

00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA-INSTITUTO DE QUIMIGA
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICAS

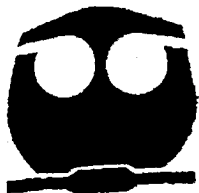
ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE DOS ESPECIES VEGETALES EMPLEADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL: *Aloysia triphylla* Y *Cirsium jorullense*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA-FARMACEUTICA)

P R E S E N T A :

Q.F.B. MARINA ESPINOZA CANO



MEXICO, D.F.

281609

2000



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Ofelia Espejo González.
VOCAL: Dr. Francisco Javier Espinosa García.
SECRETARIO Dr. Robert Arthur Bye Boettler.
PRIMER SUPLENTE: Dr. Rafael Castillo Bocanegra.
SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto de Química y en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM.

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Marina Espinoza Cano.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Guillermo Delgado Lamas.

*Doy gracias a Dios por haberme permitido culminar un objetivo
más en mi vida.*

*"La investigación científica
consiste en ver lo que todos han visto,
pero pensado en lo que nadie ha pensado."
Szent-Bjorgy*

"Si eres pequeño, alégrate, porque tu pequeñez sirve de contraste a otros en el universo; porque esa pequeñez constituye la razón esencial de su grandeza; por que para ser ellos grandes han necesitado que tu seas pequeño, como la montaña para culminar necesita alzarse entre las colinas, lomas y cerros."

Amado Nervo.

DEDICATORIAS

*A mis padres
Gracias por apoyarme
nuevamente en otro de mis objetivos
y por todos sus consejos
que me han dado.
Los amo.*

*A mis hermanos: Miguel,
Armando A. y Carlos N.*

*"Nunca desespere, pero si a eso llegas
sigue trabajando hasta llegar a tu meta,
a pesar de tu desesperación."
Burke*

A Román I.

*Por todo su apoyo incondicional
que me brindó en la realización
del presente trabajo,
pero sobre todo
por haber sido una lucecita
que Dios puso en mi camino
para que yo siguiera adelante.*

*A José Manuel
Por su amistad
y apoyo que me brindó
durante el desarrollo
del trabajo de tesis.
Por todo gracias.*

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Guillermo Delgado Lamas por su asesoría durante la realización del presente trabajo, por sus estímulos y por todo su apoyo que me brindó, gracias.

Al M. en C. Arturo E. Cano Flores por la asesoría recibida y por haberme dado un espacio en el laboratorio L-314 de la FES-Zaragoza, para el desarrollo de una gran parte del trabajo de tesis.

A la C. D. Ma. Teresa de Jesús Zaragoza Meneses y al C. D. Alfredo Sánchez Figueroa por el apoyo que me brindaron en la realización de las pruebas microbiológicas.

A la M. en C. Abigail Aguilar y Al Dr. Osvaldo Téllez por la identificación y clasificación del material vegetal.

Al jurado por sus comentarios y observaciones realizadas durante la revisión del presente trabajo y por el tiempo dedicado al mismo.

Así mismo, expreso mi agradecimiento a los Maestros en Ciencias Beatriz Quiroz, María Isabel Chavez, Rocío Patiño, María Teresa Ramírez Apan, Francisco Javier Pérez-Flores y Luis Velazco, quienes como personal académico del Instituto de Química, proporcionaron un apoyo invaluable al desarrollo del presente trabajo.

A CONACyT por el apoyo económico recibido durante la realización de mis estudios de maestría.

ÍNDICE.

Resumen	ii
Abstracts	iii
I. Introducción.	2
II. Objetivos.	5
III. Estudio químico y biológico de <i>Aloysia triphylla</i> .	6
1. Antecedentes.	8
1.1. Generalidades sobre la familia Verbenaceae.	9
1.1.1. Constituyentes químicos del género <i>Lippia</i> .	10
1.1.2. Constituyentes químicos del género <i>Aloysia</i> .	14
1.1.3. Usos medicinales del género <i>Lippia</i> y <i>Aloysia</i> .	25
1.2. Inflamación.	27
1.2.1. Actividad antiinflamatoria de triterpenos pentacíclicos.	27
1.2.2. Actividad antiinflamatoria del ácido oleanólico y ácido ursólico.	30
1.2.3. Mecanismo de acción del ácido oleanólico y ácido ursólico.	33
1.2.4. Relación entre estructura-actividad de triterpenos pentacíclicos.	35
1.3. Pruebas antimicrobianas.	40
2. Metodología.	44
2.1. Estudio químico.	44
2.1.1. Extracto metanólico de hojas-tallos.	45
2.1.2. Extracto clorofórmico de hojas-tallos.	46
2.1.3. Extracto clorofórmico de flores.	49
2.1.4. Hidrólisis de flores-hojas y tallo-hojas.	50
2.1.5. Destilación por arrastre de vapor.	50
2.1.6. Estudio químico y biológico preliminar de <i>Aloysia triphylla</i> .	51
2.2. Estudio biológico.	52
2.2.1. Bioensayos con <i>Artemia salina</i> .	52
2.2.2. Pruebas antimicrobianas.	53
2.2.3. Pruebas antiinflamatorias.	56
3. Resultados.	58
3.1. Propiedades espectroscópicas de las sustancias aisladas.	58
3.2. Resultados de las pruebas biológicas.	62
3.3. Pruebas de alcaloides del estudio preliminar.	67
4. Discusión de resultados.	69
4.1. Análisis químico.	69
4.2. Estudio biológico.	78
IV. Estudio químico y biológico de <i>Cirsium jorullense</i> .	83
5. Antecedentes.	85
5.1. Generalidades sobre la familia Asteraceae.	85
5.1.1. Generalidades sobre el género <i>Cirsium</i> .	87
5.1.2. Actividad biológica de algunas sustancias aisladas del género <i>Cirsium</i> .	105
5.1.3. Usos medicinales del género <i>Cirsium</i> .	106
5.2. Actividades biológicas de flavonoides.	108

Notaciones empleadas.

AST	Agar de soya tripticaseína
ATCC	American Type Culture Collection
TPA	Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
AcOEt	Acetato de etilo
CO	Ciclooxigenasa
C ₃ C	C ₃ convertasa
LC ₅₀	Concentración letal 50
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CST	Caldo de soya tripticaseína
δ	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de doble
EM/IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
Hz	Hertz
HHPA	13-acetato de 12- <i>O</i> -hexadecanoil-16-hidroxi-forbol
HYU	Hialuronidasa
IR	Espectroscopía de infrarrojo
HLE	Elastasa de leucocito humana
LSC	Límite superior confiable
LIC	Límite inferior confiable
LO	Lipooxigenasa
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
Ω	Número de insaturaciones
ν	Número de onda donde se observa un máximo de absorbancia
M ⁺	Ion molecular
ppm	Partes por millón
EPP	Propionato de fenil etilo
pf	Punto de fusión
APT	Prueba de un protón unido
Py	Piridina
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<i>s</i>	Singlete
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos del estudio químico y de las evaluaciones biológicas preliminares de *Aloysia triphylla* (cedrón) y *Cirsium jorullense* (cardo santo), dos vegetales utilizados en la medicina tradicional de nuestro país.

El estudio químico de las partes aéreas de *Aloysia triphylla*, permitió la purificación y la caracterización de 5 sustancias: β -sitosterol, ácido oleanólico, ácido ursólico, hispidulina, β -D-glucósido del β -sitosterol, así como dos productos de hidrólisis: 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído y 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona. Con respecto a la evaluación biológica, se encontró que el extracto clorofórmico de las flores fue el más tóxico para *Artemia salina*, mientras que del extracto clorofórmico de las hojas y tallos, las fracciones que contenían los ácidos ursólico y oleanólico, resultaron ser las más activas. Se observó que el aceite esencial de las hojas y tallos, los extractos hexánicos y clorofórmicos y la mezcla de ácidos triterpénicos tuvieron actividad frente a *Mycobacterium smegmatis*; además, éstos últimos mostraron una ligera actividad frente a *Candida albicans*. La evaluación antiinflamatoria de los extractos de esta planta no proporcionó resultados notables.

De las partes aéreas de *Cirsium jorullense*, se identificaron: hispidulina, eupatilina, 6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi flavona y 3,6,7,3',7'-pentametoxi-5-hidroxi flavona. Se encontró que las aguas madres del extracto de acetato de etilo mostraron una mayor toxicidad frente a *Artemia salina*. Por otro lado, el extracto de acetato de etilo de las hojas y tallos, resultó con mayor actividad antiinflamatoria; sin embargo, las sustancias presentes en este extracto, no mostraron una actividad antiinflamatoria notoria. Únicamente los extractos etanólicos de hojas y tallo presentaron actividad inhibitoria frente a *Sarcina lutea* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Estos resultados pueden incorporarse a los ya informados en la literatura, contribuyendo así al conocimiento químico y biológico de estas dos especies vegetales empleadas en la medicina tradicional.

ABSTRACT.

The present dissertation deals with the chemical study and the preliminary biological evaluations of *Aloysia triphylla* (cedrón) and *Cirsium jorullense* (cardo santo), two plants species used in Mexican traditional medicine.

The chemical study from the aerial parts of *Aloysia triphylla* allowed to isolate and characterize five natural products: β -sitosterol, oleanolic acid, ursolic acid, hispidulin, β -sitosteryl- β -D-glucopiranoside, as well as two hydrolysis products: 2-furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl) and 3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one. Regarding the biological evaluation, it was found that the chloroformic extract of the flowers displayed toxicity toward *Artemia salina*, while from the chloroformic extract of the leaves and stems, the fractions containing ursolic and oleanolic acids were the most active. It was observed that the essential oil from the leaves y stems, the hexanic and chloroformic extracts and the mixture of triterpenic acids showed activity toward *Mycobacterium smegmatis*. In addition, these last substances showed marginal activity toward *Candida albicans*. The anti-inflammatory evaluation of the extracts of this plan did not provide remarkable results.

From the aerial parts of *Cirsium jorullense* were identified: hispidulin, eupatilin, 6,7,3',4'-tetramethoxy-5-hydroxyflavone y 3,6,7,3',7'-pentamethoxy-5-hydroxyflavone. It was found that the mother liquid from the ethyl acetate extract displayed toxicity toward *Artemia salina*. On the other hand the ethyl acetate extract from the leaves and stems resulted with major antiinflammatory activity. However, the substance present in this extract, did not show antiinflammatory activity. Only the ethanolic extract from the leaves and stems displayed inhibitory activity toward to *Sarcina lutea* and *Pseudomonas aeruginosa*.

