06 (d, J= 8.7 Hz, 1H, H-5'), δ 6.76 (s, 1H, H-8), δ 6.56 (s, 1H, H-3), δ 3.94-3.83 (s, 3 OCH₃).

Espectro 10 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS), δ (ppm): δ 163.11 (C-2), δ 103.20 (C-3), δ 181.90 (C-4), δ 152.59 (C-5), δ 131.04 (C-6), δ 156.88 (C-7), δ 93.93 (C-8), δ 123.05 (C-1'), δ 111.09 (C-2'), δ 148.73 (C-3'), δ 151.74 (C-4'), δ 108.95 (C-5'), δ 119.62 (C-6').

3', 4', 3, 6, 7- Pentametoxi- 5-hidroxi flavona (IV)

Espectro 11 IR ν_{max} (CHCl₃) cm⁻¹: 3597, 3531, 2935, 2856, 1768, 1637, 1593, 1510, 1462, 1431, 1365, 1327, 1132.

Espectro 12 EM (IE) m/z (% de abundancia relativa): 388 [M⁺, 100%], 373 (70.31), 345 (11.71), 327 (7.03), 315 (3.12), 299 (3.12), 287 (3.12), 245 (2.34), 194 (6.25), 178 (7.03), 165 (13.6), 149 (6.4), 135 (3.12), 83 (3.12), 69 (6.25), 57 (6.25), 43 (6.25).

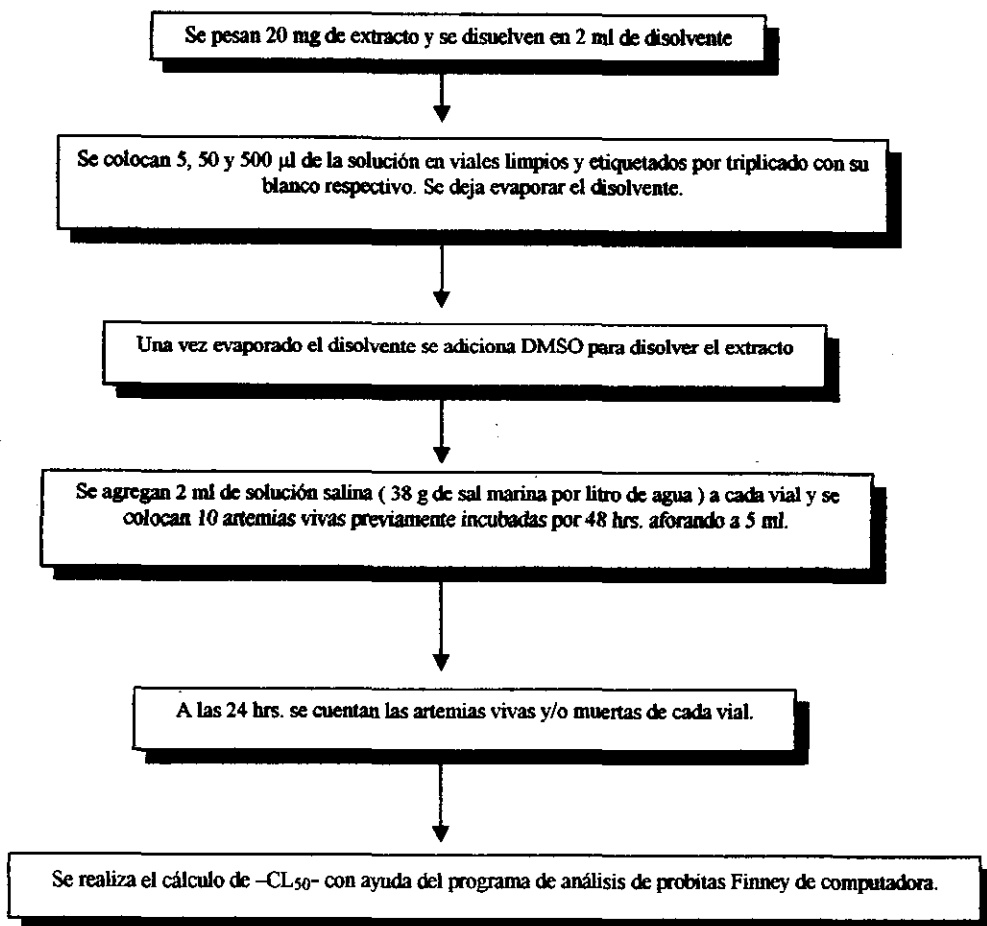
Espectro 13 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): δ 12.61 (s, 1H, C₅-OH), δ 7.73 (s.c., J= 9 y 2.1 Hz, 1H, H-6'), δ 7.69 (d, J= 1.8 Hz, 1H, H-2'), δ 6.99 (d, J= 8.4 Hz, 1H, H-5'), δ 6.51 (s, 1H, H-8), δ 3.97-3.87 (s, 5 OCH₃).

Espectro 14 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm): δ 158.80 (C-2), δ 138.85 (C-3), δ 178.92 (C-4), δ 152.812 (C-5), δ 132.36 (C-6), δ 158.78 (C-7), δ 90.35 (C-8), δ 155.857 (C-9), δ 122.15 (C-10), 122.98 (C-1'), δ 111.39 (C-2'), δ 148.85 (C-3'), δ 151.46 (C-4'), δ 110.92 (C-5'), δ 122.15 (C-6').

VII.8 Prueba biológica de toxicidad de los extractos crudos frente *Artemia salina*

La prueba para evaluar la $-CL_{50}$ - para cada uno de los extractos obtenidos de *Cirsium jorullense* frente a *A. salina* se realizó como se muestra a continuación:

DIAGRAMA 8. Evaluación biológica frente *A. salina*.



VII.9 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos crudos de las partes aéreas y flores de *Cirsium jorullense*.

EDEMA INDUCIDO CON ACETATO DE 12 MIRISTATO DE FORBOL (TPA) EN LA OREJA DEL RATON:

Se emplean ratones albinos cuyo peso oscila entre 28 a 30 g. Los animales son anestesiados y se les aplica una solución acetónica de TPA (2.5 μ g), en un volumen de 10 μ l en la parte interna y externa de cada oreja .

Los compuestos de prueba así como los fármacos prototipos se disuelven en vehículos apropiados y se aplican en dosis de 0.01 ó 1.0 mg en la oreja derecha, mientras que en la oreja izquierda se aplica solamente el vehículo (oreja control).

La inflamación se desarrolla por espacio de 4 hrs. y al finalizar dicho período, los animales se sacrifican por dislocación cervical, se toma de la porción central de cada oreja un tapón de 6 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado.

La diferencia en masa entre la oreja tratada con el compuesto de prueba y el peso de la oreja que solamente recibe el vehículo, se tomará como medida de la respuesta antiedematosa.

VIII.1 Resultados de reacciones químicas realizadas a la mezcla (SOLIDO B), obtenido de la extracción con EtOH de parte aérea

1B	Color amarillo	DMF	-	-
2B (a y b)	a)Color amarillo pálido b)Color blanco	Soluble en agua , ligeramente soluble en DMF.	a) 250 b) >300	m de 2B: 0.5961
3B	Color verde olivo	MeOH y DMF	No determinado	0.0363

Tabla 6 . Propiedades físicas de los sólidos obtenidos a partir de las transformaciones químicas realizadas al sólido B.

VIII.2 Resultados de reacciones químicas realizadas a la mezcla (SOLIDO C) , obtenido de la extracción con EtOH de flores

1C	Color amarillo	DMF	193-195	0.08
2C	Color blanco en forma ramificada	H ₂ O	-	0.0242
3C	Color blanco, algodonoso	H ₂ O	-	0.0055
4C	Color amarillo pálido	DMF	-	0.0104
5C*	Color verde olivo	MeOH y DMF	-	-

Tabla 7. Propiedades físicas de los sólidos obtenidos a partir de las transformaciones químicas realizadas al sólido C.

*Por metilación de la mezcla del sólido 5C se obtuvo la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I).

VIII. 3 Resultados de la prueba biológica con *Artemia salina* -CL₅₀ -

PARTE AEREA

1	328.1359	-	0.0001	383.7108	-	96.3253
2	-	-	333.8700	-	-	140.0183
3	4080.089	-	-	-	-	129.5248

Tabla 8. Resultados de la prueba biológica realizada con *A. salina* a los extractos crudos de parte aérea de *Cirsium jorullense*.

FLORES

1	737.8801	122.4278	-	681.5474
2	790.9776	107.4433	307.7322	614.0551
3	520.2244	47.7575	176.6796	-

Tabla 9. Resultados de la prueba biológica realizada con *A. salina* a los extractos crudos de flores de *Cirsium jorullense*.

NOTA: Mc Laughlin, J.L., considera que una sustancia o un extracto es activo frente *A. salina*, si el valor de -CL₅₀- es menor a 1000 ppm. [28].

VIII. 4 Resultados de los extractos de *Cirsium jorullense* a la dosis de 0.5 mg/oreja en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón:

	Edema	Inhibición (%)
metanol	15.33 + 0.29	-
Ext. Hex. (flores)	11.4 + 1.16	25.64
Ext. AcOEt (parte aérea)	4.66 + 2.1	69.60
Ext. Hex. (parte aérea)	12.63 + 0.83	17.61
Acetonitrilo	14.86 + 0.24	-
Ext. EtOH (parte aérea)	13.33 + 0.44	10.29
Ext. EtOH (flores)	12.80 + 0.84	13.86

Tabla 10. Por ciento (%) de inhibición de la evaluación antiinflamatoria de los extractos crudos de parte aérea y flores de *C. jorullense*

* Inhibición = $100 - (X \text{ tratado} / X \text{ control}) \times 100$; X promedio del tejido de tres animales

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

IX.1 Purificación de los sólidos A, B y C obtenidos de extracción con AcOEt Y EtOH mediante el sistema de extracción con Soxhlet.

La purificación de los diferentes sólidos obtenidos durante la preparación de los extractos crudos, se basó considerando que las sustancias presentes tenían diferentes solubilidades, para lo cual se realizó una extracción sólido-líquido en equipo Soxhlet, para eliminar aquellas sustancias que en un momento dado podrían considerarse como impurezas y las cuales se fueron eliminando con disolventes de polaridad similar.

El sólido B obtenido de la extracción con EtOH de parte aérea, diagrama 3 (pp. 51), se trató en un equipo Soxhlet con MeOH, de donde se separó un sólido (α) de pf. 260°C. En CCF se infirió que dicha sustancia podría presentar como esqueleto base el de un flavonoide, ya que da prueba positiva con FeCl₃ al 1% en etanol.

Por otro lado, del sólido C obtenido a partir de las flores de *Cirsium jorullense*, diagrama 4 (pp. 52) tratado de forma similar a los descritos anteriormente, se separó un sólido amarillo de pf. >300°C.

La alta polaridad de estos sólidos confirman su naturaleza glicosídica, ya que la presencia de un gran número de grupos hidroxilo le confiere a cualquier molécula una alta polaridad, lo cual está de acuerdo con los datos descritos en la literatura, donde se dan a conocer la descripción de los metabolitos secundarios pertenecientes a otras especies de dicho género (ver tabla 2).

Por medio de CCF y comparación con estándares, se pudo establecer la presencia de hispidulina (II) y eupatulina (III) en los extractos etéreos, bencénicos y acetónicos del tratamiento realizado a dichos sólidos.

IX.2 Reacción de acetilación de los sólidos impuros B y C (mezclas), obtenidos de la extracción con EtOH de parte aérea y flores

En la reacción de acetilación del sólido B, se obtuvo un sólido amarillo (SOLIDO 2B) que en CCF muestra estar constituido por dos sustancias, la sustancia menos polar reveló con luz ultravioleta, sulfato cérico de amonio y dió prueba positiva con FeCl_3 al 1% en etanol, lo cual indica que presenta como esqueleto base el de un flavonoide.

Para separar dichos compuestos se tomó como base su grado de solubilidad en MeOH. La parte soluble en MeOH cristalizó como un sólido blanco (SOLIDO 2B_a) de pf.>300°C, mientras que el sólido insoluble en MeOH (SOLIDO 2B_b), de color amarillo, presentó un pf. 250°C. Ambos sólidos se solubilizan parcialmente en DMF y su solubilidad completa se logra al agregar unas gotas de agua.

La mezcla de los productos de reacción de acetilación se aplicaron a una columna cromatográfica para la separación de los diferentes constituyentes, obteniéndose fracciones en cantidades muy pequeñas que no permitieron realizar estudios espectroscópicos.

En la reacción de acetilación del sólido C, se obtuvo un residuo, el cual fue separado en CCV con una mezcla de hexano-AcOEt (7:3). En la fracción 58-77 se obtuvo un sólido amarillo (SOLIDO 4C), que reveló con FeCl_3 al 1% en etanol, sugiriendo la formación del quelato entre el C₄ del anillo del flavonoide y el grupo hidroxilo del C₃ del anillo A.

Por las características que presentaron, todos estos compuestos obtenidos son mezclas de flavonoides glicosilados.

IX.3 Reacción de hidrólisis ácida de los sólidos impuros B y C (mezclas), obtenidos de la extracción con EtOH de parte aérea y flores

Debido a que la hipótesis estructural de las sustancias mayoritarias aisladas del extracto etanólico de las partes aéreas era la de un glicosiflavonoide, se procedió a realizar

la reacción de hidrólisis ácida del sólido B , así se obtendría el azúcar (fase acuosa) y la aglicona (fase orgánica), éste último es un sólido de color verde olivo que revela con FeCl_3 al 1% en etanol (SOLIDO 3B).

La fase acuosa de la reacción se cromatografió en papel empleando como revelador químico fialato de anilino y como muestras estándares D-fructuosa, D-xilosa, L-ramnosa y D-galactosa. Los resultados de dichos análisis mostró una coloración característica de las pentosas, color rosado, empleando el revelador mencionado, lo cual presumiblemente podría tratarse de una sustancia con estructura química similar.

De la reacción de hidrólisis ácida del sólido C, se obtuvo un sólido verde olivo (SOLIDO 5C), con R_f similar al producto de hidrólisis de B . En la fase acuosa aparecen cristales blancos que parece ser el azúcar separado de la aglicona por la hidrólisis del sólido obtenido del extracto EtOH de parte aérea, en cromatografía en papel revela de color café, esto podría sugerir que se trata de un azúcar diferente al obtenido a partir del sólido B.

La separación por cromatografía en columna de la fase orgánica, permitió determinar la presencia de hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-trihidroxi-flavona (II), eupatulina (3', 4', 6-trimetoxi-5, 7-dihidroxi-flavona (III) y 3', 4', 3, 6, 7-pentametoxi-5-hidroxi-flavona (IV).