These results can be incorporated to those already informed in the literature, contributing to the chemical and biological knowledge of plant species used in traditional medicine.

I. INTRODUCCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN.

En México, al igual que en otros países, ha permanecido el uso de las plantas medicinales a través de los siglos. El aprovechamiento de dichos recursos vegetales ha sido de acuerdo con las múltiples observaciones y numerosas experiencias acumuladas, por grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país, enmarcadas dentro de las facilidades y circunstancias que otorga el ecosistema, el intercambio social, las enfermedades más comunes de la región y por la disponibilidad práctica del recurso. De esta manera, ciertas tradiciones han contribuido a la salud y bienestar de diferentes culturas.^{1,2}

Aunque no existen datos precisos que aseguren el valor y extensión del uso de las plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud ha calculado que aproximadamente el 80% de la población del mundo hace uso en alguna medida de éstas, para resolver sus necesidades de atención primaria de salud, ya sea como único medio de curación o como un medio alternativo; por lo que en los últimos años, se ha logrado revalorar los recursos vegetales de nuestro país, que debido a la diversidad climática permiten una gran riqueza florística, donde se incluyen a las plantas con propiedades medicinales, las cuales pertenecen a una gran variedad de familias, géneros y especies, distribuidas en diferentes regiones. La investigación de los constituyentes químicos aislados de éste tipo de plantas, representa solo un pequeño porcentaje (48 000) de las 250 000 especies existentes, mientras que la fracción sometida a un rastreo biológico o farmacológico es aún más pequeña (15 000).^{3,4} Cabe mencionar que el proceso que conduce a obtener de las plantas constituyentes puros y activos farmacológicamente es muy largo y minucioso. Además requiere de una colaboración multidisciplinaria de botánicos, químicos, farmacólogos y toxicólogos.³

De esta manera, al conjuntar los resultados de las diversas investigaciones se contribuye al conocimiento de nuevas alternativas de agentes terapéuticos más eficaces, los cuales pueden poseer estructuras conocidas (ej. triterpenos)⁵ o novedosas.

Cabe mencionar, que los productos bioactivos de las plantas pueden ser utilizados como modelos para llevar a cabo su síntesis químicas.^{2, 4} Sin embargo, es pertinente señalar la alta aceptación reciente de los fitofármacos, a los cuales se les atribuyen menores efectos secundarios.⁶

Así, el presente trabajo está constituido por dos partes principales: la referente a *Aloysia triphylla* (nombre común: cedrón), el cual es utilizado para enfermedades digestivas, respiratorias y bucales, y la correspondiente a *Cirsium jorullense* (nombre común: cardo santo) empleado en la medicina tradicional para enfermedades respiratorias y gastrointestinales, de los cuales se realizará un estudio químico y biológico, dado que en la primera especie vegetal aún no se han realizado estudios biológicos, mientras que de la segunda planta no hay ningún reporte de un análisis químico o evaluaciones biológicas que sustenten su uso popular. De esta manera los resultados obtenidos se incorporarán a los ya informados en la literatura, con la finalidad de contribuir al conocimiento químico y biológico de estas dos especies.

II. OBJETIVOS.

II. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

Realizar el estudio químico y biológico de las partes aéreas de *Aloysia triphylla* y *Cirsium jorullense* con la finalidad de purificar e identificar los metabolitos secundarios y evaluar su toxicidad frente a *Artemia salina*, sus propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Preparar los diferentes extractos crudos de *Aloysia triphylla* y *Cirsium jorullense*, por medio de una maceración empleando disolventes de diferente polaridad.
- Evaluar la toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina*, su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria.
- Separar, purificar y caracterizar los constituyentes mayoritarios presentes en los extractos de mayor actividad biológica, aplicando para ello las diferentes técnicas de separación y purificación convencional y las técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar biológicamente las sustancias presentes en los extractos analizados químicamente.

III. ESTUDIO QUÍMICO Y
BIOLÓGICO DE *Aloysia triphylla*.

1. ANTECEDENTES.

1. ANTECEDENTES.

Las aportaciones del Profesor Cronquist comprenden aspectos relacionados no solo con la jerarquización sino también con la determinación. Así, las dos grandes Clases de Angiospermas (Magnoliophyta), son llamadas por dicho autor como Magnoliopsida y Liliopsida, adcritas a la primera clase se incluyen 6 subclases: 1. Magnoliidae, 2. Hamamelidae, 3. Caryophyllidae, 4. Dilleniidae, 5. Rosidae, 6. Asteridae; mientras que 5 subclases integran a la Liliopsida.⁷

La subclase Asteridae, consiste de 11 Ordenes (ver diagrama I), 49 familias y aproximadamente 60, 000 especies; es la subclase más avanzada de las dicotiledóneas y posiblemente la más evolucionada.^{7,8}

En el presente trabajo se tratara el Orden de las Lamiales y las Asterales, en particular, sus familias Verbenaceae y Asteraceae respectivamente, ya que dentro de éstas se encuentran las especies vegetales objeto de estudio.

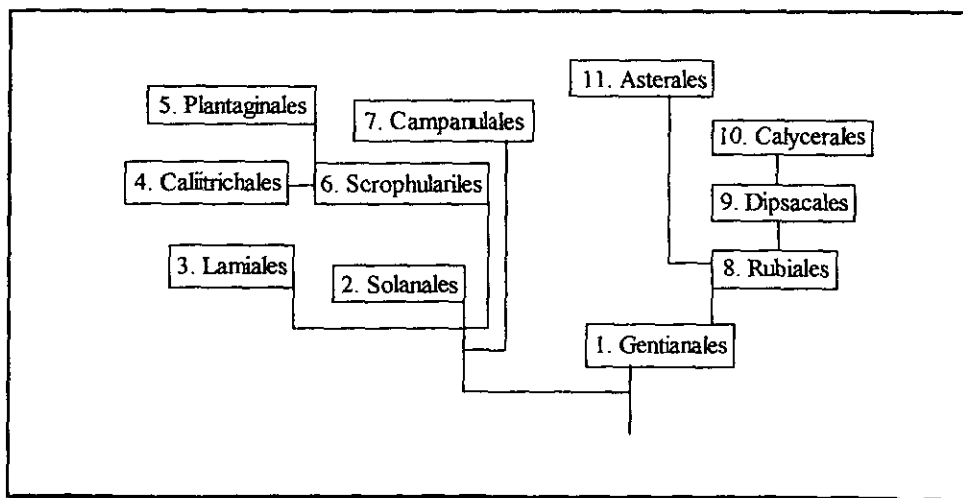


Diagrama 1. Relaciones entre los Ordenes de Asteridae.

1.1. GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA VERBENACEAE.

El orden de las Lamiales consiste de 4 familias y alrededor de 7 800 especies, las cuales se indican en la tabla I, en la cual se puede observar que la Lamiaceae, Verbenaceae y Boraginaceae son las familias grandes, mientras que la Lennoaceae es un grupo pequeño. Son principalmente herbáceas, algunas arbustivas y arbóreas. Frecuentemente producen iridoides, alcaloides y aceites aromáticos. La Verbenaceae y Lamiaceae están relacionadas, varios autores están de acuerdo que la Lamiaceae representa la realización y culminación hacia la dirección en que comienza la Verbenaceae.⁷

ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
LAMIALES	Lamiaceae	200	3 200
	Verbenaceae	100	2 600
	Boraginaceae	100	2 000
	Lennoaceae	3	5

Tabla I. Diversidad biológica del orden de las Lamiales.

La familia Verbenaceae abarca 100 géneros y 2600 especies, principalmente de distribución tropical y subtropical. Pueden ser hierbas, arbustos o árboles y a menudo enredaderas. De hojas usualmente opuestas, enteras, verticiladas, raramente simples o algunas veces pinnadas y palmadas, sin estípula. Inflorescencia de varios tipos esencialmente racemosa, cimosa, axilares y terminales, la mayoría de las veces alargadas y multiflorales. Flores por lo regular perfectas, hermafroditas, cigomorfas, sépalos unidos para formar 5 lóbulos, 5 pétalos unidos, calix irregular; corola bilabiada, raras veces campanulado; estambres 4, didínamos; ovario súpero, 2-8 celdado, bicarpelar y bilobular, cada celda con un óvulo subbasal o lateral; anteras ovadas, erectas, tetraesporangios y ditecales. Estigma bilobulado. Fruto en drupa, raramente con cápsula o esquizocarpo y aun abayado.⁷⁻⁹

Pueden ser ornamentales, algunos tiene valor económico y otras son apreciadas en la medicina tradicional.

Entre los compuestos químicos aislados de diferentes especies de la familia Verbenaceae, se encuentran los lignanos, estirenos, triterpenos, saponinas, flavonas en su forma libre o como glicósido, quinonas, alcaloides, iridoides, taninos, aceites esenciales, entre otros.¹⁰

1.1.1. CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO *Lippia*.

Dentro de la familia Verbenaceae, se encuentra el género *Lippia*, el cual esta formado por aproximadamente 220 especies; botánicamente son arbustos o plantas subarbusivas, aromáticas; con hojas alternas u opuestas, enteras, pecioladas o subsésiles, lisas o rugosas. Inflorescencia indeterminada, espigada o capitada, solitaria o fasciculada en las axilas de las hojas o agregadas en panículas terminales, muy densamente floridas. Brácteas cóncavas, planas, otras veces formando un involucre y con frecuencia decrecientes en tamaño lo largo de la espiga o cabezuela. Flores pequeñas, sésiles, solitarias. Cáliz pequeño, membranoso, ovoide-campanulado o comprimido, a veces bilabiado, con borde 4 dentado. Corola ínfera, cigomorfa; limbo oblicuo, algo bilabiado o 4-partido. Estambre 4, didínamos; anteras ovadas de tecas paralelas. Ovario 2-celdado, cada celda 1-ovulada Estilo a menudo corto. Estigma simple, algo engrosado o capitado. Fruto pequeño, seco y ovoide. Semillas sin endosperma.⁹

Entre los metabolitos secundarios caracterizados del género *Lippia*, se encuentran: aceites esenciales (monoterpenos, sesquiterpenos, compuestos aromáticos, alcoholes y cetonas), flavonas, iridoides glicosídicos, taninos y fenilpropanoides, como se enlista en la tabla II.

Tabla II. Metabolitos secundarios aislados del género *Lippia*.

ACEITES ESENCIALES			
Especie	Partes estudiadas	Estructura	Ref.
<i>L. adoensis</i>	Hojas, tallo y flor	4 y 45	11
	Flores y hojas	49	12 y 13
	Flores	1, 6, 48, 49 y 54	14
<i>L. alba</i> Braun	----	2, 4, 5, 10, 11, 18, 19, 21, 23, 25, 33, 36, 57, 69, 78 y 83	15 y 16
<i>L. alnifolia</i>	----	1, 6, 10, 13, 21, 33, 36, 38, 41 y 42	16
<i>L. aff. Aristata</i>	----	2-4, 6, 8-10, 19, 21, 25, 26, 33, 36, 57 y 69	16
<i>L. aristata</i>	----	2, 3, 6, 8, 9, 19, 21, 25, 26, 32 y 69	16
<i>L. asperifolia</i>	Flores	12, 77 y 82	17
	Hojas-tallo	54	18
<i>L. carviadora</i>	Flores y hojas	4 y 69	19
	Hojas	4, 45, 53 y 69	20
<i>L. dulcis</i>	Hojas-flor	1, 4-7, 9, 14-20, 22-24, 27-30, 32, 35, 37, 44, 47-49, 56, 59-65, 69, 75, 80, 85, 88 y 89	21-23
<i>L. grata</i>	----	2, 5, 6, 9, 10, 13, 21, 23, 35, 36, 38, 39, 41-43 y 88	16
<i>L. helleri</i>	Hojas-tallo	38	24
<i>L. integrifolia</i>	Hojas	4, 21, 33, 34, 49, 54, 66, 71 y 85	25-29
	Partes aéreas	50-52, 66, 67, 72-74, 81 y 84	29-33
<i>L. junelliana</i>	----	3, 6, 48 y 54	15
<i>L. lycioides</i>	Hojas	4, 6, 46, 54, 55 y 90	25 y 34
<i>L. micromeria</i>	Flores	55	35
<i>L. multiflora</i>	Hojas-flores	4-6, 9, 10, 21, 33, 35, 36, 38, 39, 42, 43, 49, 53, 57, 68, 69, 76, 86-89	36
	Hojas-tallo	3-5, 8, 16, 18, 21, 25, 29, 31, 33, 36, 54, 57, 69, 79, 80 y 89	37
<i>L. polistachia</i>	Hojas	4, 6 y 9	25
<i>L. aff. sidoides</i>	----	3, 5, 6, 9, 10, 21, 36, 38, 40, 42, 49 y 54	16
<i>L. turbinata</i>	----	4, 54 y 70	15, 34 y 38

Monoterpenos		Sesquiterpenos		Aromáticos	
No.	Nombre	No.	Nombre	No.	Nombre
1.	Canfeno	17.	δ -cadineno	36.	<i>p</i> -cimeno
2.	Careno	18.	γ -cadineno	37.	<i>Ar</i> -curcumeno

Monoterpenos		Sesquiterpenos		Aromáticos	
3.	α -Felandreno	19.	<i>Trans</i> -cariofileno	38.	Carvacrol
4.	Limóneno	20.	β -cariofileno	39.	Acetato de carvacrol
5.	Mirceno	21.	Isocariofileno	40.	Metoxi timol
6.	α -pineno	22.	α -copaeno	41.	Timol
7.	β -pineno	23.	β -cubeneno	42.	Acetato de timol
8.	Sabineno	24.	β -elemeno	43.	Eugenol
9.	α -tujeno	25.	γ -elemeno		
10.	γ -terpineno	26.	Eremofileno		
11.	Ocimeno	27.	(<i>E</i>)- β -farneseno		
		28.	(<i>Z</i>)- β -farneseno		
Sesquiterpenos		29.	Germacreno B	Ácidos y esteres	
No.	Nombre	30.	Germacreno D	No.	Nombre
12.	Alloaromadendreno	31.	<i>Cis</i> - β -guayeno	44.	Acetato de (<i>E</i>)-2-hexenilo
13.	Aromadendreno	32.	α -humuleno	45.	Acetato de linalilo
14.	β -bisaboleno	33.	α -himachaleno	46.	Ácido isovalérico
15.	β -bourboneno	34.	α -muuroleno		
16.	<i>Trans</i> - α -bergamoteno	35.	γ -muuroleno		
Alcoholes, cetonas y aldehídos					
No.	Nombre	No.	Nombre	No.	Nombre
47.	α -bisabolol	61.	(<i>E</i>)-2-hexenal	76.	2-metil-6-metilen-7-octen-4-ona
48.	Borneol	62.	(-)-epihemandulcina	77.	Mircenona
49.	Camfor	63.	(+)-hemandulcina	78.	Neral
50.	2 β , 4 β , 9 α -2,6,6,9-tetrametiltriciclo-[6,3,0,0 ^{2,4}]-undec-1(8)-en-7,11-diona	64.	(<i>E</i>)-2-hexen-1-ol	79.	Nerol
51.	1 β , 2 α , 8 β , 2,6,10,10-tetrametilbiciclo [6,3,0]undec-5-en-2-ol	65.	(+)-4 β -hidroxihemandulcin	80.	(<i>Z</i>)-nerolidol
52.	1 α , 7 β , 9 α -1-hidroxi-3,6,6,9-tetrametilbiciclo-[5,4,0]undec-3-en-8-ona	66.	Humulendiona	81.	S-(+)-trans-nerolidol
53.	(+) Carvona	67.	Integrifolian-1,5-diona	82.	Ocimenona
54.	1,8-cineol	68.	Ipsenona	83.	<i>l</i> -piperitona
55.	Citral	69.	Linalool	84.	4,5-seco-african-4,5-diona
56.	Dihydroactinidiolido	70.	Lippiona	85.	Spatulenol
57.	Epóxido del cariofileno	71.	Lippifoli-1(6)-en-5-ona	86.	(<i>E</i>)-tagetona
58.	Geranial	72.	1,6- <i>cis</i> -lippifolian-1 α -ol-5-ona	87.	(<i>Z</i>)-tagetona
59.	(<i>E</i>)-geranil acetona	73.	1,6- <i>trans</i> -lippifolian-1 α -ol-5-ona	88.	Terpinen-4-ol
60.	Globulol	74.	Lippifoli-1(6)-en-4 β -ol-5-ona	89.	α -terpineol
		75.	6-metil-5-hepten-2-ona		

Continuación de la tabla II.

COMPUESTOS FENÓLICOS			
Espece	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>L. asperifolia</i>	Hojas-tallo	Ácido gálico (90)	18
		Pirogalol (91)	
		Catecol (92)	

FENILPROPANOIDES GLICOSÍDICOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>L. multiflora</i>	Hojas	Acteósido (93)	39
		Isoverbascósido (94)	
		Deramnosilverbascósido (95)	
<i>L. dulcis</i>	Hojas-flores	Acteósido (93)	23
IRIDOIDES GLUCOSÍDICOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>L. javanica</i>	Hojas-raíz	Thevésido-Na (96)	40
		Theviridósido (97)	
<i>L. turbinata</i>	Hojas y raíz	Thevésido-Na (96)	
		Theviridósido (97)	
<i>L. graveolens</i>	Hojas y tallo	Acido carioptosídico (98)	41
		Acido 6'- <i>O</i> - <i>p</i> -cumaroil carioptosídico (99)	
		Acido 6'- <i>O</i> -cafeil carioptosídico (100)	
		Loganino (101)	
		Secologanino (102)	
		Secoxiloganino (103)	
		Dimetil secologanósido (104)	
		Acido logánico (105)	
		Acido 8- <i>epi</i> -logánico (106)	
Carioptosido (107)			
FLAVONAS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>L. nodiflora</i>	Hojas	Nodiflorina A	42
		Nodiflorina B	
		Nodifloretina (108)	
	Partes aéreas	Nepetina (109)	43
		Jaceosidina (110)	
		Hispidulina (111)	
		7-sulfato de hispidulina (112)	
		4'-sulfato de hispidulina (113)	
		7-sulfato de nepetina (114)	
		7-sulfato de jaceosidina (115)	

<i>L. nodiflora</i>	Partes aéreas	7-sulfato-6-hidroxiluteolina (116)	43
		6-sulfato-6-hidroxiluteolina (117)	
		7-sulfato de nodifloretina (118)	
		6,7-disulfato-6-hidroxiluteolina (119)	
		6,7-disulfato de nodifloretina (120)	
		3',4'-disulfato de nepetina (121)	
		7,4'-disulfato de jaceosidina (122)	
7,4'-disulfato de hispidulina (123)			

1.1.2. CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL GÉNERO *Aloysia*.

El género *Aloysia* esta comprendido por alrededor de 37 especies. Son arbustos aromáticos nativos de las partes calientes de América. Hojas opuestas o verticiladas. Inflorescencias en espiga o racimos especiformes, multifloras, solitarias o agregadas, o en panículas terminales. Flores bracteadas, pequeñas, brevemente pediceladas, solitarias o en verticilios de 3 ó 4 flores. Cáliz pequeño, membranáceo, tubuloso, 4- dentada o 4-partido. Corola 4-lobulada, algo cigomorfa. Estambres 4, didínamos, anteras ditectas, oblongas u ovadas, con tecas paralelas y dehiscencia longitudinal. Ovario unicarpelar, bilocular, cada lóculo uniovulado; óvulos anátropos; estilo corto, filiforme; estigma simple, oblicuo lateral. Fruto pequeño, esquizocárpico, compuesto de dos pirenos que se separan en la madurez, formando dos mericarpios más o menos cilíndricos, de paredes delgadas. Semillas sin endosperma y embrión recto.⁸

Dentro de las especies vegetales de éste género, se encuentra *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britt. y cuya sinonimia es *Verbena triphylla* L'Hér., *Aloysia citriodora* Ort., *Lippia citriodora* H.B.K., *Lippia triphylla* (L'Hér.).⁸ Dentro de la cultura popular es conocido como té cedrón.

Aloysia triphylla es un arbusto perenne, ramificado, aromático hasta de 3 m. de alto; tallo estriado, más o menos rugoso o áspero. Hojas simples, en verticilios de 3 ó 4, lanceolada de 8 a 10 cm de largo, cara inferior con puntas glandulares, cara superior

cubiertas de pelos simples, ápice acuminado, entera o dentada, base atenuada con peciolo corto, muy aromáticas. Inflorescencias: espiga verticilada y axilar o en panícula terminal, con muchas flores; flor bisexual; cáliz 4-dentado, verde, densamente puberulento; corola tubular; bilabiada, pequeña puberulenta; estambres 4; ovario súpero, fruto 2 nuecesitas.⁴⁴ Planta nativa de América central y del Sur (Argentina, Uruguay y Chile) y cultivada en México y otros lugares.