Después de obtener el sólido amarillo, se filtró a vacío y se secó (ver diagrama 7, pp. 61). Posteriormente se trató con CH_2N_2 obteniéndose como producto de reacción la 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (I).

IX.4 Obtención de la Eupatulina (3',4',6-Trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona (III))

Del sólido obtenido del extracto etanólico de las hojas y tallo, y el sólido obtenido de la extracción con etanol de flores (diagrama 1, pp. 48) que fueron sometidos a hidrólisis

con HCl , como se indica en los diagramas 5-7 (pp 53, 54 y 61), se obtuvo un sólido amarillo, pf. 237-238°C, el cual muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un ión molecular de m/z 344, al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_7$ ($\Omega = 11$), y da prueba positiva con cloruro férrico al 1% en etanol.

En su espectro de IR (espectro 7) se observa una banda en 1655 y 1620 cm^{-1} , el desplazamiento de la banda de absorción hacia un número de onda más bajo con respecto al desplazamiento informado en la literatura (1715 cm^{-1}) [36], se debe a la formación de un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo existente en la molécula, lo cual explica la coloración café con cloruro férrico. Por lo anterior, se propuso la fórmula parcial A (fig. 3), la cual explica dos grados de insaturación.

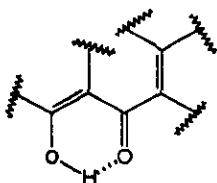


Fig. 3. Fórmula parcial A

Adicionalmente, la formación del puente de hidrógeno fue corroborada al analizar su espectro de RMN. 1H (espectro 9), donde se observa una señal simple a campo bajo en δ 12.99. Las señales simples que aparecen: δ 3.94, δ 3.91 y δ 3.83 que integran para 9 hidrógenos, corresponden a 3 grupos metoxilos unidos a anillos aromáticos, fórmula parcial B (fig. 4), lo cual permite justificar 4 grados de insaturación más en la molécula.

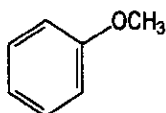


Fig. 4. Fórmula parcial B

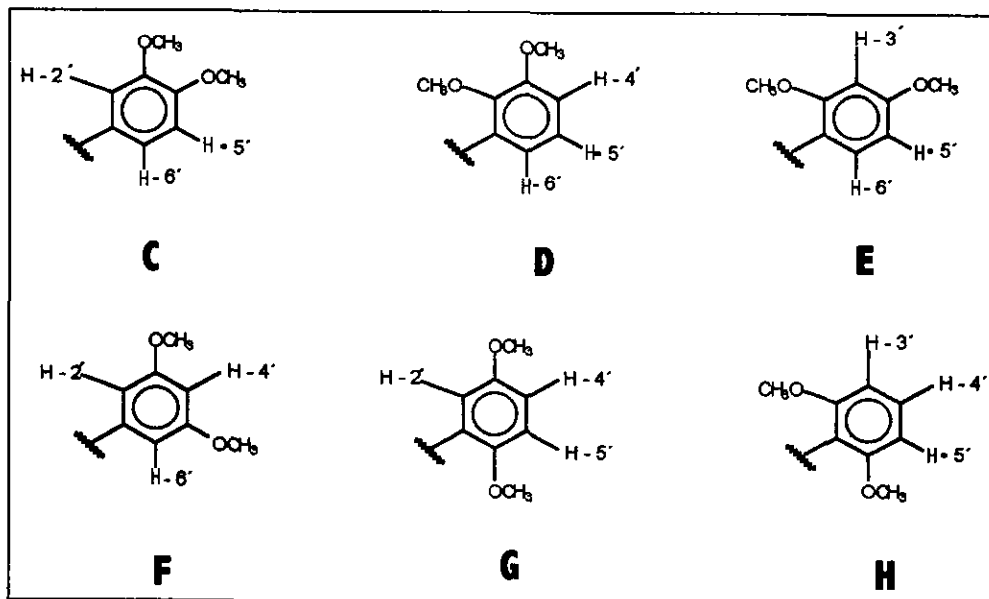
En δ 6.56 se observa una señal simple que corresponde a un hidrógeno vinílico, debido a la simplicidad de señales observadas en el espectro para otro tipo de flavonoides, como se muestra en la tabla 11 [24]. Basándose en la discusión anterior, se propuso como esqueleto base el de una flavona.

FLAVANONA			FLAVONA			DIHIDROFLAVANOL			FLAVONOL		
H-2	δ 5.5-5.3	<i>dd</i>	H-3	δ 6.3	<i>s</i>	H-2	δ 5.2	β_{ox}	—		
H-3 ^{oc}	δ 2.9-2.8	<i>dd</i>				H-3	δ 4.2	α_{ox}	—		
H-3 ^{ax}	δ 3.1-3.0	<i>dd</i>							—		

Tabla 11 . Desplazamientos químicos para los H-2 ó H-3 en los flavonoides.

En la región de los aromáticos se observan tres señales que integran para 3 hidrógenos, por lo cual el anillo B se encuentra trisustituido, la ubicación de los grupos metoxilo se puede determinar por la constante de acoplamiento. Los posibles patrones de sustitución de los grupos metoxilo en el anillo B, se muestran en el esquema 6.

Esquema 6. Fórmulas posibles de patrones de sustitución de los grupos metoxilo



C): $J_{2'6'}$ = meta, $J_{2'5'}$ = para y $J_{5'6'}$ = orto

D): $J_{4'5'}$ = orto, $J_{4'6'}$ = meta y $J_{5'6'}$ = orto

E): $J_{3'5'}$ = meta, $J_{3'6'}$ = para y $J_{5'6'}$ = orto

F): $J_{2'4'}$, $J_{2'6'}$ y $J_{4'6'}$ = meta

G): $J_{2'4'}$ = meta, $J_{2'5'}$ = para y $J_{4'5'}$ = orto

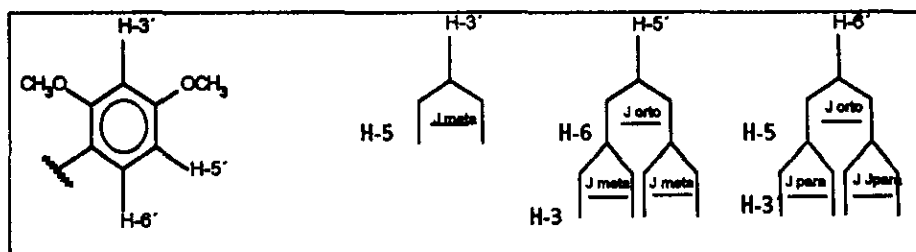
H): $J_{3'5'}$ = meta, $J_{3'4'}$ y $J_{4'5'}$ = orto

J_{orto} = 6-9 Hz

J_{meta} = 1-3 Hz

J_{para} = 0-1 Hz [37]

Dentro de las posibles asignaciones mencionadas, la estructura parcial D queda descartada, ya que al ubicar a los grupos metoxilo en las posiciones 2' y 3' se observarían dos grupos de señales con la siguiente multiplicidad: H-4' (*dd*, $J = \text{orto y meta}$), H-5' (*t*, $J = \text{orto}$) y H-6' (*dd*, $J = \text{orto, meta}$), resultando once señales, lo cual no está de acuerdo con lo observado en el espectro correspondiente. Igual razonamiento permite eliminar la estructura parcial E, dicho patrón de sustitución generaría diez señales como se ilustra en el esquema 7.



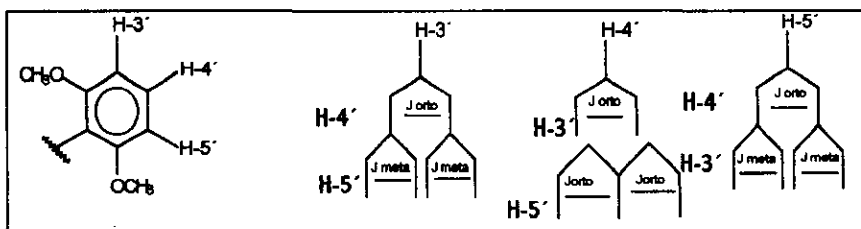
Esquema 7. Ubicación de los grupos metoxilo en las posiciones 2' y 4'.

Con respecto a la fórmula parcial F se puede mencionar que en la zona del espectro correspondiente a los aromáticos, se esperarían observar 4 señales que se asignarían al acoplamiento de H-2' con H-4' y viceversa. La multiplicidad observada y el desplazamiento químico de H-6' deberá de ser igual al de H-2', debido al plano de simetría existente en el anillo B, la presencia de dicho elemento de simetría genera un patrón de acoplamiento del tipo A_2B , el cual deberá mostrar un triplete para H-2' y H-6' y para H-4' como un doblete, todas las constantes de acoplamiento son del tipo meta, lo cual no es congruente con las J_{orto} observadas en el espectro de la molécula.

La fórmula parcial G teóricamente deberá de mostrar ocho señales, lo cual estaría de acuerdo con el espectro de la sustancia en discusión, ya que se observarían: H-2' (*d*, $J = \text{orto}$),

H-4' (*dd*, $J=$ *orto* y *meta*) y H-5' (*d*, $J=$ *orto*); sin embargo, el desplazamiento químico para los hidrógenos no correspondería a los mostrados en el espectro 9.

La fórmula parcial H₁ muestra una multiplicidad como se ilustra en el esquema 8, que corresponde a un tipo de sustitución A₂B, el plano de simetría que presenta el anillo B indica que los hidrógenos H-3' y H-5' son magnética y químicamente equivalentes, lo cual simplificaría el número de señales a siete y por lo tanto no concuerda con el espectro 9.



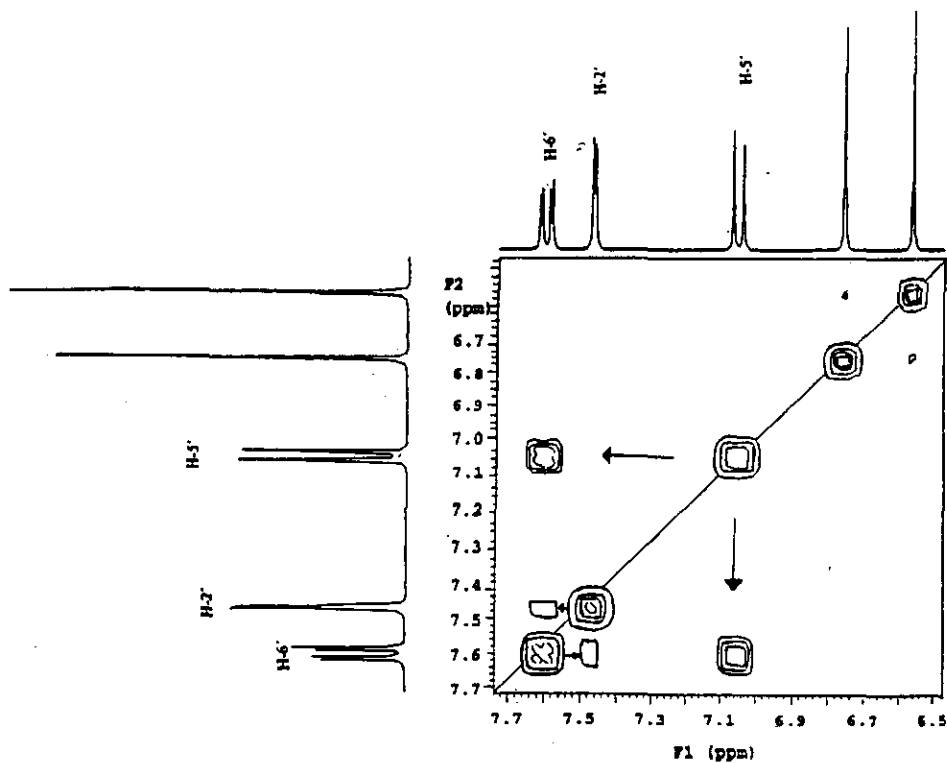
Esquema 8. Ubicación de los grupos metoxilo en las posiciones 2' y 6'.

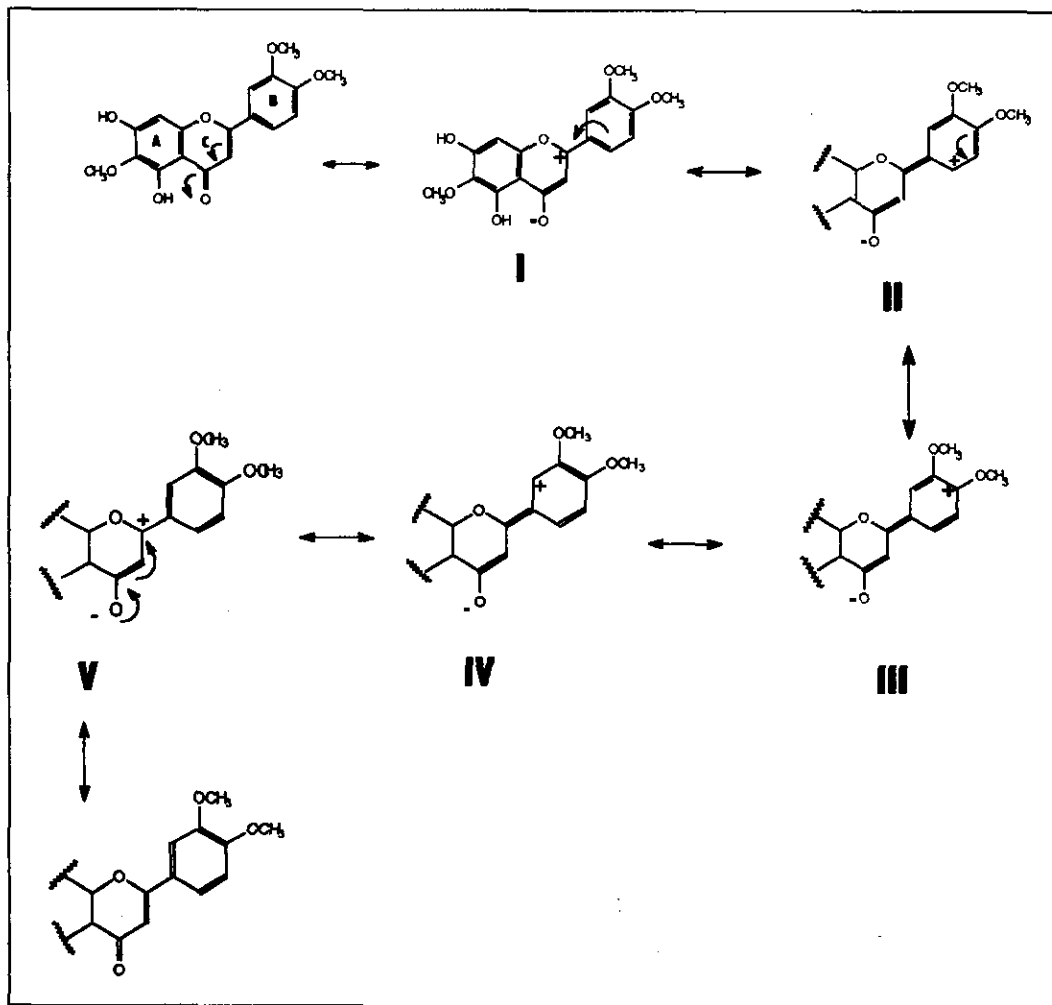
La fórmula parcial C, muestra un patrón de sustitución acorde con el espectro de resonancia para la sustancia en discusión. Al H-6' se le asignó la señal en δ 7.60 (*dd*, $J=$ 8.6 y 2.1), la cual se acopla con H-2' y H-5', de acuerdo con su espectro COSY (ver esquema 9). Al H-2' se le asignó la señal de δ 7.47 ($J=$ 2.1 Hz), mientras que al H-5' el doble (*d*) en δ 7.06 ($J=$ 8.7 Hz).

Los desplazamientos químicos asignados a H-2' y H-6' están de acuerdo con las formas resonantes que se muestran en el esquema 10, donde se observa en las formas resonantes II y IV una deficiencia electrónica para dichos hidrógenos, la diferencia en desplazamiento químico de H-2' con respecto a H-6' se debe al efecto electrodonador del grupo metoxilo de la posición 3', mientras que el H-5' se encuentra más protegido como se puede justificar al observar las formas resonantes descritas en dicho esquema.

ESTO TENDRÁ QUE SER
SALVO DE LA BIBLIOTECA

Esquema 9. Espectro COSY que muestra los acoplamientos de H-6' con H-2' y H-5' de la estructura química de la Eupatulina.





Esquema 10. Estructuras resonantes que están de acuerdo a los desplazamientos químicos de la fórmula parcial C.

Finalmente, la señal en δ 6.76 corresponde al hidrógeno de la posición 8. El desplazamiento químico a campo alto de este hidrógeno bencílico se debe a la alta densidad electrónica que genera los sustituyentes del anillo A.

Con base en lo anterior, se llegó a la conclusión que la sustancia de *C. jorullense* era la eupatulina (3', 4', 6 - Trimetoxi - 5,7 -dihidroxi flavona (III), fig. 5, previamente aislada en otras especies de la familia Compositae.

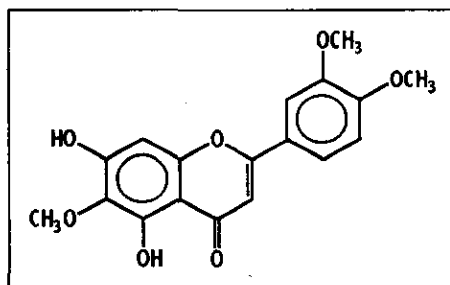


Fig 5. Estructura química de la Eupatulina (3', 4', 6-Trimetoxi-5,7-dihidroxi flavona (III)

IX.5 Obtención de la 3', 4', 6, 7 - Tetrametoxi -5- hidroxiflavona (I)

El tratamiento de la eupatulina (3', 4', 6- Trimetoxi - 5, 7- dihidroxiflavona (III) con CH_2N_2 en éter etílico a 0°C permitió el aislamiento de un sólido amarillo de pf. 183-186°C. En su espectro de RMN. ^1H (espectro 2), se observa una señal simple adicional en la región de los metoxilos aromáticos; lo cual indica que se llevó a cabo la metilación del grupo hidroxilo de la posición número siete. La dificultad de poder metilar la posición 5, se debe a la quelación del hidrógeno con el grupo carbonilo del C-4, esto se comprueba por la señal simple que aparece en $\delta = 12.76$, por lo anterior se llegó a la conclusión que el producto obtenido de la reacción era el 3', 4', 6, 7 - Tetrametoxi - 5 - hidroxiflavona (I) (Fig. 6).

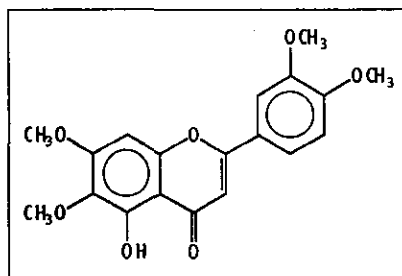


Fig. 6 Estructura química de la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I).

IX.6 Obtención de la 3',4',3,6,7-Pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV)

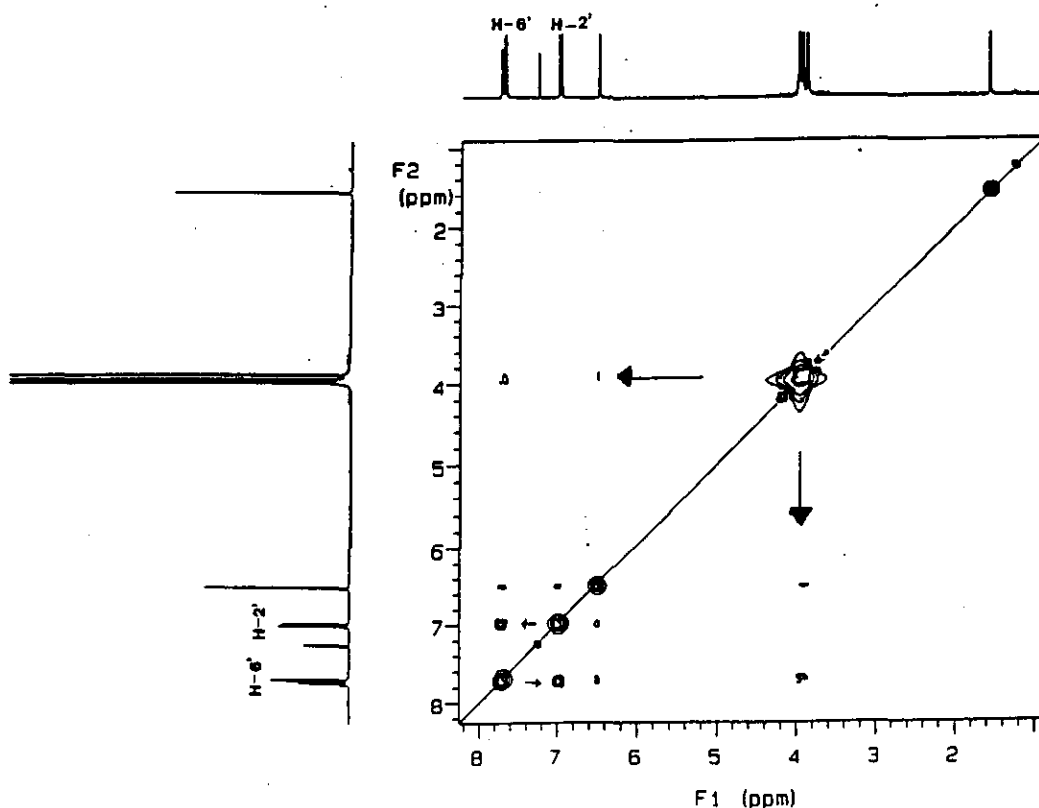
Del tratamiento del sólido descrito en el diagrama 7 (pp. 61) que fue sometido a hidrólisis con HCl en EtOH, se obtuvo un sólido amarillo que muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un ión molecular de m/z 388, al que se le puede asociar una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_8$ ($\Omega = 11$), y que da prueba positiva con cloruro férrico al 1% en etanol.

En su espectro de IR (espectro 11), se observan en 1768 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} la $\nu(C=O)$, a 3597 cm^{-1} y 3531 cm^{-1} se observan la $\nu(O-H)$ y en 1593 cm^{-1} la $\nu(C=C)$, éstas longitudes de onda sugieren la presencia de un grupo hidroxilo que forma un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de la posición 4, por lo que la coloración café que resulta al revelar con cloruro férrico en la CCF indica claramente que se trata de un flavonoide.

En su espectro de RMN. 1H (espectro 13) se observan las señales características para dicho esqueleto. En δ 12.61 (C_5-OH) y entre δ 3.87 - 3.97, se observan cinco señales simples, que por su desplazamiento químico corresponden a metilos que forman parte de un fenil- metil -éter. En la región de los aromáticos se observa un patrón de sustitución para el

anillo B, el cual se encuentra trisustituído, en δ 6.99 se observa una señal doble ($J = 8.4$ Hz) que corresponde al H-5', en δ 7.73 aparece una señal doble de doble (*dd*) que corresponde al H-6' con $J_{orto} = 9$ Hz y $J_{meta} = 2.1$ Hz, y finalmente la señal doble en δ 7.69 ($J = 1.8$ Hz) corresponde al H-2' del anillo B, dichos acoplamientos pueden ser corroborados en su espectro COSY el cual se ilustra en el esquema 11.

Esquema 11. Espectro COSY de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV), que muestra los acoplamientos del H-2' y H-6'.



En su espectro de masas (espectro 12) se observa un fragmento de m/z 373, el cual es característico del anillo A metoxilado en la posición 6. Esto sugiere como única posibilidad, que la señal en δ 6.51 corresponde al H-8. Por lo tanto, el grupo metoxilo restante puede localizarse en la posición 3, lo cual está de acuerdo con su espectro de resonancia, ya que no se observa ninguna señal para este hidrógeno vinílico.

Con base en lo anterior, se llegó a la conclusión de que la sustancia aislada es la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxi-5-flavona (IV). Fig. 7

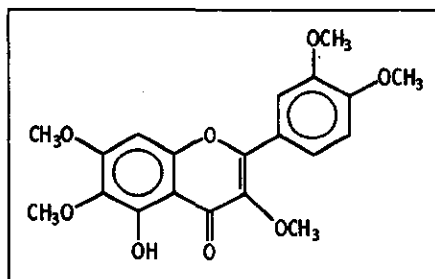


Fig. 7. Estructura química de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxi-5-flavona (IV)

IX.7 Obtención de la Hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-trihidroxi-5-flavona (II)

Al igual que las sustancias descritas anteriormente, en su espectro de IR (espectro 4), se observan las bandas (1660 cm^{-1} y 1610 cm^{-1}) correspondientes al grupo carbonilo del C-4, el cual interacciona con el hidrógeno del grupo hidroxilo del C-5. Además a 3368 cm^{-1} se observa la presencia de un grupo hidroxilo ν (OH).

Lo anterior se comprueba en su espectro de RMN.¹H (espectro 5) donde se observan 2 señales simples en aproximadamente 13 y 9.7 ppm, que corresponden a los hidrógenos del grupo hidroxilo del C₅-OH y C₇-OH respectivamente.

La presencia de un grupo metoxilo en el anillo A ($\delta = 3.97$) fue corroborado por el fragmento de m/z 271, que corresponde a la pérdida de un grupo metilo (15 uma). De ahí que la señal $\delta = 6.54$ corresponde al hidrógeno del C-8, para generar la fórmula parcial que se ilustra en la fig.8.

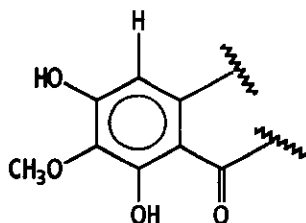


Fig. 8. Fórmula parcial del anillo A

La señal simple que aparece en δ 6.49, se asignó al hidrógeno vinílico del C-3, lo cual indica que el esqueleto base es el de una flavona. Donde el anillo B, muestra un patrón de sustitución diferente a los otros flavonoides aislados de *C. jorullense*, ya que en la región de los hidrógenos aromáticos se observa una multiplicidad diferente. Para la sustancia en cuestión se observa que éstas señales son simétricas, lo cual indica que los hidrógenos son química y magnéticamente no equivalentes, formando un sistema del tipo AA'BB'[AB] [38]. De ahí que las señales en δ 7.75 ($J=8.7$ y 2.1 Hz) correspondan a los hidrógenos H-2' y H-6', mientras que en δ 6.96 ($J=9$ y 2.1 Hz) aparecen las señales de los H-3' y H-5'.

Con base en lo anterior se llegó a la conclusión que la sustancia aislada es la hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-trihidroxi-3', 6'-dihidroflavona (II) (Fig.9).

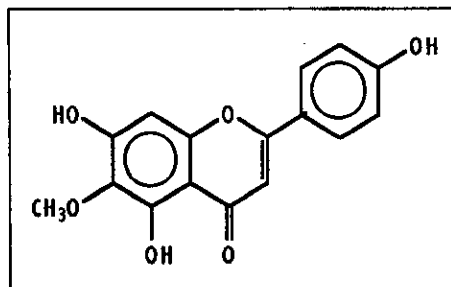


Fig. 9. Estructura química de la Hispidulina (6-Metoxi-4', 5, 7-Trihidroxiflavona (II).

IX.8 Reacción de metilación de la mezcla (SOLIDO C), obtenido de la extracción con EtOH de flores

En la reacción de metilación del sólido C impuro, se separó un sólido amarillo de pf. 193-195 °C (1C), el cual reveló amarillo con sulfato cérico de amonio. El sólido 2C fueron cristales blancos en forma ramificada, los cuales dan prueba positiva con nitrato de plata (se observa precipitación) y finalmente el sólido 3C presentó un aspecto algodonoso. Las dos últimas sustancias presentaron alta polaridad debido a su solubilidad en agua.

IX.9 Prueba de toxicidad de los extractos obtenidos frente

Artemia salina

La prueba de toxicidad frente a *A. salina* fue realizada con cada uno de los extractos obtenidos de parte aérea y flores de *Cirsium jorullense*, pero dicha prueba muestra datos no reproducibles.

La falta de reproducibilidad en estos resultados es causada principalmente por la dificultad en la solubilidad de los diferentes extractos en los disolventes empleados en esta evaluación.

Por lo anterior, no pueden darse resultados del grado de toxicidad que pudieran presentar los extractos crudos de la planta en estudio.