En la tabla III se indican los metabolitos secundarios aislados del género *Aloysia*, en la que se puede observar que los estudios químicos en este género son muy escasos.

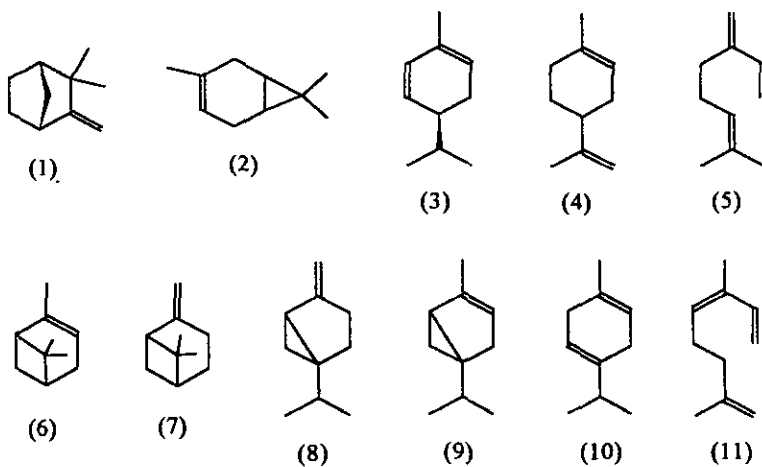
Tabla III. Metabolitos secundarios del género *Aloysia*.

ACEITES ESENCIALES			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (Estructura)	Ref.
<i>A. triphylla</i>	Hojas, raíz y tallo	(E)-geranil acetona (59), neral (78) y verbenona (124)	45
	Hojas, tallo y flor	Limoneno (4), 1,8-cineol (54), citral (55), Geranial (58) y 6-metil-5-hepten-2-ona (75).	46
FENILPROPANOIDES GLICOSÍDICOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (Estructura)	Ref.
<i>A. triphylla</i>	Hojas-tallo	Acteósido (93)	47
IRIDOIDES GLUCOSÍDICOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (Estructura)	Ref.
<i>A. Chamaedrifolia</i>	Hojas	Pulchellósido (125)	40
<i>A. triphylla</i>	Hojas-raíz	Genoposidato de Na (126)	
	Raíz	Genipósido (127)	
		Musaenósido (128)	
FLAVONAS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (Estructura)	Ref.
<i>A. triphylla</i>	Hojas	Salvigenina (129)	48 y 49
		Eupatorina (130)	
		Eupafolina (131)	

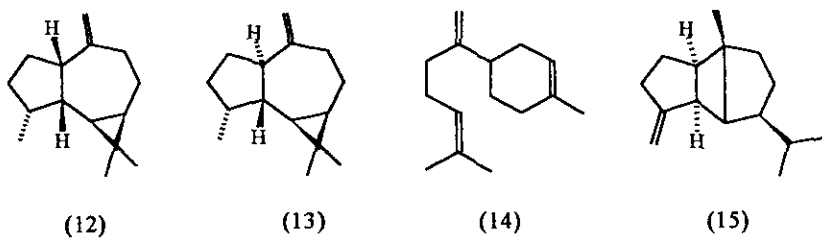
<i>A. triphylla</i>	Hojas	Luteolina (132)	48 y 49
		6-hidroxiluteolina (133)	
		7-O-β-glucósido de luteolina (134)	
		Hispidulina (116)	
		Cirsimaritina (135)	
		Diosmetina (136)	
		Chrisoeriol (137)	
		Apigenina (138)	
		Circiliol (139)	
		Pectolinaringenina (140)	
		7-O-[β-D-glucuronosil-(1→2)-β-D-glucurónido] de luteolina (141)	

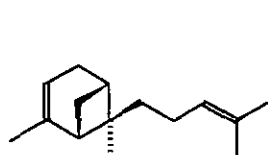
ACEITES ESENCIALES

Monoterpenos

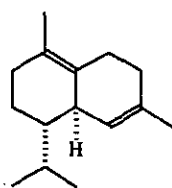


Sesquiterpenos

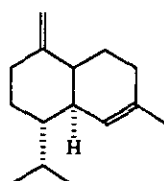




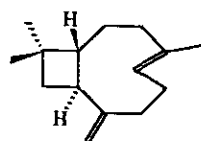
(16)



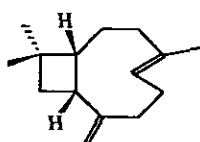
(17)



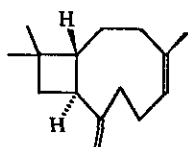
(18)



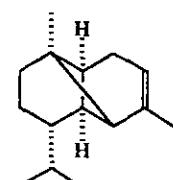
(19)



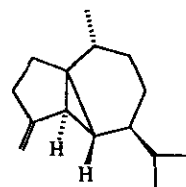
(20)



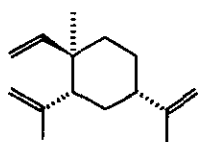
(21)



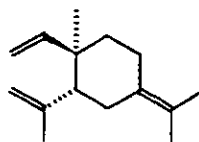
(22)



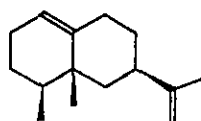
(23)



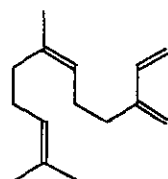
(24)



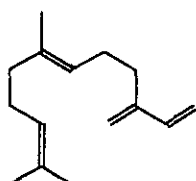
(25)



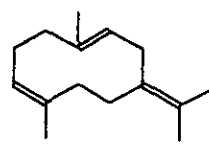
(26)



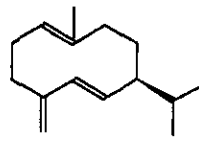
(27)



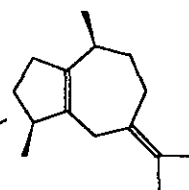
(28)



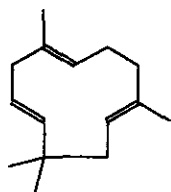
(29)



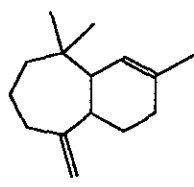
(30)



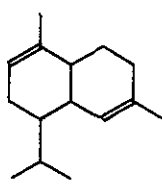
(31)



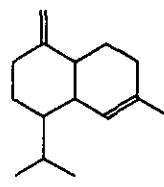
(32)



(33)

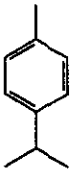


(34)

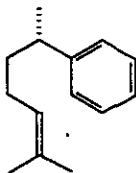


(35)

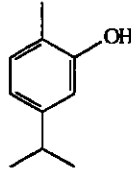
Aromáticos



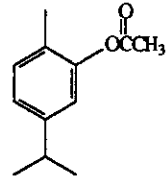
(36)



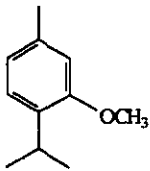
(37)



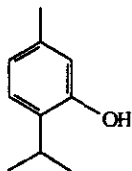
(38)



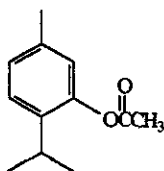
(39)



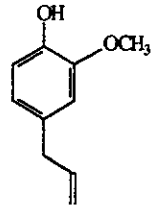
(40)



(41)

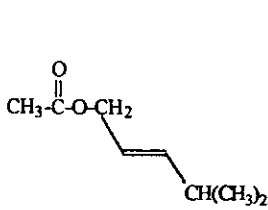


(42)

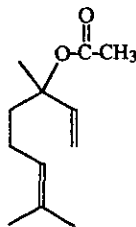


(43)

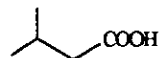
Ácidos y ésteres



(44)

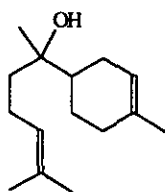


(45)

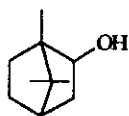


(46)

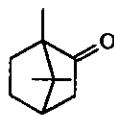
Alcoholes, cetonas y aldehídos



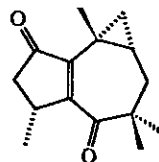
(47)



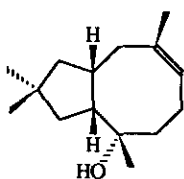
(48)



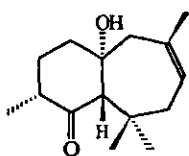
(49)



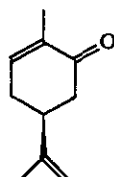
(50)



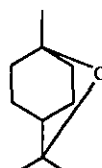
(51)



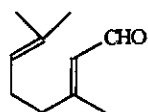
(52)



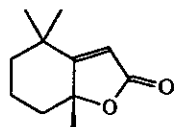
(53)



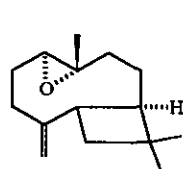
(54)



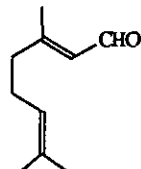
(55)



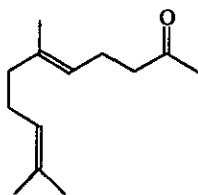
(56)



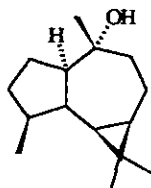
(57)



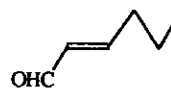
(58)



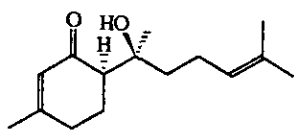
(59)



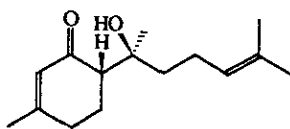
(60)



(61)

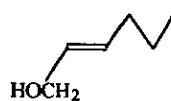


(62)

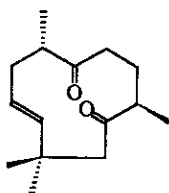


(63) R=H

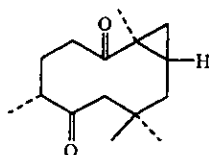
(65) R=OH



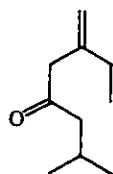
(64)



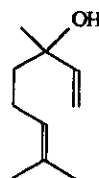
(66)



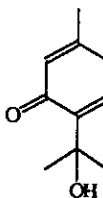
(67)