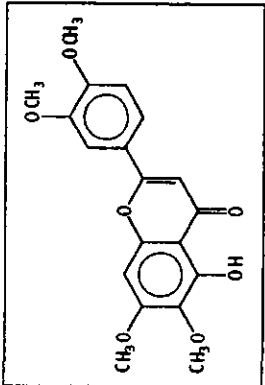
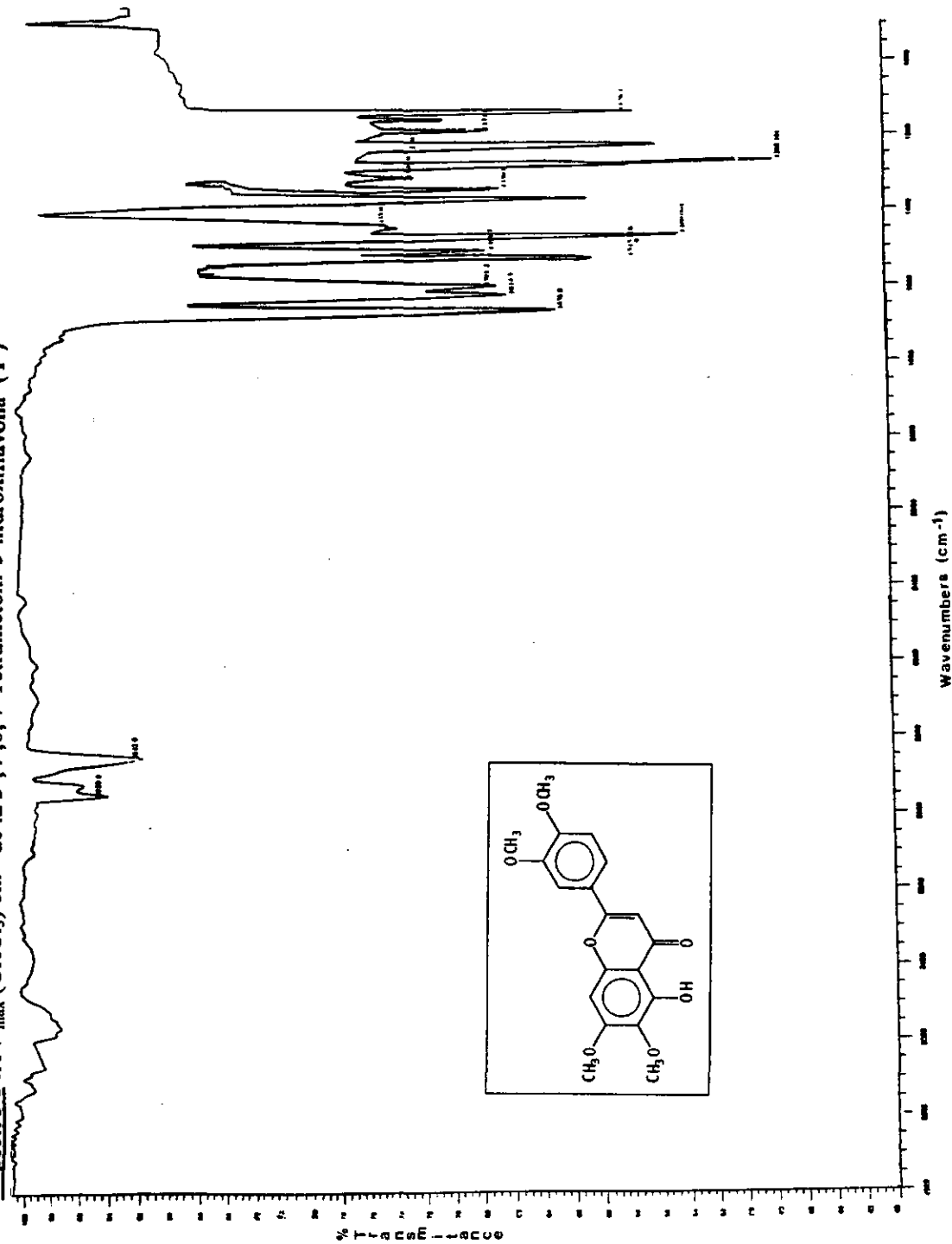
IX.10 Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos crudos obtenidos.

Los extractos que presentaron mayor porcentaje de inhibición a la inflamación fueron, los extractos de acetato de etilo de parte aérea (69.60%) y el extracto hexánico de flores (25.64%). El extracto etanólico de flores fue el que presentó el menor porcentaje de inhibición (10.29%). Lo anterior indica que la planta tiene un cierto grado de actividad antiinflamatoria, y esto puede inferirse también por el hecho de haberse encontrado en ella flavonoides como metabolitos secundarios, ya que algunos de estos compuestos presentan actividad antiinflamatorias como se describe en la literatura [32-34].

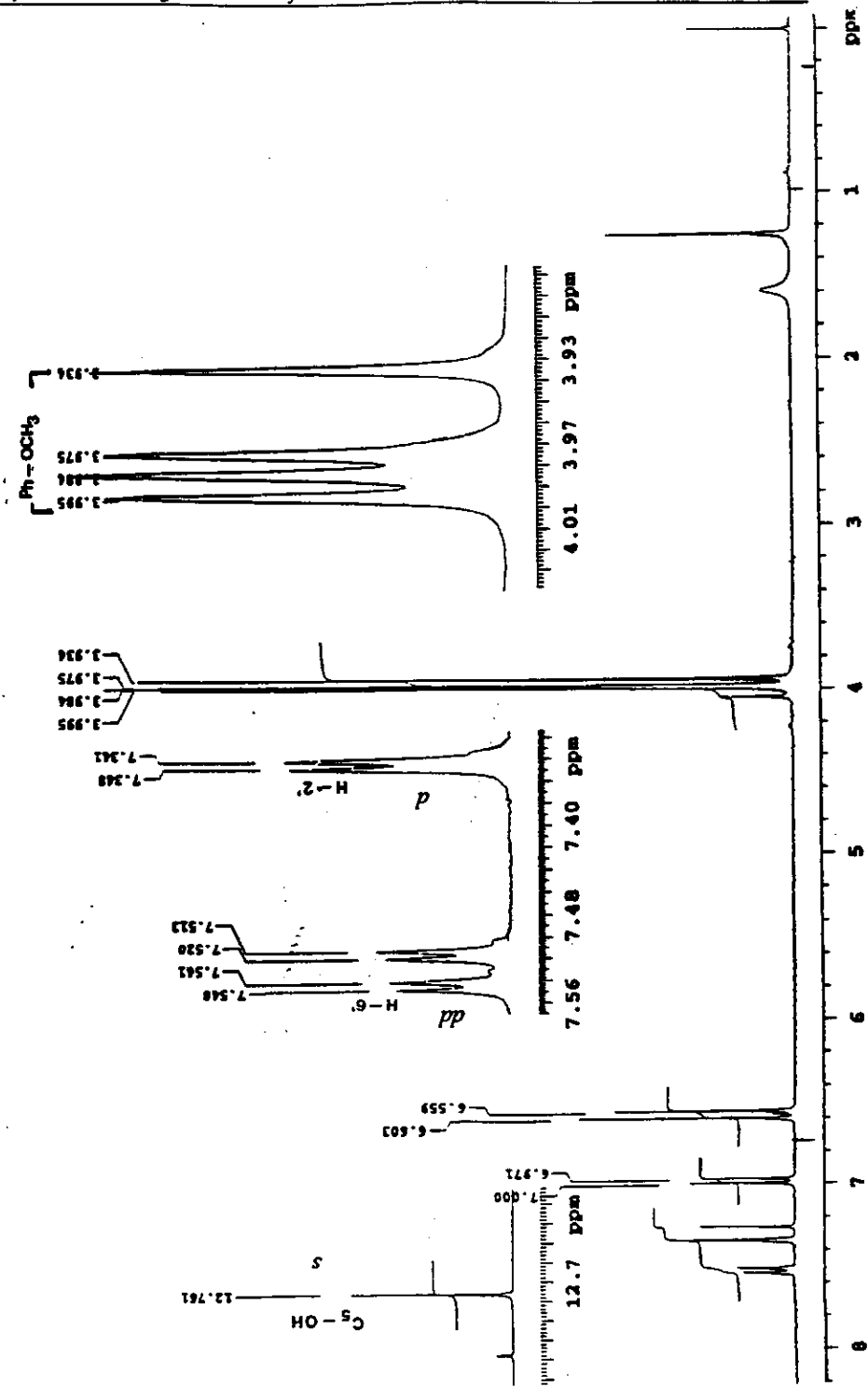
- Se realizó la búsqueda bibliográfica sobre estudios químicos y farmacológicos del género *Cirsium* no encontrándose informados estudios relacionados con *Cirsium jorullense*.
- Se obtuvieron los extractos con n-hexano, acetato de etilo y etanol de las partes aéreas; así como también el extracto hexánico, clorofórmico y etanólico de las flores de *Cirsium jorullense*, los cuales fueron evaluados frente a *Artemia salina* obteniéndose resultados no reproducibles y por lo tanto no concluyentes.
- De las pruebas antiinflamatorias, los extractos de mayor porcentaje de efectividad en la inhibición a la inflamación fueron los de acetato de etilo de parte aérea (69.60%) y el extracto hexánico de flores (25.64 %).
- Los sólidos obtenidos de la extracción con acetato de etilo (SOLIDO A) de las partes aéreas de la planta; así como los obtenidos con etanol tanto de partes aéreas (SOLIDO B) como de flores (SOLIDO C), se sometieron a una serie de procedimientos de purificación de donde se aislaron e identificaron la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I) (como producto de reacción de metilación), hispidulina (6-Metoxi-4',5,7-trihidroxi flavona (II), eupatulina (3', 4', 6-Trimetoxi-5, 7-dihidroxi flavona (III) y a la 3',4', 3, 6, 7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV).
- Por las características físicas que presentaron el resto de los compuestos aislados, se determinó que se trata de glicosiflavonoides, sustancias que presentan una alta polaridad debido a los diferentes azúcares unidos a la aglicona, los cuales quedaron en proceso e estudio.

XI. ANEXO.
ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

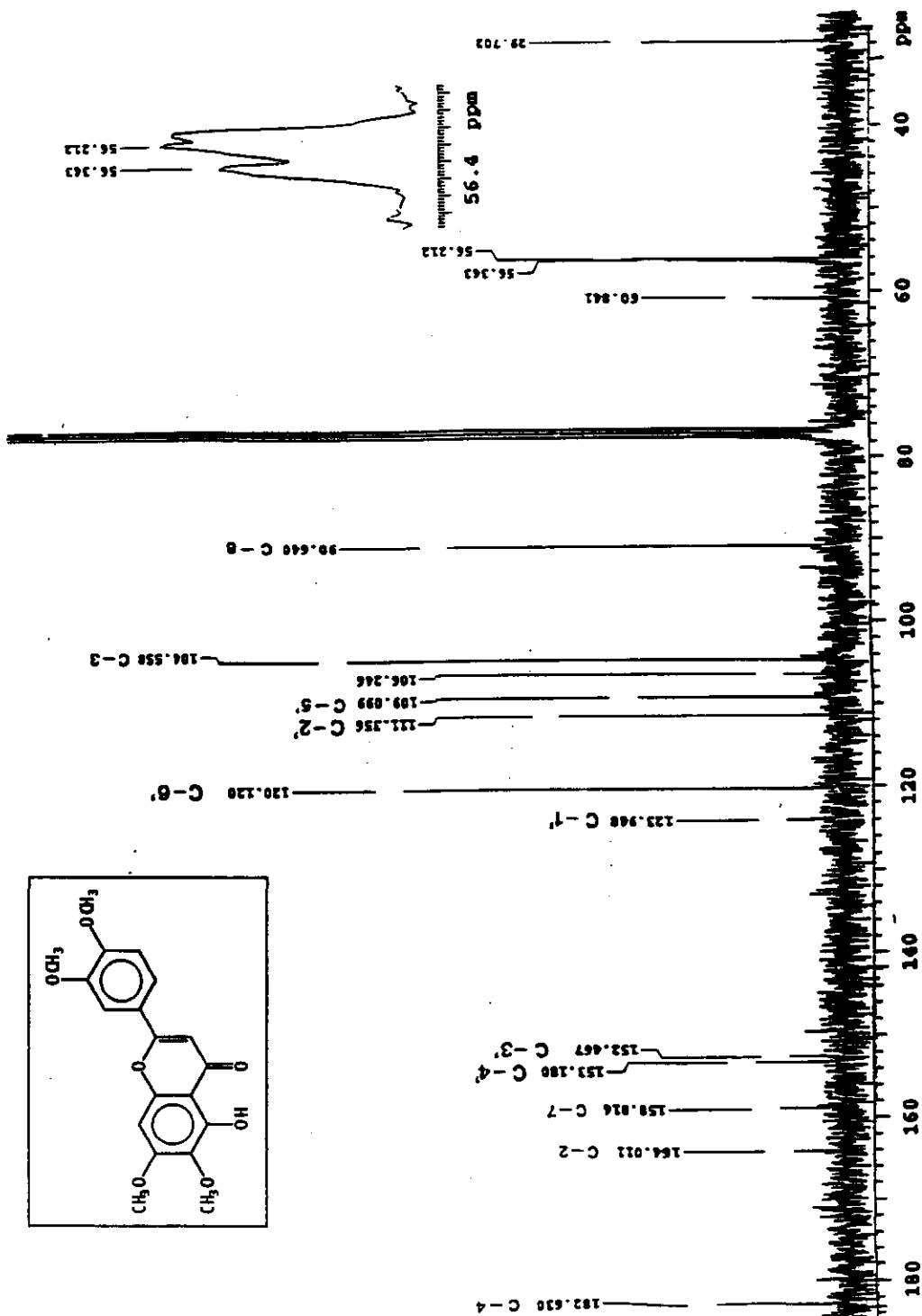
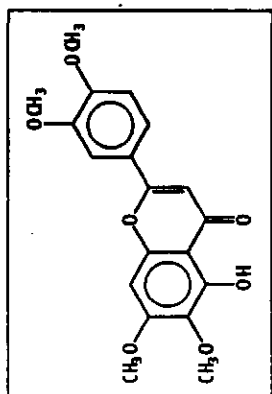
Espectro 1 IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} de la 3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxiavona (I)



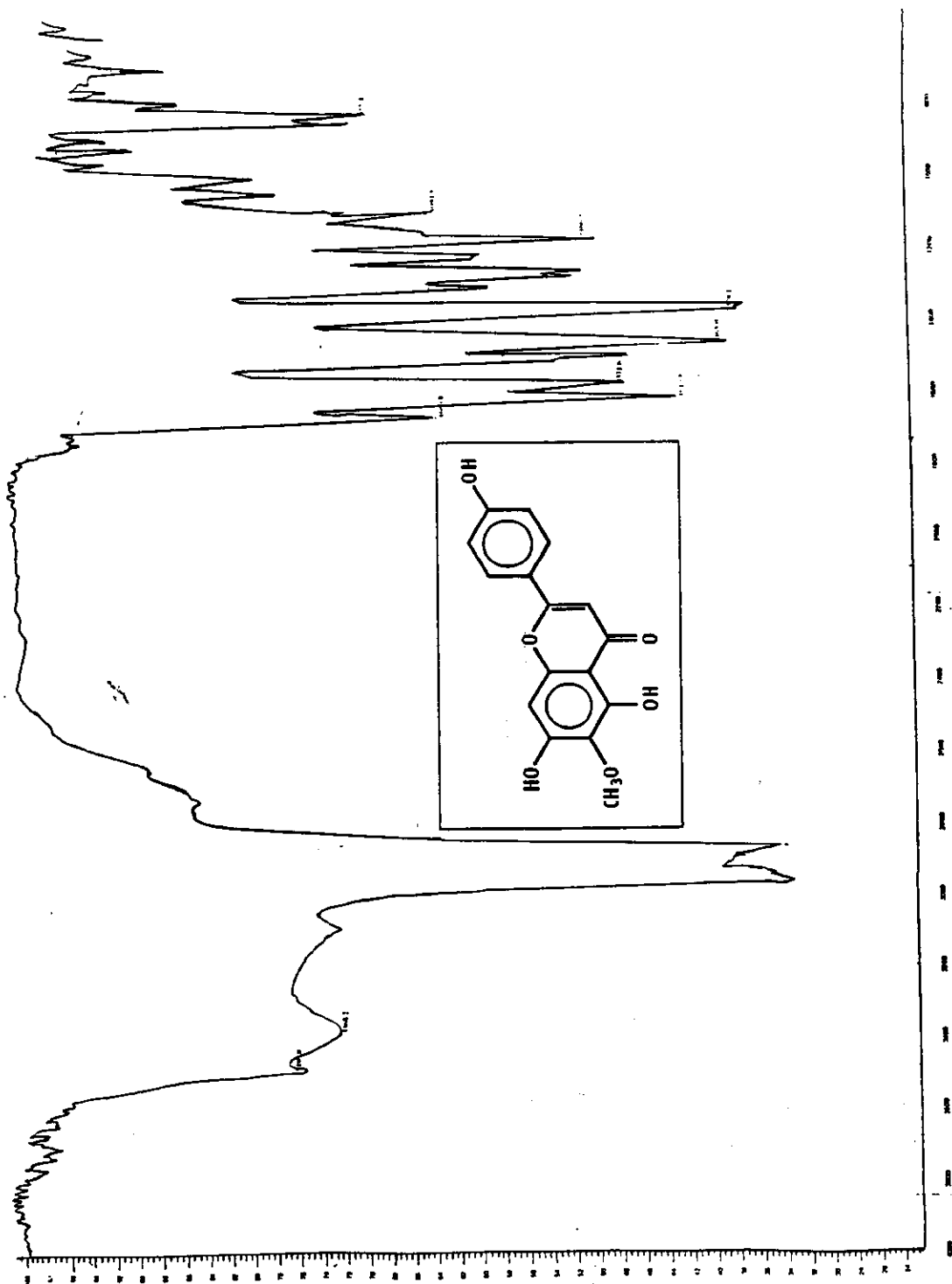
Espectro 2 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm) de la 3',4',6,7-Tetrametoxi-5-hidroxi flavona (I)



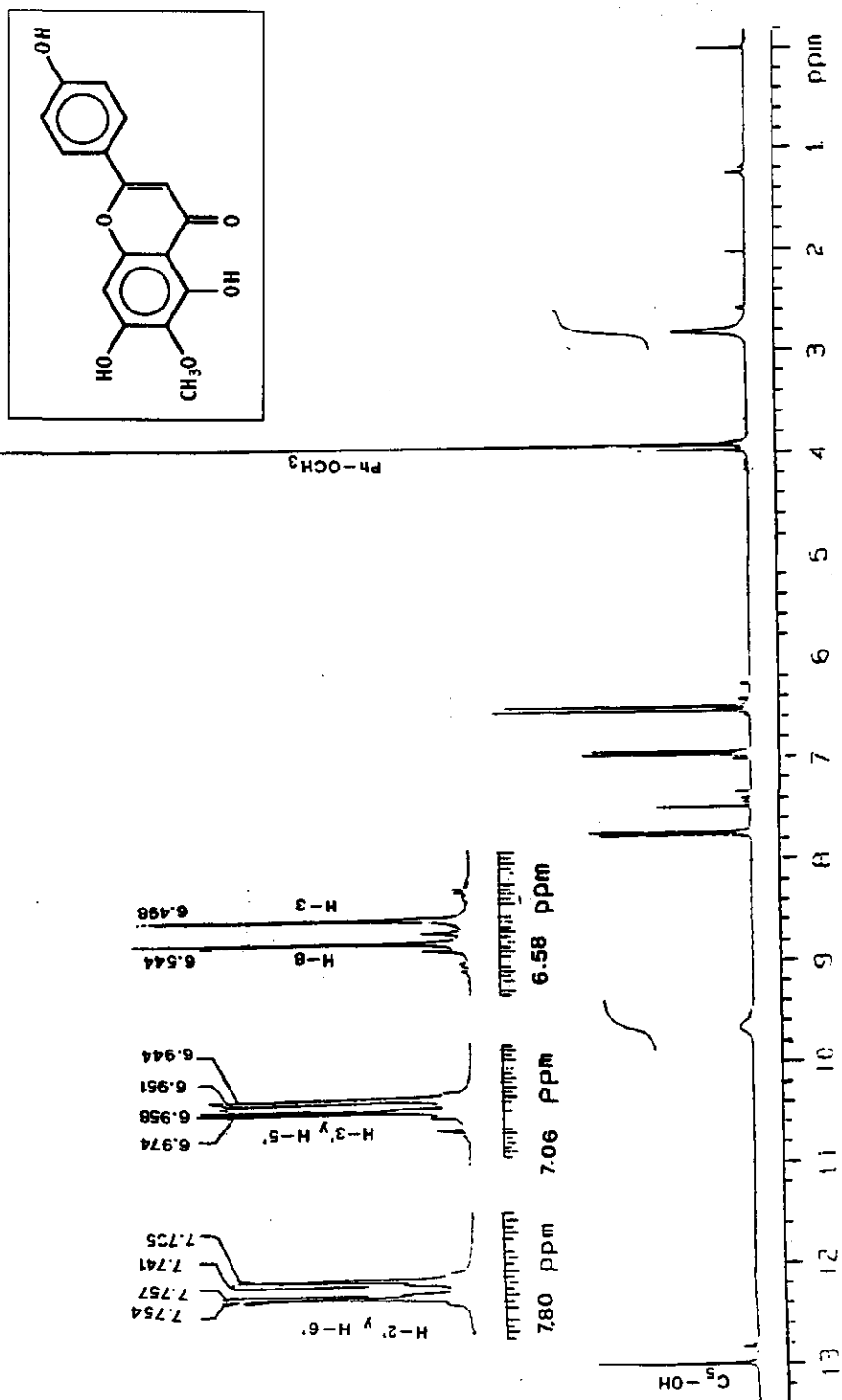
Espectro 3 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm) de la 3', 4', 6, 7-Tetrametoxi-5-hidroxiavona (1)

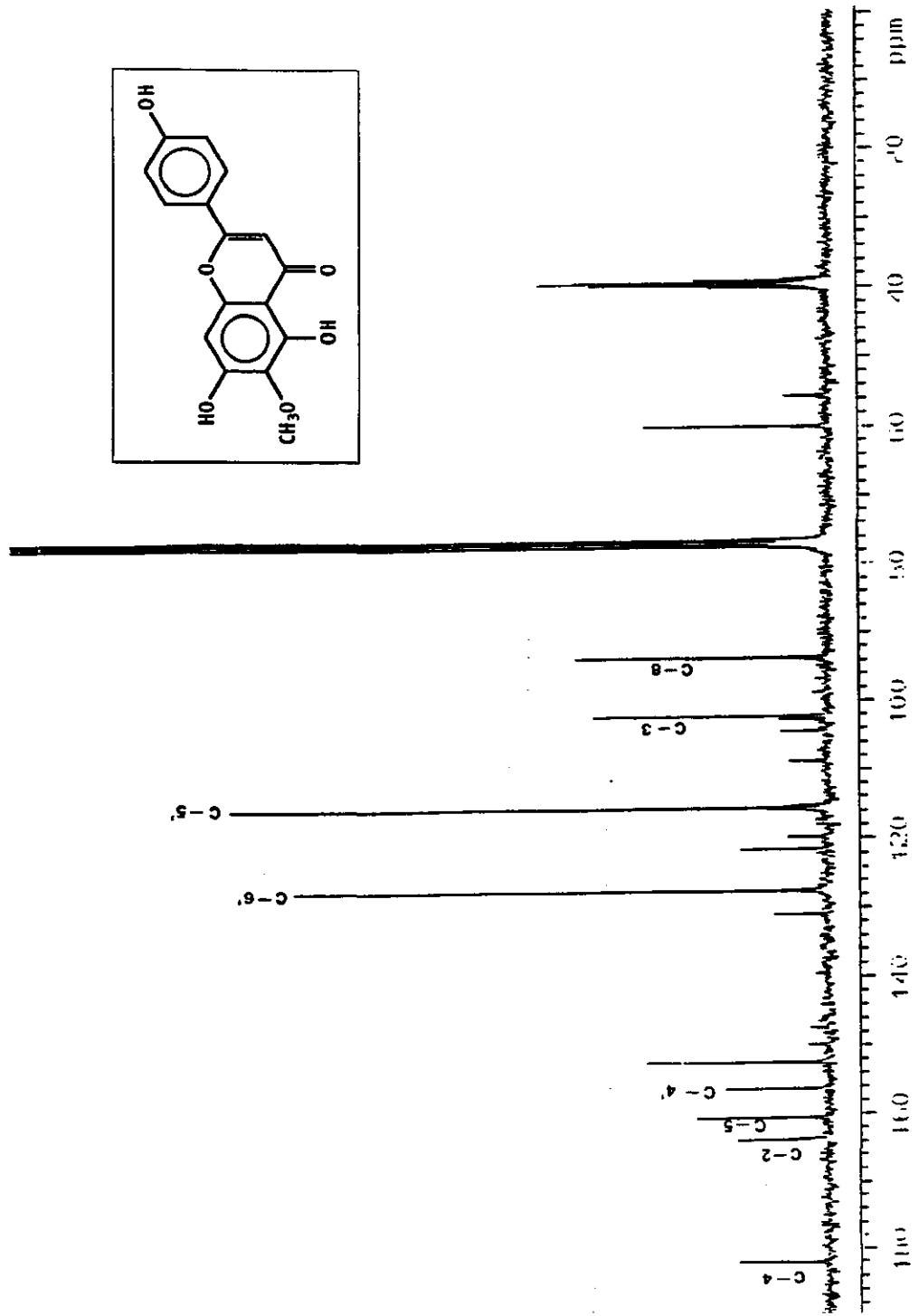


Espectro 4 IR $\nu_{\text{máx}}$ (Nujol) cm^{-1} de la Hispidulina (II)