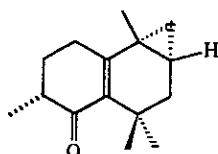
(68)



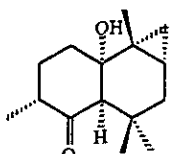
(69)



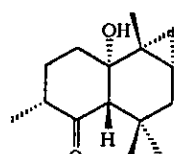
(70)



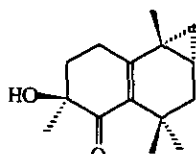
(71)



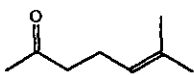
(72)



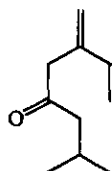
(73)



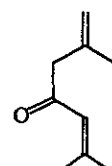
(74)



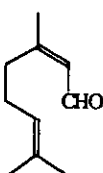
(75)



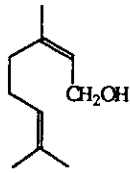
(76)



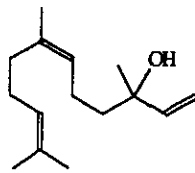
(77)



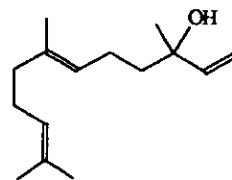
(78)



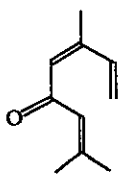
(79)



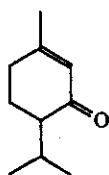
(80)



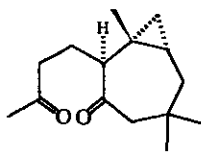
(81)



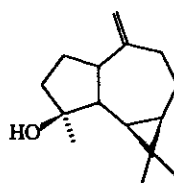
(82)



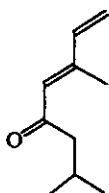
(83)



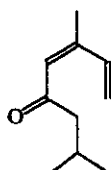
(84)



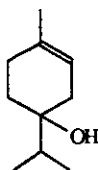
(85)



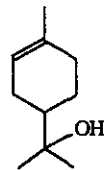
(86)



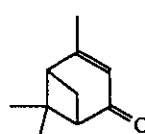
(87)



(88)

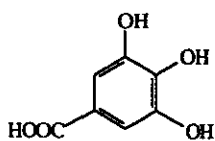


(89)

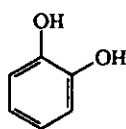


(124)

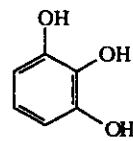
COMPUESTOS FENÓLICOS



(90)

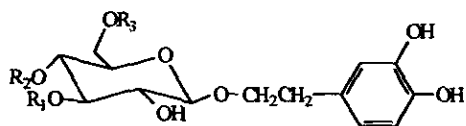


(91)



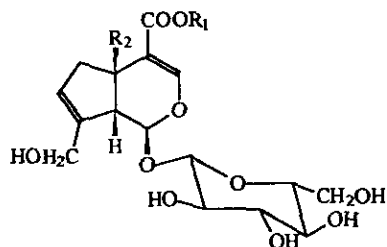
(92)

FENILPROPANOIDES GLICOSÍDICOS

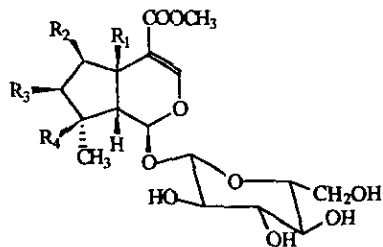


	R ₁	R ₂	R ₃
(93)	Ramnosa	Cafeoilo	H
(94)	Ramnosa	H	Cafeoilo
(95)	H	Cafeoilo	H

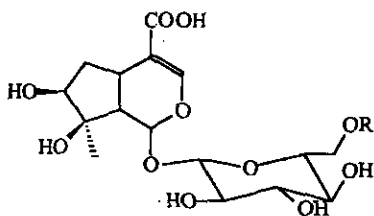
IRIDOIDES GLUCOSÍDICOS



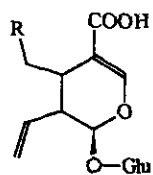
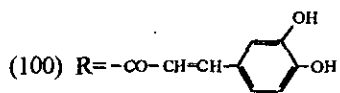
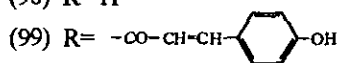
(126)	R ₁ = Na	R ₂ = H
(127)	R ₁ = CH ₃	R ₂ = H
(96)	R ₁ = Na	R ₂ = OH
(97)	R ₁ = CH ₃	R ₂ = OH



(125)	R ₁ = R ₂ = R ₃ = OH	R ₄ = H
(128)	R ₁ = R ₂ = R ₃ = H	R ₄ = OH



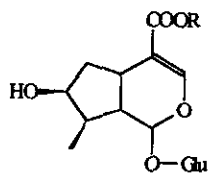
(98) R=H



(102) R=CHO

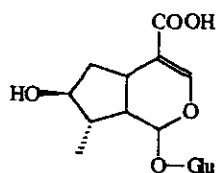
(103) R=COOH

(104) R=COOCH₃

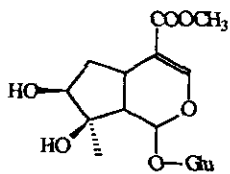


(105) R=H

(101) R=CH₃

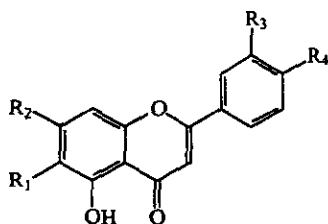


(106)



(107)

FLAVONAS



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(108)	OH	OH	MeO	OH
(109)	MeO	OH	OH	OH
(110)	MeO	OH	MeO	OH
(111)	MeO	OH	H	OH
(112)	MeO	NaSO ₄	H	OH
(113)	MeO	OH	H	NaSO ₄
(114)	MeO	NaSO ₄	OH	OH
(115)	MeO	NaSO ₄	MeO	OH
(116)	OH	NaSO ₄	OH	OH
(117)	NaSO ₄	OH	OH	OH
(118)	OH	NaSO ₄	MeO	OH
(119)	NaSO ₄	NaSO ₄	OH	OH
(120)	NaSO ₄	NaSO ₄	MeO	OH
(121)	MeO	OH	NaSO ₄	NaSO ₄
(122)	MeO	NaSO ₄	MeO	NaSO ₄
(123)	MeO	NaSO ₄	H	NaSO ₄
(129)	MeO	MeO	H	MeO
(130)	MeO	MeO	OH	MeO
(131)	MeO	OH	OH	OH
(132)	H	OH	OH	OH
(133)	OH	OH	OH	OH
(134)	H	<i>O</i> -β-glucosídico	OH	OH
(135)	MeO	MeO	OH	OH
(136)	OH	OH	OH	MeO
(137)	OH	OH	MeO	OH
(138)	H	OH	H	OH
(139)	MeO	MeO	OH	OH
(140)	MeO	OH	H	MeO
(141)	H	7- <i>O</i> -[β-D-glucuronosil-(1→2)-β-D-glucurónido]	OH	OH

1.1.3. USOS MEDICINALES DEL GÉNERO *Lippia* y *Aloysia*.

El género *Lippia* es ampliamente cultivado y empleado en la medicina tradicional. En la tabla IV, se enlistan los usos de algunas especies de éste género.

ESPECIE	USO MEDICINAL DE LA PLANTA	REF.
<i>L. adoensis</i>	Tos y fiebre.	12
<i>L. asperifolia</i>	Fiebre.	18
<i>L. alba</i>	Alteraciones ginecológicas, promueve la concepción, desordenes digestivos como diarrea y dolor de estómago.	50
<i>L. callicarpaefolia</i>	Dolor de estómago.	50
<i>L. triphylla</i>	Vértigo, náuceas, flatulencia, dispepsia, antiespasmódico, carminativo, expectorante, fiebre, tranquilizante, diarrea y enfermedades bucales.	48-51
<i>L. dulcis</i>	Tos, catarro, bronquitis, asma, cólico.	21
<i>L. graveolens</i>	Bronquitis, tos, catarro, expectorante, cólicos estomacales, diarrea y para la digestión.	50
<i>L. hastulata</i>	Enfermedades del estómago.	52
<i>L. integrifolia</i>	Enfermedades del estómago, diurético.	30
<i>L. multiflora</i>	Hipertensión.	39
<i>L. nodiflora</i>	Diurético, febrífugo.	42
<i>L. palmeri</i>	Abortiva, trastornos de la menstruación, asma, gripa, tos, bronquitis, cólicos de los recién nacidos y como digestivo.	50
<i>L. turbinata</i>	Estimulante y diurético.	34

Tabla IV. Usos medicinales de algunas especies del género *Lippia*.

Muchas de las propiedades curativas no han sido comprobadas científicamente, debido a que la mayoría de los estudios realizados se han centrado principalmente, al aislamiento, identificación y elucidación estructural de sus metabolitos secundarios.

Este género, además de ser empleado en la medicina tradicional, es utilizado como una fuente de especias, saborizantes y fragancias. Así por ejemplo, *L. helleri* (orégano) es empleado como condimento y sus aceites son utilizados para lociones del cabello, para afeitar, jabones y posiblemente para licores,²⁴ mientras que la (+)-hernandulcina obtenida de *L. dulcis*, resultó tener 3 veces más poder edulcorante que la sacarosa.²²

Como se puede observar en la tabla IV, una de las especies más empleadas para diversas enfermedades en la medicina tradicional es *Lippia triphylla* (cedrón), cuya sinonimia es *Aloysia triphylla*.⁹ Como antiespasmódico se toma en cocimiento generalmente en ayunas. En el mercado de Sonora se usa para quitar el dolor de estómago y para beberlo como té. Se prefiere si es cortado antes de que florezca y ya florecido las ramas sin flor.⁴⁴ Para el tratamiento de la diarrea, cólico, vómito y gases se emplean las hojas en cocimiento por vía oral.

De los estudios biológicos realizados en los últimos años a algunos de los compuestos del género *Aloysia* y *Lippia*, se encontraron las siguientes propiedades biológicas: Los aceites esenciales de *L. multiflora* presentaron actividad antimalárica *in vitro* en cultivos de *Plasmodium falciparum*,³⁷ el acteósido obtenido de *L. triphylla* mostró un efecto analgésico en ratones⁴⁷ y un aldehído C-9 (aceite esencial) de *A. triphylla* presentó actividad antidiarreica en ratones,⁴⁵ mientras que verbenona posee propiedades cardioactivas y estimulante respiratorias.⁴⁶

1.2. INFLAMACIÓN.

A pesar de los grandes avances en la medicina, las enfermedades caracterizadas por un proceso inflamatorio, tales como artritis reumatoide, psoriasis, colitis ulcerativa, ulceraciones bucales, gingivitis, etc., siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en humanos. Con la excepción de algunas reacciones a toxinas, la inflamación ocurre como una defensa contra agentes extraños.