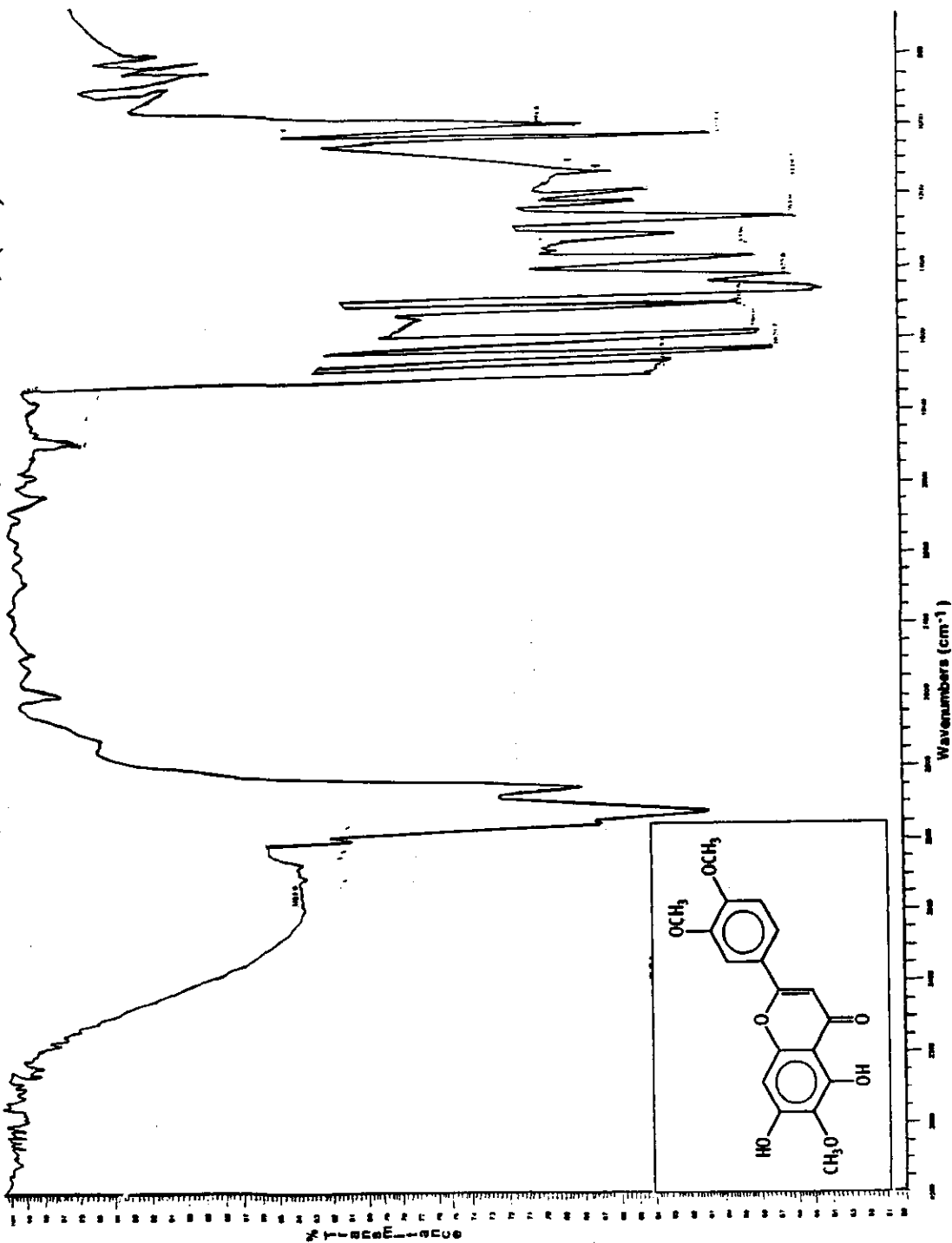


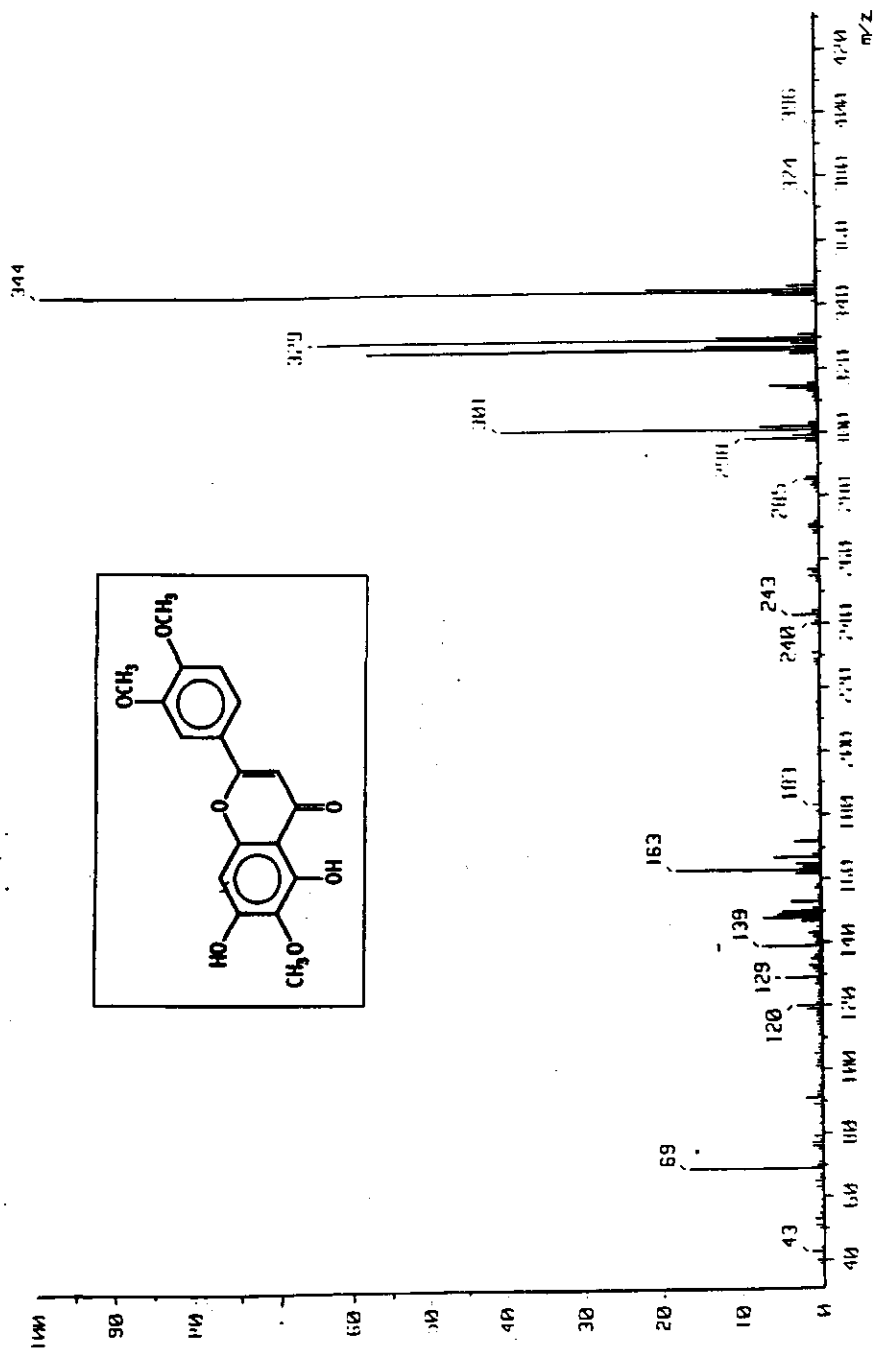
Espectro 5 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS), δ (ppm) de la Hispidulina (II)



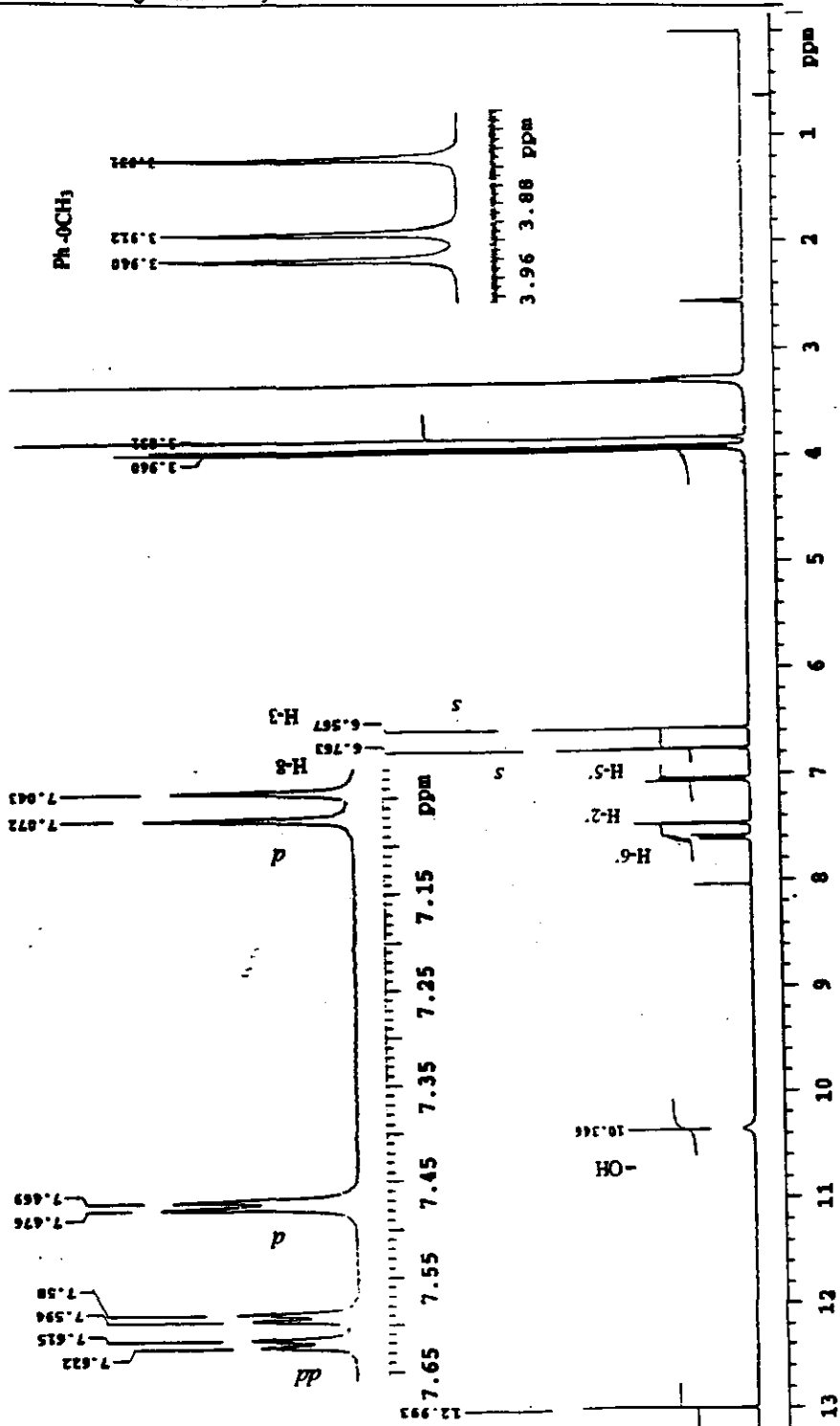
Espectro 6 RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + DMSO, TMS), δ (ppm) de la Hispidulina (II)

Espectro 7 IR $\nu_{\text{máx}}$ (Nujol) cm^{-1} de la Eupatulina (3', 4', 6-trimetoxi-5,7-dihidroxiavona) (III)

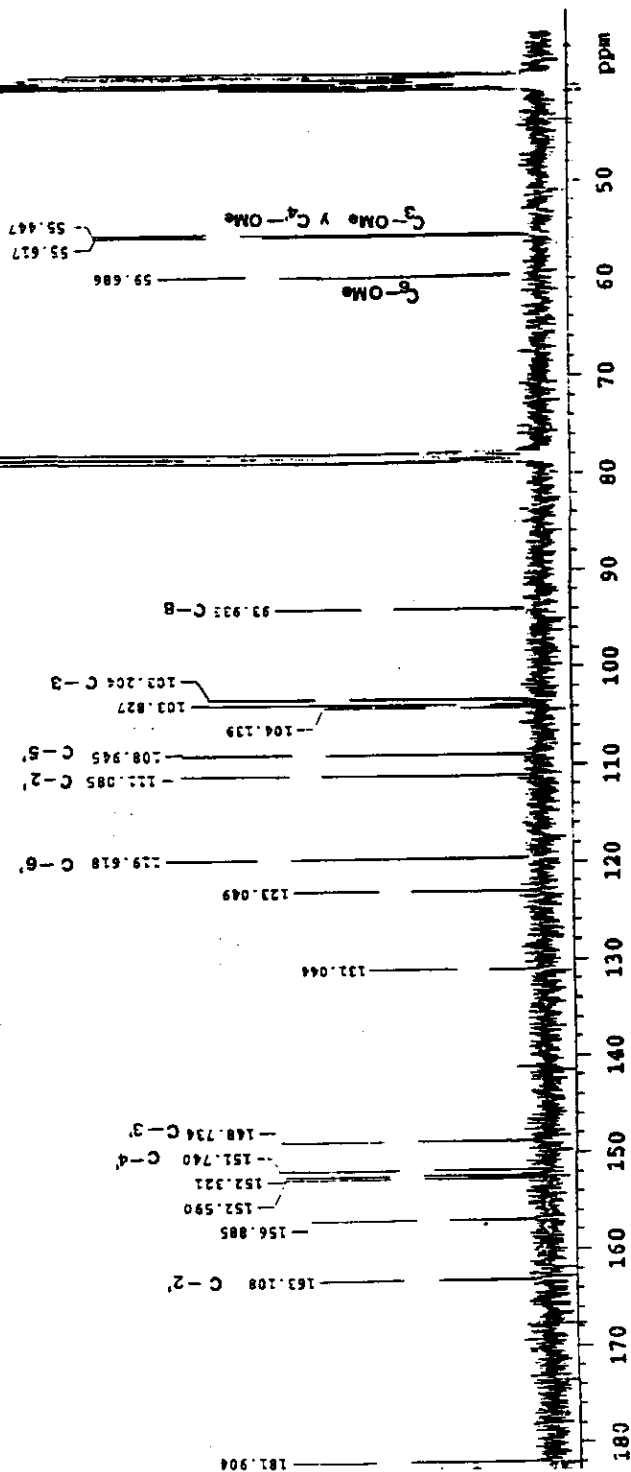
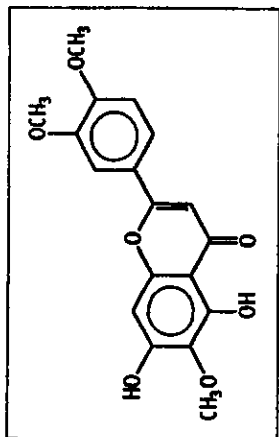


Espectro 8. EM (IE) de la Eupatulina (3', 4', 6-trimetoxi-5-7-dihidroxi-flavona) (III)

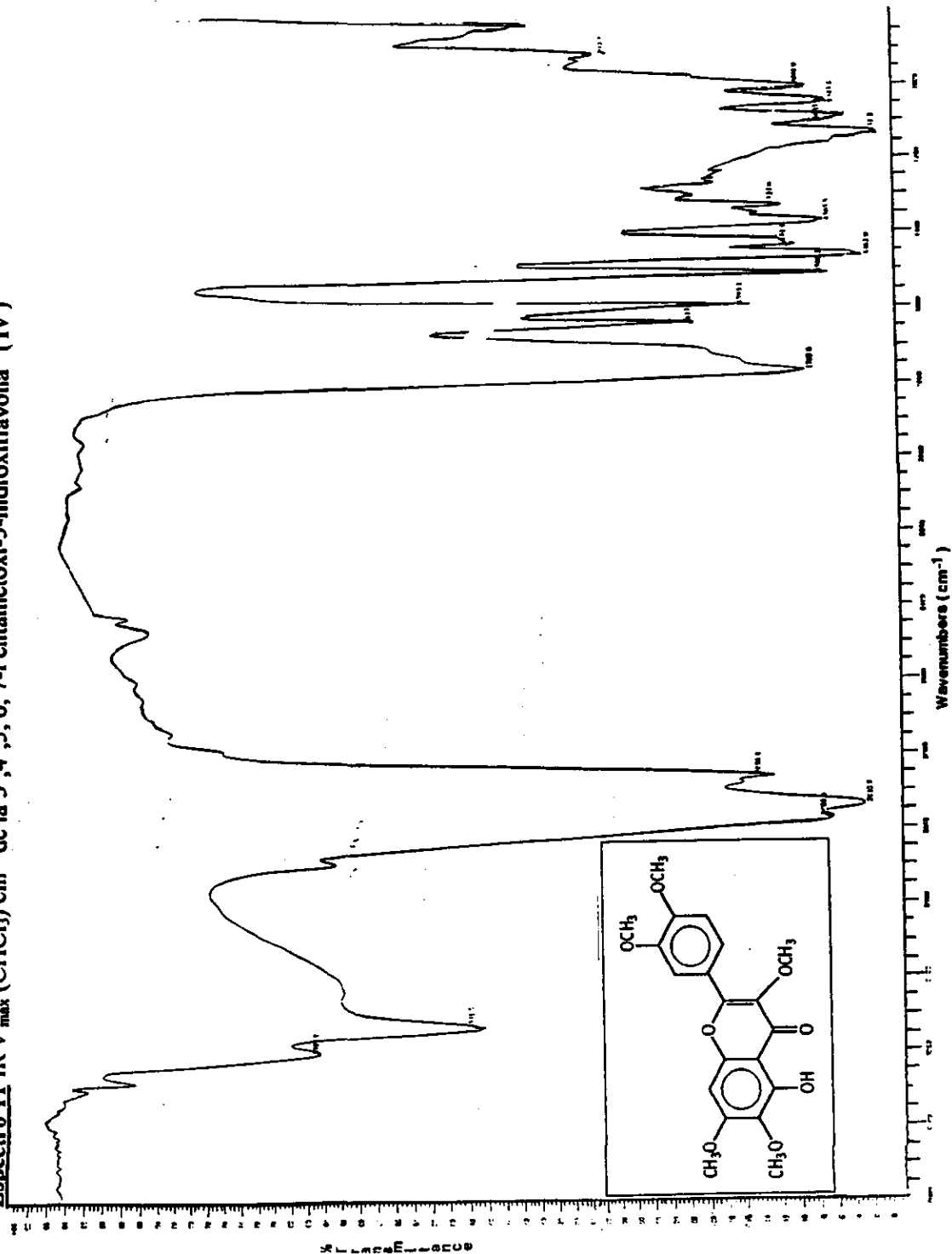
Espectro ${}^9\text{RMN-}^1\text{H}$ (300 Hz, CDCl_3 + DMSO, TMS), δ (ppm) de la Eupatulina (3', 4', 6-trimetoxi-5,7-dihydroxiflavona) (III)