Los síntomas de una inflamación (rubor, dolor, calor, edema y pérdida de función) son resultado de un proceso patofisiológico complejo que involucran un incremento en el flujo sanguíneo y permeabilidad vascular,^{53 y 54} activación del mecanismo de defensa humoral y celular. Estos procesos son mediados por una variedad de señales moleculares producidas por neutrófilos,⁵⁵⁻⁵⁷ monocitos,⁵⁸ macrófagos,⁵⁹ mastocitos,⁶⁰ linfocitos,⁶¹ entre otros. Los mediadores corresponden a diferentes clases químicas, tales como sistema de complemento,⁶² sistema de coagulación y fibrinolítico,^{63 y 64} cininas,^{65 y 66} histamina,^{67 y 68} prostanoïdes,⁶⁹⁻⁷⁶ leucotrienos,^{75, 77-82} factor activador de plaquetas,⁸³ citocinas,^{84 y 85} anticuerpos,^{84, 86 y 87} etc. Estos mediadores inician, mantienen, agravan y modulan el curso de un número de desordenes humanos. Los compuestos antiinflamatorios pueden actuar en muchas etapas de los procesos patofisiológicos, estos compuestos se han clasificado en dos grandes grupos: esteroides antiinflamatorios⁸⁸⁻¹⁰⁶ y antiinflamatorios no esteroidales^{60, 68, 80}. Sin embargo, ambos grupos presentan la desventaja de tener diversos efectos adversos, que pueden poner en peligro la vida del paciente.

1.2.1. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS.

Los triterpenoides son una clase de sustancias muy interesantes en cuanto a sus efectos biológicos y baja toxicidad, por lo que se considera que estos compuestos proveen un medio para el desarrollo de nuevos fármacos.

Entre las propiedades biológicas de los triterpenos, se encuentra su capacidad como agente antiinflamatorio, en las tablas Vy VI se enlistan algunos ejemplos de triterpenos derivados de la β -amirina y α -amirina respectivamente, que presentan ésta actividad, en las que además se puede observar su mecanismo de acción.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Mientras que en las tablas Va y VIa se dan a conocer las estructuras de estos compuestos.

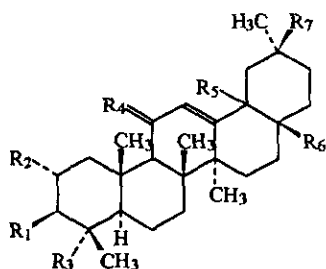
Cabe mencionar que existen varios métodos para el rastreo y evaluación de compuestos antiinflamatorios, entre las sustancias más frecuentemente utilizadas para inducir el edema, se pueden citar a la carragenina, dextrano, la albúmina de huevo, etc.¹⁰⁹

Tabla V. Acción de triterpenos pentacíclicos en la mediación de señales.¹⁰⁶

Compuesto	1	2			3	4		5
		HLE	C ₃ C	HYU		LO	CO	
β -amirina (142)						X	X	
Eritrodiol (143)		X						
Ácido oleanólico (144)		X	X	X		X		X
Hederagenina (145)				X				
α -hederina (146)								
Ácido cratególico (147)			X					
Ácido 18- α -glicirretínico (148)	X		X			X	X	X
Ácido 18- β -glicirretínico (149)	X		X			X	X	X
Glicirrizina (150)					X			X
Carbenoxofona (151)						X		

1. Liberación de histamina.
2. Enzimas hidrolíticas.
3. Citocinas.
4. Mediadores derivados de lípidos.
5. Especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica.

- HLE. Elastasa de Leucocito Humana.
 C₃C. C₃ convertasa.
 HYU. Hialuronidasa.
 LO. Lipooxigenasa.
 CO. Ciclooxigenasa.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
β-amirina (142)	HO	H	CH ₃	2H	βH	CH ₃	CH ₃
Eritriol (143)	HO	H	CH ₃	2H	βH	CH ₂ OH	CH ₃
Ácido oleanólico (144)	HO	H	CH ₃	2H	βH	COOH	CH ₃
Hederagenina (145)	HO	H	CH ₂ OH	2H	βH	COOH	CH ₃
α-hederina (146)	Rha-Ara-O	H	CH ₂ OH	2H	βH	COOH	CH ₃
Ácido cratególico (147)	HO	HO	CH ₃	O	βH	COOH	CH ₃
Ácido	HO	H	CH ₃	O	αH	CH ₃	COOH
18-α-glicirretínico (148)							
Ácido	HO	H	CH ₃	O	βH	CH ₃	COOH
18-β-glicirretínico (149)							
Glicirrizina (150)	GlcA-GlcA-O	H	CH ₃	O	βH	CH ₃	COOH
Carbenoxolona (151)	SuccO	H	CH ₃	O	βH	CH ₃	COOH

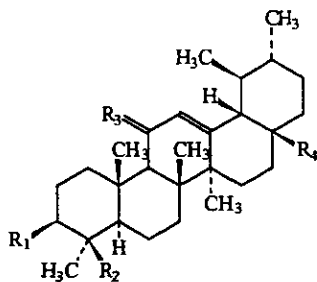
Tabla Va. Estructuras de triterpenos pentacíclicos (serie oleano).

Tabla VI. Acción de triterpenos pentacíclicos en la mediación de señales.¹⁰⁶

Compuesto	1	2			3	4		5
		HLE	C ₃ C	HYU		LO	CO	
α-amirina (152)						X	X	
Úvaol (153)		X						
Ácido ursólico (154)	X	X	X			X	X	
Ácido acetil-11-ceto-β-boswélico (155)		X				X		
Ácido -β-boswélico (156)		X	X			X		

1. Liberación de histamina.
2. Enzimas hidrolíticas.
3. Citocina.
4. Mediadores derivados de lípidos.
5. Especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica

- HLE. Elastasa de Leucocito Humana.
 C₃C. C₃ convertasa.
 HYU. Hialuronidasa.
 LO. Lipooxigenasa.
 CO. Ciclooxigenasa.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
α-amirina (152)	βHO	CH ₃	2H	CH ₃
Uvaol (153)	βHO	CH ₃	2H	CH ₂ OH
Ácido ursólico (154)	βHO	CH ₃	2H	COOH
Ácido acetil-11-ceto-β-boswelico (155)	αAcO	COOH	O	CH ₃
Ácido -β-boswelico (156)	αHO	COOH	2H	CH ₃

Tabla VIa. Estructuras de triterpenos pentacíclicos (serie ursano).

Entre otros triterpenos que presentan actividad antiinflamatoria se encuentran el β-sitosterol,¹¹⁰⁻¹¹³ ψ-taraxasterol, taraxasterol y cicloartenol.¹¹⁴

Como se puede deducir de las tablas V y VI, el ácido oleanólico y ursólico son algunos de los compuestos más notables con respecto a dicha actividad, por lo que se describirán a continuación.

1.2.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DEL ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO URSÓLICO.

El ácido oleanólico (ácido 3β-hidroxi-olea-12-en-28-oico) y su isómero el ácido ursólico (ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oico), son compuestos triterpénicos que existen ampliamente en los alimentos vegetales, hierbas medicinales y otras plantas, en la forma de ácido libre o como saponinas triterpenoides.¹¹⁵

La actividad antiinflamatoria del ácido ursólico ha sido probada en diferentes modelos, algunos de los cuales se muestran en las tablas VII-IX.¹¹⁶

Tabla VII. Actividad tópica antiinflamatoria contra el edema inducido con TPA.

Producto	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) media \pm SEM	Inhibición del edema %
Control (TPA)		17.1 \pm 1.0	
Acido ursólico (154)	0.5	4.5 \pm 0.3	73.4
Indometacina (157)	0.5	0.9 \pm 0.2	94.7

Tabla VIII. Actividad oral antiinflamatoria contra el edema inducido con carragenina.

Producto	Dosis (mg/Kg)	Edema (ml x 10 ⁻²) Media \pm SEM			Inhibición del edema %		
		1 h.	3 h.	5 h.	1 h.	3h.	5 h.
Control (carragenina)		8.4 \pm 0.7	12.1 \pm 0.7	13.5 \pm 0.9			
Acido ursólico (154)	100	9.3 \pm 0.3	7.8 \pm 0.7	9.2 \pm 0.6	0.0	35.5	31.9
Fenilbutazona (158)	100	3.9 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2	6.9 \pm 0.2	53.5	58.3	48.7
Indometacina (157)	7	6.7 \pm 1.1	5.2 \pm 0.6	6.7 \pm 0.6	20.2	57.0	50.3

Tabla IX. Actividad tópica antiinflamatoria contra el edema inducido con EPP.

Producto	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) Media \pm SEM	Inhibición del edema %
Control (EPP)		3.3 \pm 0.3	
Acido ursólico (154)	0.5	2.3 \pm 0.6	30.3
Dexametasona (159)	0.5	1.3 \pm 0.2	60.6

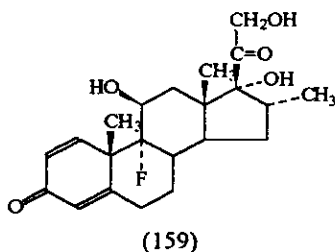
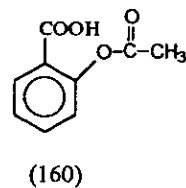
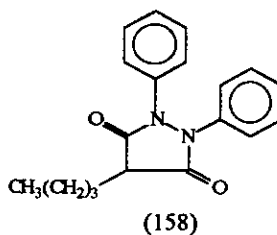
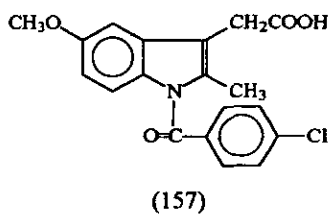
En estas tablas, se visualiza que la actividad antiinflamatoria del ácido ursólico fue notable con respecto a la fenilbutazona, en el edema de la pata inducida con carragenina; mientras que una similar actividad se observa con respecto a la indometacina, en el edema de la oreja inducido con TPA y en el edema inducido con EPP.

El efecto antiinflamatorio del ácido oleanólico, fue informado por primera vez en 1960 y ha sido confirmado en estudios posteriores en una variedad de modelos ensayados, como se muestra en la tabla X.^{115 y 117}

Tabla X. Acción antiinflamatoria aguda y crónica de ácido oleanólico en grupos de 5 ratas.

Producto	Dosis (mg/Kg)	Edema carragenina (ml)	Edema* carragenina (ml)	Edema dextrano (ml)	Artritis formaldehído (ml)	Artritis adyuvantes (ml)
Control		1.30 ± 0.08	1.47 ± 0.09	1.27 ± 0.06	0.94 ± 0.08	1.40 ± 0.17
Ácido oleanólico (144)	25		1.02 ± 0.04 ^c (31)	1.03 ± 0.09 (19)	0.72 ± 0.04 ^a (23)	1.12 ± 0.13 (20)
	50	1.05 ± 0.05 ^a (19)	0.80 ± 0.07 ^d (46)	0.95 ± 0.08 ^b (25)	0.66 ± 0.06 ^a (30)	0.90 ± 0.11 ^a (36)
	100	1.0 ± 0.06 ^b (23)	0.62 ± 0.07 ^d (58)	0.78 ± 0.07 ^d (39)	0.57 ± 0.08 ^a (39)	0.72 ± 0.10 ^c (49)
	300	0.91 ± 0.08 ^c (30)				
Ácido acetil salicílico (160)	100	0.88 ± 0.04 ^c (32)	0.05 ± 0.03 ^d (63)	0.75 ± 0.10 ^c (41)	0.62 ± 0.09 ^a (34)	0.92 ± 0.08 ^a (34)

* administración intraperitoneal. El valor superior indica la media ± s.e. El valor en paréntesis indica % inhibición. ^a P<0.05, ^b P<0.02, ^c P<0.01, ^d P<0.001.



1.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DEL ÁCIDO OLEANÓLICO Y ÁCIDO URSÓLICO.

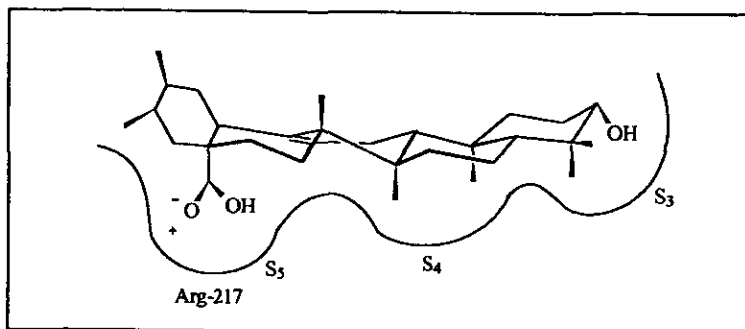
El mecanismo de los efectos antiinflamatorios del ácido oleanólico y/o ácido ursólico ha sido atribuido a los siguientes aspectos:

1. **Inhibición de la liberación de histamina** desde las células mastocito inducida por el compuesto 48/80 (poliamina) y *concanavalina A* o por adriamicina. El ácido ursólico a concentraciones de 1000 μM o mayores, inhibe el compuesto 48/80 *in vitro*, mientras que a 100 μM es solamente un inhibidor débil.¹¹⁸
2. **Inhibición de la actividad lipooxigenasa y ciclooxigenasa.** La reducción de algunos factores inflamatorios producidos durante la cascada de ácido araquidónico, por ej. la síntesis y liberación de PGE_2 y LTB_4 , son suprimidas por ácido oleanólico y ursólico al bloquear el metabolismo del araquidonato.^{84, 119}
3. **Inhibición de la elastasa.** Varios metabolitos triterpenoides pentacíclicos inhiben la HLE; la elastasa es esencial para la fagocitosis y defensa contra infecciones por *invasión de microorganismos*, juega un papel en la respuesta del tejido inflamatorio, en enfermedades reumáticas, efisemia pulmonar, bronquitis crónico, etc.¹²⁰⁻¹²⁴

Se ha demostrado, que el sustrato para HLE (tetrapéptido: MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNa), esta enlazado en 5 subsitios dentro del amplio dominio de union, designados S_1 - S_5 . El ácido ursólico interactúa con el subsitio S_3 (sitio crítico para enlazarse a HLE), como se ilustra en el esquema 1, pero no con los subsitios S_1 y S_2 . Los aminoácidos componentes de S_3 han sido identificados como Val-216 y Phe-192.¹²⁵

El grupo carboxilo de la posición 28 del anillo pentacíclico de los triterpenos contribuye a enlazarse a HLE, el reemplazamiento de este grupo por un hidroxilo como el uvaol (153) análogo del ácido ursólico (154), reduce la potencia de inhibición.

Estos resultados demuestran que las interacciones electrostáticas entre el grupo carboxilo y un grupo cargado positivamente en la enzima contribuye a enlazarse, por lo que la Arg-217 juega un papel crítico en la contribución de la energía de enlace de los inhibidores cargados negativamente a HLE.^{125 y126}



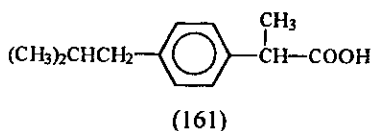
Esquema 1. Representación de unión del ácido ursólico con el sustrato HLE.

4. **Inhibición de la actividad del complemento.** El ácido oleanólico posee un efecto inhibitorio en el modelo del complemento clásico, mientras que en el modelo alterno no presenta inhibición, tal como se especifica en la tabla XI. El efecto del ácido oleanólico en la actividad del complemento clásico, se debe principalmente a la inhibición de la C₃-convertasa, una serina proteasa.¹²⁴

Tabla XI. Efecto del ácido oleanólico en el modelo del complemento clásico y alterno.

Compuesto	Clásico		Alterno	
	Absorción a 60 min.	% inhibición	Absorción a 30 min.	% inhibición
Control	0.992 ± 0.009	---	0.959 ± 0.012	---
Ácido oleanólico (144)	0.145 ± 0.002*	85.38	0.950 ± 0.015	0.93
Ibuprofeno (161)	0.350 ± 0.013*	64.72	0.947 ± 0.011	1.25

*P<0.001.



1.2.4. RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DE TRITERPENOS PENTACÍCLICOS.

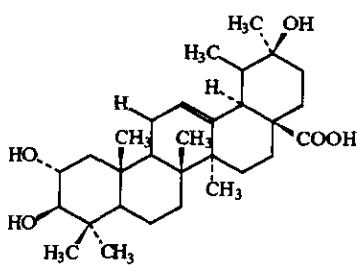
A pesar de los diversos estudios publicados referentes a la actividad antiinflamatoria del ácido glicirretínico, ácido ursólico, ácido oleanólico, etc, solo pocos describen los requerimientos estructurales para esta actividad.

Investigaciones recientes determinaron el efecto antiinflamatorio de 10 triterpenos, en diferentes modelos de inflamación *in vivo*, para poder proponer una relación estructura actividad. Estos compuestos corresponden a la serie del **oleano**: β -amirina (142), eritrodíol (143), ácido oleanólico (144) hederagenina (145), α -ácido glicirretínico y β -ácido glicirretínico (148 y 149 respectivamente); del **ursano**: α -amirina (152), uvaol (153) y ácido torméntico (162) y series del **lupano**: lupeol (163). Los resultados se muestran en la tabla XII, observándose que el esqueleto base del triterpeno no tiene influencia en la actividad antiinflamatoria, ya que todos los triterpenos que se probaron tienen actividad antiinflamatoria dependiendo del método ensayado. Sin embargo, se encontraron algunos compuestos activos con los tres métodos ensayados (gráfica I).

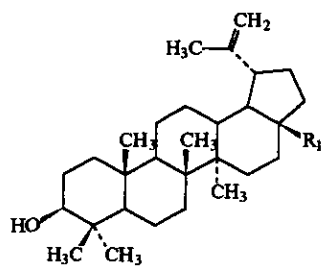
Tabla XII. Actividad antiinflamatoria.

Producto	Edema-carragenina % de inhibición			Edema-TPA % inhibición
	1h	3h	5h	
β -amirina (142)	----	----	----	64**
eritrodíol (143)	14	17	40**	93**
ácido oleanólico (144)	1	25	22*	80**
hederagenina (145)	0	26	14	63**
α -ácido glicirretínico (148)	-3	27	28**	90**
β -ácido glicirretínico (149)	31	34*	16	90**
α -amirina (152)	20	26	31**	72**
uvaol (153)	0	19	27**	61**
ácido torméntico (162)	0	36**	35**	85**
lupeol (163)	14	7	27**	66**
indometacina (157)	20	57**	50**	95**
fenilbutazona (158)	54*	59**	49*	----

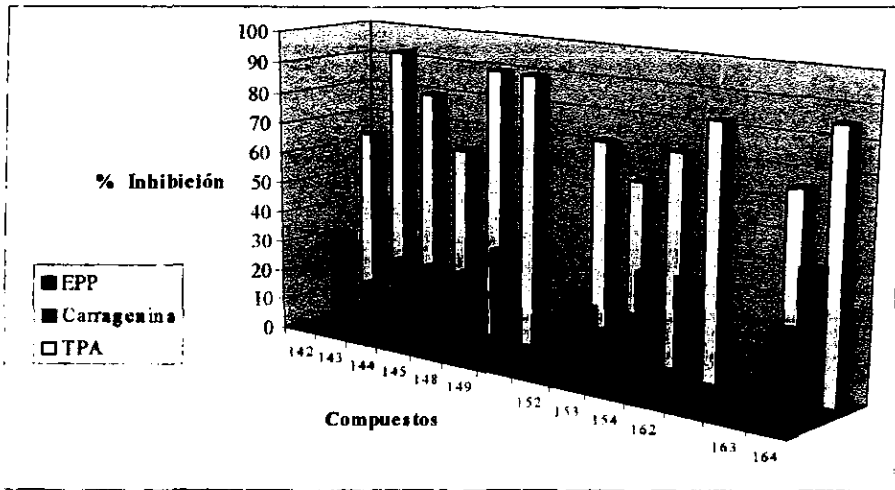
Los porcentajes de reducción del edema son expresados por la media con SEM. *P< 0.05, **p<0.01.



(162)



(163) R₁ = CH₃
 (164) R₁ = COOH



Gráfica I. Comparación de la actividad antiinflamatoria de los triterpenos en tres modelos ensayados.