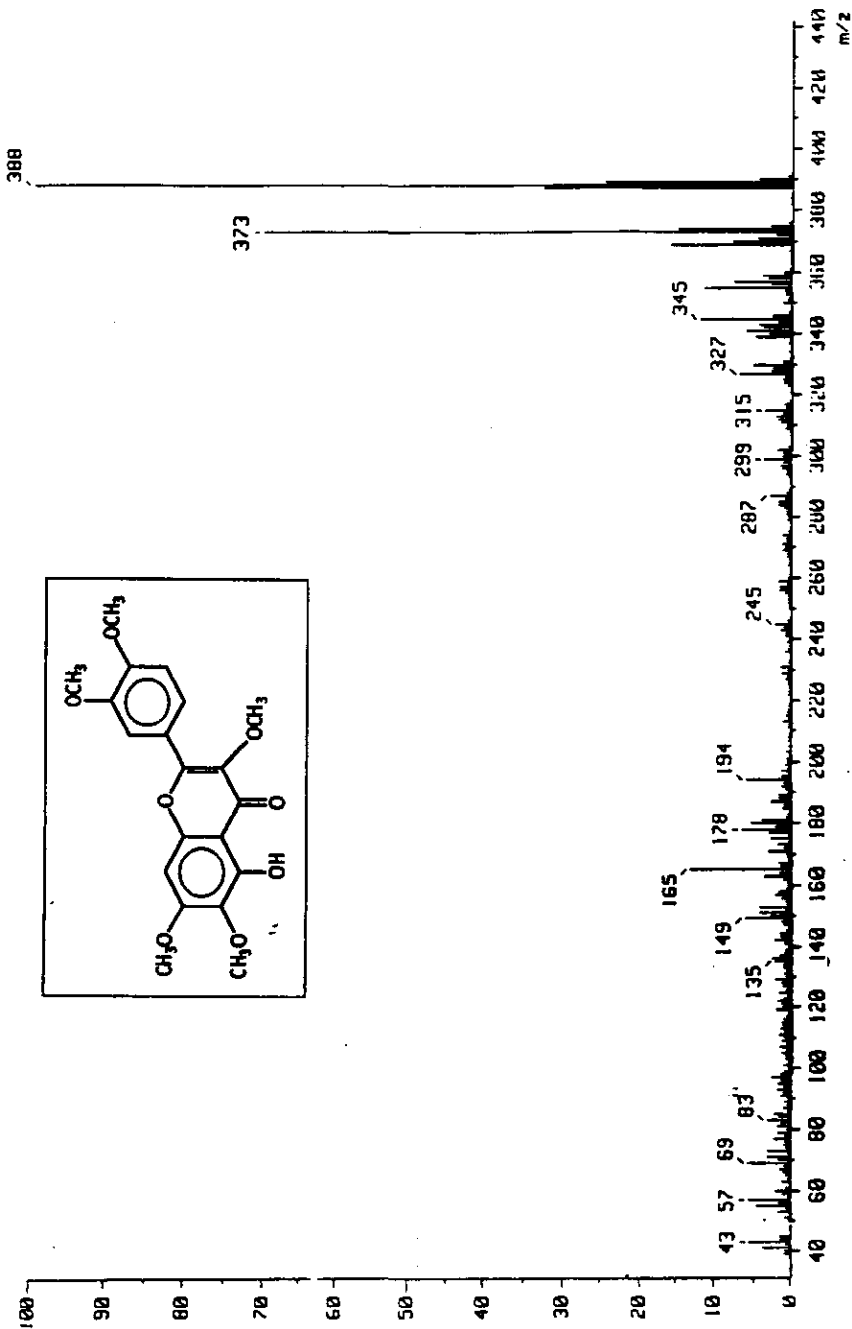
Espectro 10 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ +DMSO, TMS), δ (ppm) de la Eupatulina (3', 4', 6-Trimetoxi-5,7-dihidroxiavona) (III)



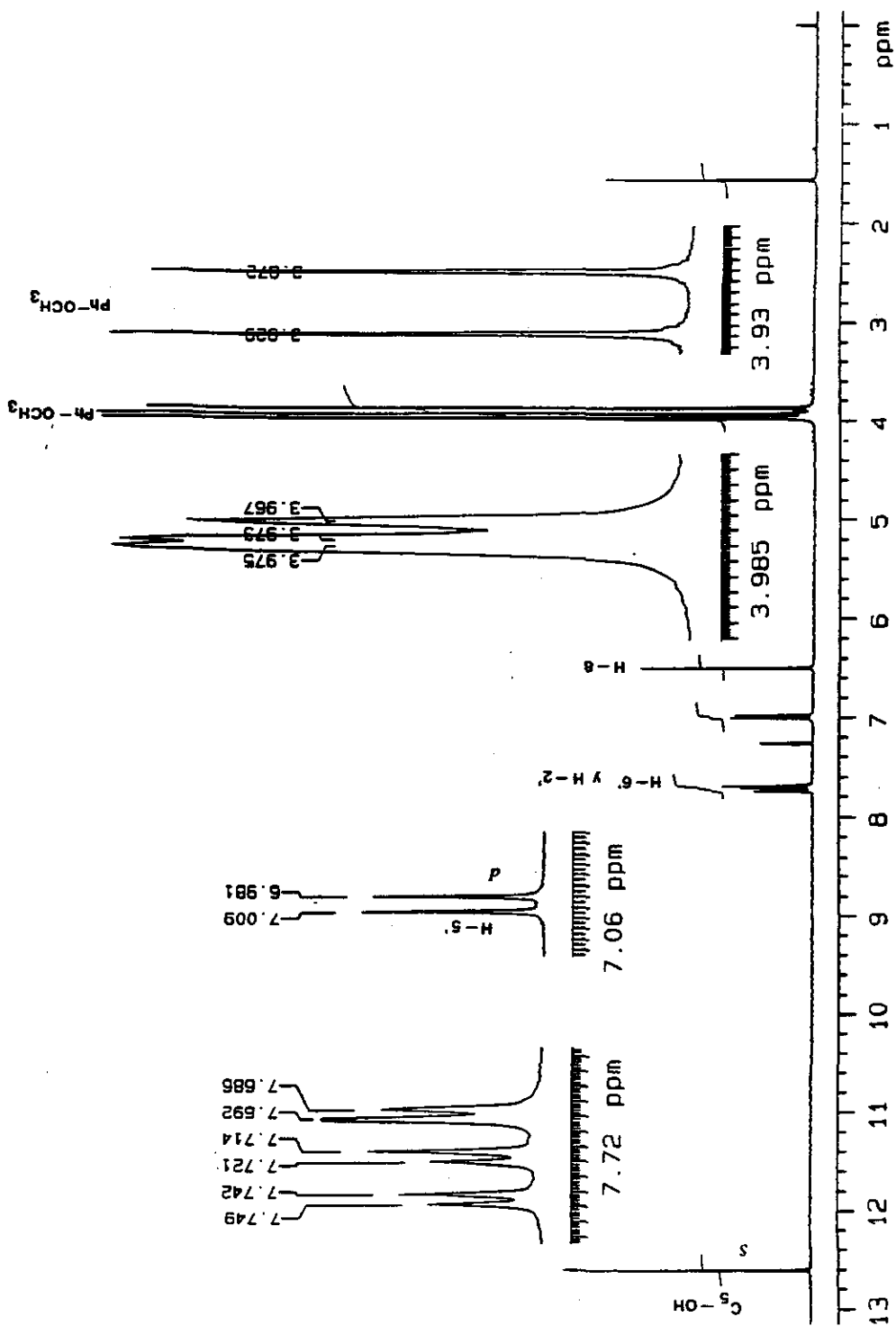
Espectro 11 IR v_{máx} (CHCl₃) cm⁻¹ de la 3',4',3,6,7-Pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV)



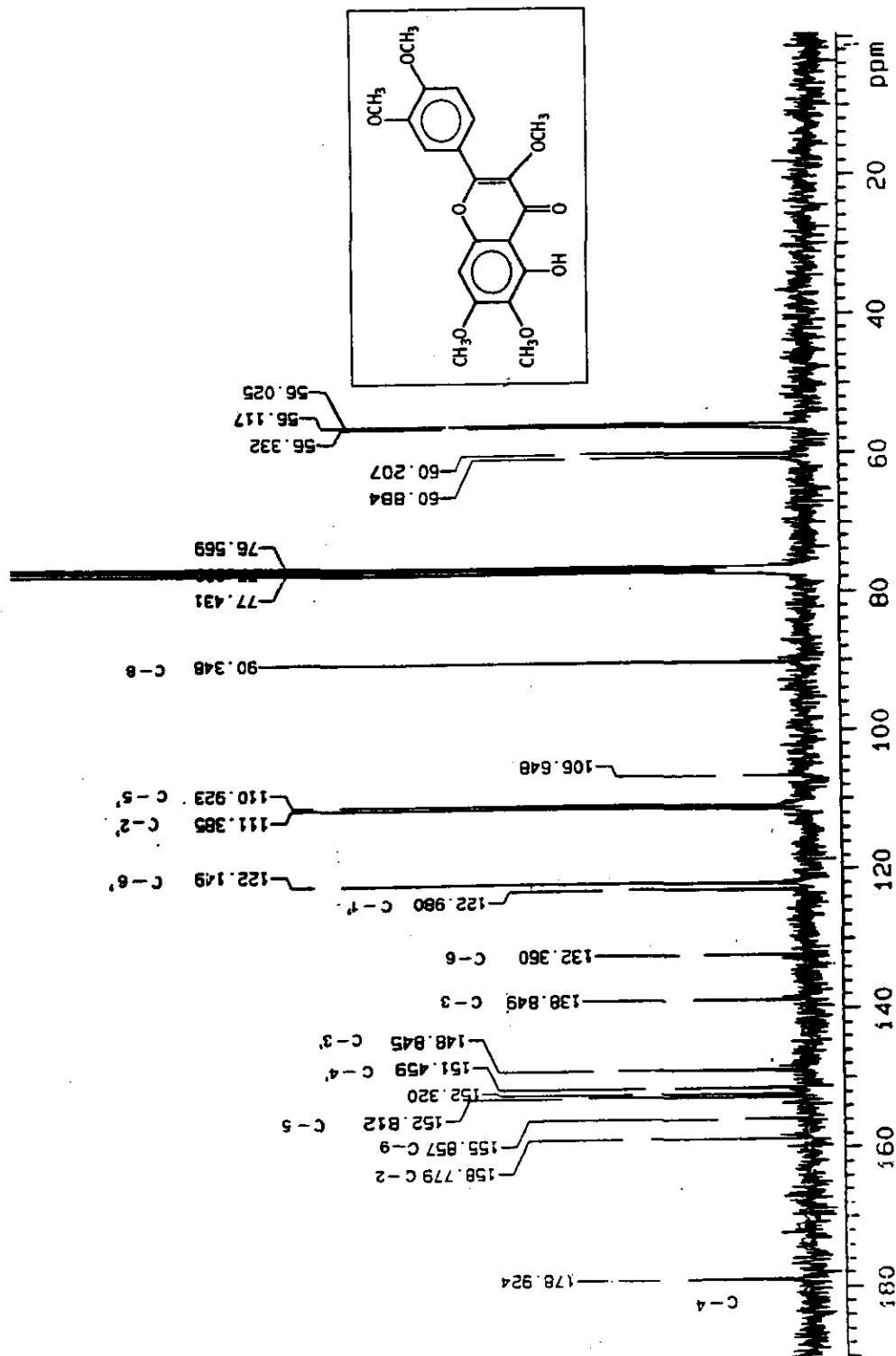
AL LazaEteecob

Espectro 12. EM (IE) de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxi flavona (IV)

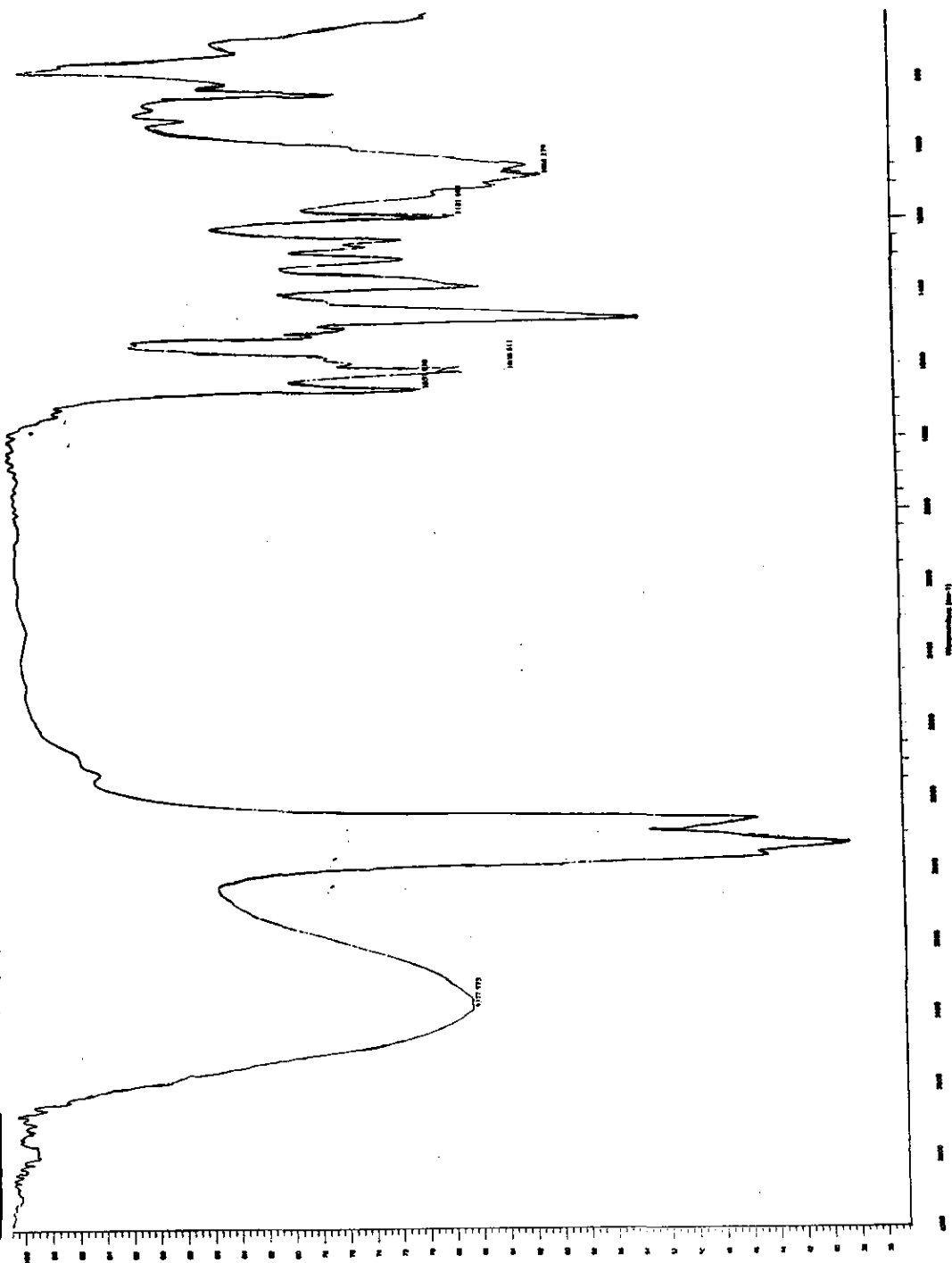
Espectro 13 RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm) de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxiavona (IV)



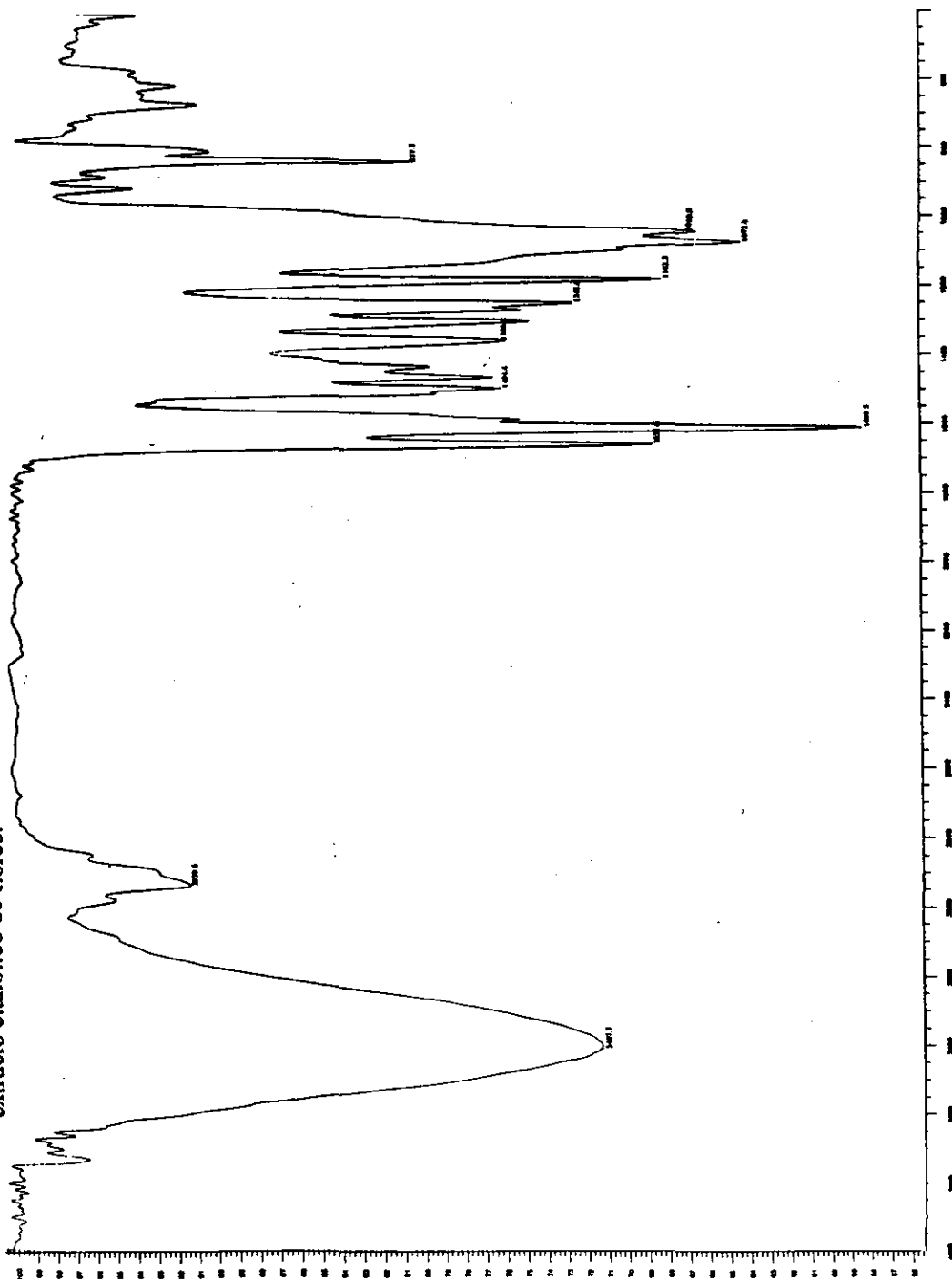
Espectro I4 RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS), δ (ppm) de la 3', 4', 3, 6, 7-Pentametoxi-5-hidroxiavona (IV)



Espectro 15 IR $\nu_{\text{máx}}$ (Nujol) cm^{-1} del sólido α , obtenido de la extracción con metanol empleando el equipo soxhlet.



Espectro 16 IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr) cm^{-1} del sólido 1C, obtenido de la reacción de metilación realizada al SOLIDO C del extracto etanólico de flores.



- 1) Cano, G., Marroquín, J.; *Taxonomía de las plantas superiores*. Ed. Trillas. México D. F. (1994), 305.
- 2) Sánchez, O.; *La Flora del Valle de México*. 5ª. ed. Ed. Herrero S.A. México (1979), 391-463.
- 3) Moreno, N.; *Glosario Botánico Ilustrado*. Compañía Editorial Continental. México (1984).
- 4) Dávila, P; Forceck, E.; *Glosario de términos agrostológicos*; Instituto de Biología de la UNAM, México (1990).
- 5) Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H y Schimper. *Tratado de Botánica*. Ed. Omega. Nueva York (1990), 889-892.
- 6) Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jaquez, P., López, M.; *Plantas medicinales del Herbario del IMSS: Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano*. México (1994).
- 7) Yue-mao, S. and Quan-zhang, M.; New Furans from *Cirsium chlorolepis*. Planta Med. **56**, [5], 472-74 (1990).
- 8) Takaishi, Y., Okuyama, T., Nakano, K., Murakami, K. And Tomimatsu, T.; Absolute configuration of a triolacetylene from *Cirsium japonicum*. Phytochemistry. **30**, [7], 2321-24 (1991).
- 9) Yano, K.; Hidrocarbons from *Cirsium japonicum*. Phytochemistry. **16**, 263-64 (1977).
- 10) Takaishi, Y., Okuyama, T., Masuda, A., Nakano, K., Murakami, K. And Tomimatsu, T.; Acetylenes from *Cirsium japonicum*. Phytochemistry. **29**, [12], 3849-52 (1990).

- 11) Park, J., Lee, J. and Choi J.; A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. Ussuriense. Phytochemistry. **39**, [1], 261-62 (1995).
- 12) Bohlmann, F. and Abraham W.; Aplotaxene epoxide from *Cirsium hypoleucum*. Phytochemistry. **20**, [4], 885-56 (1981).
- 13) Christensen, L.; Aplotaxene derivatives from *Cirsium helenioides*. Phytochemistry. **31**, [6], 2039-41 (1992).
- 14) Takaishi, Y., Okuyama, T., Nakano, K., Murakami, K., Tomimatsu, T. And Yamahara, J.; Polyolefinic compounds from *Cirsium nipponicum* roots. Phytochemistry. **30**, [5], 1539-42 (1991).
- 15) McGowan, S. G. and Wallace, J.W.; Flavonoids and phenolic acids from *Cirsium lanceolatum*. Phytochemistry. **11**, 1503-04 (1972).
- 16) Wallace, J.; Tricin-5-O-glucoside and other flavonoids of *Cirsium arvense*. Phytochemistry. **13**, 2320-21 (1974).
- 17) Sawaguchi, K., Nakao, K., Shimamura, T. and Ohsawa, K.; A new antimicrobial and Antioxidative component of extracts from the rhizomes of *Cirsium brevicaulis* A. Gray var *irumtiense* Kitam. J. Antibact. Antifung. Agents. **22**, [5], 271-75 (1994).
- 18) Gardner, R.C.; Acacetin-7-O-rutinoside and pectolinarin from *Cirsium coloradense*. Phytochemistry. **12**, 223 (1973).
- 19) Morita, N., Shimizu, M. and Arizawa, M.; Two new flavone glycosides from *Cirsium lineare*. Phytochemistry. **12**, 421-423 (1973).
- 20) Aguilar, A., Camacho, J.R., *Información Etnobotánica*. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México (1994), 42-43.

- 21) Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Ed. Acribia. Zaragoza, España (1991); 125-187.
- 22) Markham, K. R.; *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press. London (1982), 52-53.
- 23) Azcon-Bieto, J., Talon, M.; *Fisiología y Bioquímica Vegetal.*; Ed. Interamericana, Mc. Graw-Hill. España (1996), 259-262
- 24) Rodríguez, S.; *Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis (Rose)*. Tesis profesional en Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. (1995).
- 25) Yúfera, E.; *Química Orgánica Básica y Aplicada. De la molécula a la industria*, Ed. Reverté. Tomo II, España (1995), 915-25.
- 26) Jork, H., Funk, W., Fisher, W., Wimmer, H.; *Thin-Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods*. Vol. 1a. Ed. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany (1990).
- 27) Lehninger, A.; *Principios de Bioquímica*, Ediciones Omega. Barcelona (1991).
- 28) Mc Laughlin, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine Shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In *Methods in Plant Biochemistry*.(Dey, P. M. and Harborne, J.B., eds). Vol 6. Assays for Bioactivity. Academic Press. USA (1991), pp. 8.
- 29) Ramzi, S., Vinay, K., Stanley, L., *Robbins, Patología Estructural y Funcional*. 5ª. ed. Interamericana. Mc Graw Hill. España (1995), 57-61.

- 30) Schaechter, M.; *Microbiología, Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas*; 2ª. ed. Ed. Médica Panamericana. Argentina (1994), 111-16.
- 31) Tortora, G., Anagnostakos, N.; *Principios de Anatomía y Fisiología*; 5ª ed. Harla. México (1989), 687-90.
- 32) Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. and Tamura, T.; Triterpene alcohols from the flowers of *Compositae* and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, **43**, [6], 1255-60 (1996).
- 33) Recio, M., Giner, R., Máñez, S., Gueo, J., Julien, H., Hostettmann, K. and Rios, J.; Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* **61**, 9-12 (1995).
- 34) Martínez- Vázquez, M., Ramírez, T., Lastra and Bye, R.; A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of Pectolarin isolated from *Cirsium subcoreaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Med.* **64**, 134-7 (1998).
- 35) Coll, J.C. and Bowdu, B.F. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the separation of terpene mixture. *J. Nat. Product.* **49**, 934-36 (1986).
- 36) Nakanishi, K.; *Infrared Absorption Spectroscopy*. 2ª ed. Holden Day. INC, San Francisco. USA (1977).
- 37) Silverstein, R.; Bassler, G. and Morrill, T. *Spectrometric identification of organic compounds*. 4ª. Ed. John Wiley & Sons. USA (1981), 236.
- 38) Horst Friebalin. *Basic One and Two dimensional NMR Spectroscopy*. 2ª. ed. VCH Verlagsgesellschaft (Federal Republic of Germany), (1993), 112-13.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL DE APOYO

- 39) Harborne, J.C.; *Phytochemical Methods*. 2a. ed. Chapman and Hall. New York (1991).
- 40) Rydberg, J., Claudi, M., Choppin, G.; *Principles and practices of solvents extraction*. Marcel Dekker, Inc. New York (1992).
- 41) Valcárcel, C.M. y Gómez, H. A.; *Técnicas Analíticas de Separación*. Reverté. España (1988).
- 42) Perrin, D. D. and Armarego, W. L. F.; *Purification of Laboratory Chemicals*. 3a. ed. Pergamon Press. USA (1988).
- 43) Weissberger, A. (ed.); *Cristallization and recrystallization*, 5, 395 (1978).
- 44) Gringherb, N; *Modern Thin Layer Chromatography*. Chromatographic Science Series. Marcel Dekker, Inc. New York, 52, (1990).
- 45) Hostettmann, K., Hostettmann, M., Martson, A.; *Preparative Chromatography Techniques*. Springer-Verlag. Berlín GDK (1986).
- 46) Martson, A. and Hostettmann, K.; *Modern Separation Methods Natural Products Reports*. 8, 391 (1991).
- 47) Rao, C. N. R.; *Espectroscopia Ultravioleta y Visible*. Alhambra. España (1970).
- 48) Voirin, B.; UV Spectral differentiation of 5-hidroxy and 5-hidroxy-3-metoxiflavones with mono-(4'), di(3',4'), tri(3',4',5')-substituted brings. *Phytochemistry*. 22, 2107, (1983).
- 49) Werhli, F. W. and Wirthling, T.; *Interpretation of ¹³C-NMR Spectral*. Heyden, Great Britain (1978).

- 50) Levy, G. y Nelson, G.; *Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C*. Bellatierra. Madrid. (1992).
- 51) Kalinowski, H., Berger, S., Braun, S.; *Carbon-¹³ NMR Spectroscopy*. John Wiley and sons. New York (1988).
- 52) Breitmaier, E., Voelter, W.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. 3a. ed. VCH Publisher, Inc. Germany (1990).
- 53) Wehrli, F. W. and Nishida, T.; *The use of C-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry. Progress in the chemistry of organic natural products*, 36. Viena Springer-Verlog. New York (1979).
- 54) Derome, A. E.; The use of NMR Spectroscopy in the structure determination of Natural Products: Two dimensional methods. Natural Products Report. **6**, 111 (1989).
- 55) Pyrek, J. S.; (1991) Mass Spectrometry in the Chemistry of Natural Products. in: N. H. Fisher (ed). *Modern Phytochemical Methods*. Plenum Press. New York. 176.
- 56). Chistensen, L. and Jorgen, L.; Acetylenes and Related compounds in Cynareae. Phytochemistry. **29**, 9, 2753-2785 (1990).
- 57). Wallace, J.; Cirsimaritin-4'-O-rutinoside, a new flavone glycoside from *Cirsium brevistylum*. Phytochemistry. **10**, 452-454 (1971).
- 58) Safayhi, H. and Sailer, R.; Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. Planta Med. **63**, 487-493 (1997).