Con respecto a la prueba de la carragenina, la presencia de un grupo carboxilo en C-28 o C-30 incrementa la actividad, siendo los compuestos carboxílicos los más activos a las 3h (ej. ácido betulínico (164), ácido glicirretínico (148) y torméntico (162)). En contraste con la actividad mencionada de los compuestos ácidos, el eritrodiool presentó un alto porcentaje de inhibición a las 5h con respecto a los demás compuestos (ver la tabla XII).

Con respecto a la actividad contra el edema inducido con TPA, ésta fue considerable para todos los productos en general, los triterpenoides ácidos fueron los compuestos más activos, aunque el eritrodíol sobrepasa nuevamente a todos los demás.

A diferencia de lo que se vio anteriormente, la actividad contra el edema inducido con EPP fue escasa y no mostró alguna relación con la presencia de un grupo carboxilo. Sin embargo, parece que un grupo CH_2OH en C-17 es positivo en la serie oleano, mientras que el 3-hidroxilo del ácido ursólico es un factor esencial para la actividad antiinflamatoria.¹²⁷

Por otro lado, en la tabla XIII se dan a conocer los resultados de otros estudios realizados, en varios derivados 4,4-dimetilcolestano, de estructura similar al ácido ursólico, que se obtuvieron durante un estudio sintético de los derivados del colesterol. El 4,4-dimetilcolestano-3 α , 5 α -diol (168) fue el inhibidor más potente entre los 4,4-dimetilcolestanos probados, esta actividad inhibitoria fue comparable al ácido ursólico y ácido glicirretínico. Aunque los compuestos a probar fueron limitados, los resultados sugieren que la oxidación del 3-hidroxilo (166) al grupo 3-oxo (167) incrementa la actividad inhibitoria, mientras que la epoxidación del doble enlace disminuye la actividad.¹²⁸

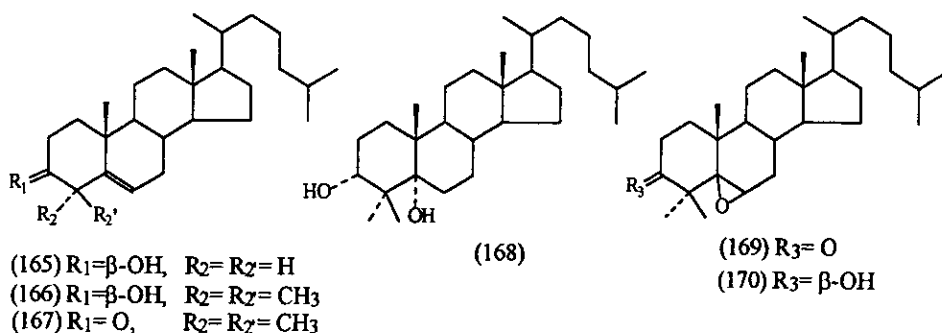


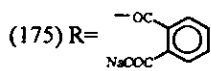
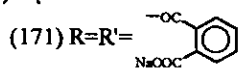
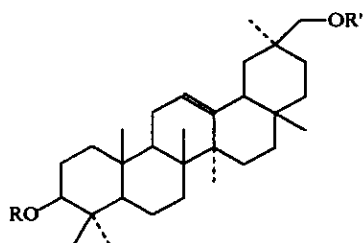
Tabla XIII. Actividad inhibitoria en la inflamación de la oreja del ratón, inducido con HHPA.

Compuesto	Aplicación de 200 µg		Aplicación de 50 µg	
	% de inhibición	D ± SE (n)*	% de inhibición	D ± SE (n)*
Acido ursólico (154)	49	3.3 ± 0.7 (4)*	33	2.2 ± 0.5 (4)*
Acido glicirretínico	30	2.2 ± 1.1 (4)	21	1.4 ± 0.3 (4)
Colesterol (165)	-38	-2.5 ± 0.8 (5)	-25	-1.7 ± 0.6 (4)
4,4-dimetil-colesterol (166)	15	1.0 ± 0.6 (5)	-15	-1.0 ± 0.9 (6)
4,4-dimetil-5-colesten-3-ona (167)	34	2.3 ± 0.5 (6)**	-2	-0.1 ± 0.8 (4)
4,4-dimetilcolestan-3α,5α-diol (168)	52	3.5 ± 1.0 (7)**	21	1.4 ± 0.7 (6)
4,4-dimetil-5,6-α-epoxicolestan-3-ona (169)	22	1.5 ± 0.7 (5)	-2	-0.1 ± 0.7 (6)
4,4-dimetil-5,6-α-epoxicolestan-3β-ol (170)	2	0.1 ± 0.6 (9)	-24	-1.6 ± 0.3 (4)*

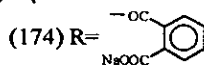
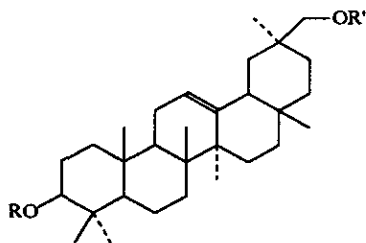
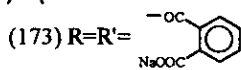
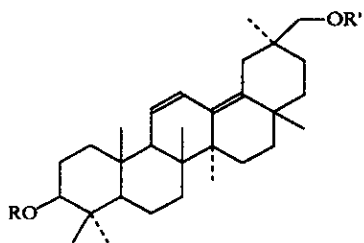
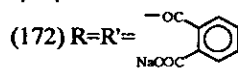
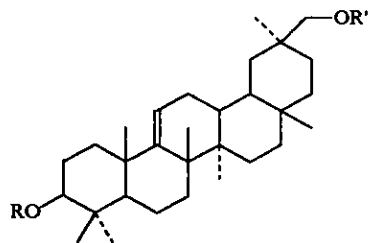
a. El número de experimentos se muestra en parentesis. D= media de la diferencia entre el disco de la oreja tratado con HHPA (2µg) y del compuesto probado.

* p<0.05 y ** p<0.01.

Algunos de los derivados del ácido glicirretínico, como los compuestos dihemifitalato: sal disódica de 18β-olean-12-en-3β, 30-diol-di-O-hemifitalato (171), 18β-olean-9(11), 12-dien-3β, 30-diol-di-O-hemifitalato (172) y olean-11, 13 (18)-dien-3β,30-diol-di-O-hemifitalato (173), inhiben la actividad ciclooxigenasa y lipooxigenasa; así mismo, se encontró que estos compuestos inhiben el edema de la oreja en ratones inducida con ácido araquidónico por supresión de la producción de LTB₄ y PGE₂¹²⁹⁻¹³¹ El ácido glicirretínico hemifitalato (174) y deoxoglicirretol 3-O-monohemifitalato (175) tiene poco efecto. Estos resultados sugieren que la substitución dihemifitalato en el esqueleto oleano de estos compuestos es esencial para el efecto inhibitorio potente en el edema de la oreja inducido con TPA.^{132 y 133}



$R' = H$



$R' = Na$

1.3. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.

A pesar de la diversidad tan amplia de antibióticos que se usan clínicamente y sus análogos semisintéticos, aún continúan los estudios para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos; ya que la combinación genética de varios microorganismos y los usos excesivos de antibióticos, conduce a un incremento en la resistencia de microorganismos previamente sensibles y al surgimiento de nuevas infecciones.

Una de las posibles estrategias para encontrar nuevos fármacos antimicrobianos, involucra al estudio de compuestos con diferentes estructuras a los de uso actual. Estos compuestos deberán ser extraídos de orígenes que han sido explorados considerablemente menos que los microorganismos tradicionales, como pueden ser las plantas superiores.¹³⁴ Las plantas han sido usadas por siglos como remedio para enfermedades humanas. Esto tiende a fomentar a los científicos a un rastreo de plantas que poseen varias actividades biológicas incluyendo efectos antibacteriales y antifúngicos, dado que su uso no esta soportado por algún estudio científico.¹³⁵

Dado la complejidad de los extractos de las plantas, existen trabajos relativamente limitados que conducen al aislamiento de sus agentes antibacteriales. El principal problema ha sido la interferencia en ensayos *in vitro* por la diversidad estructural o algunas veces compuestos altamente coloreados, las propiedades lipofílicas de algunas muestras, la insolubilidad en agua de aceites esenciales y extractos no polares hace que sean muy difíciles para usarlos en un medio acuoso para el estudio de actividad antimicrobiana. Por otro lado, los resultados obtenidos son profundamente determinados por el microorganismo empleado, el volumen del inóculo, la composición del medio de cultivo, el pH y la temperatura de incubación.^{136 y 137}

Existen diversos métodos para detectar la actividad antimicrobiana, y pueden ser clasificados en tres grupos: dilución, difusión y bioautografía; los cuales difieren en su sensibilidad.

Método de dilución.

La técnica de dilución incluye un medio líquido y un medio sólido, ambos métodos se basan en la dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo. Estos métodos son los mejores, cuando es necesario ensayar muestras solubles en agua o muestras lipofílicas (aceites esenciales), suspensiones de sólidos o emulsiones y sustancias antimicrobianas que no difunden a través del medio de agar y que pueden ser incorporados directamente dentro del agar.¹³⁷

El método de dilución en medio líquido, es el más complicado pero también la técnica más precisa.¹³⁸ Este método es el más recomendado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de una muestra pura y la Concentración Mínima Bactericida (MBC). En este método la turbidez es tomada como una indicación de la densidad bacterial.¹³⁹

En el método de dilución en agar, se mezcla una cantidad de la muestra con el agar nutritivo. La ventaja de este método es su simplicidad, la posibilidad de usarlo con muestras solubles o insolubles en agua y de que 6 microorganismos pueden ser usados en una caja de Petri.

Método de difusión.

En este método se emplea un disco, un cilindro o un hoyo en el agar como reservorio y se basa en medir el diámetro de la zona de inhibición. Este método no es aceptable cuando las muestras no son altamente solubles en agua como en el caso de aceites esenciales o extractos no polares. Una de las ventajas es que se pueden usar 5 o 6 compuestos por caja contra un simple microorganismo.¹³⁷

El método de hoyo, se usa para suspensiones acuosas de extractos de plantas. La precipitación de sustancias insolubles en agua en el cilindro o el disco previene alguna difusión de la sustancia antimicrobiana dentro del agar. El método de disco en papel filtro es satisfactorio y aceptable para ensayar antibióticos solubles en agua.¹⁴⁰

Método bioautográfico.

Es un método para localizar la actividad antibacteriana en un cromatograma. Casi todos los procedimientos se basan en la técnica de difusión en agar, en el cual los compuestos antibacteriales son transferidos desde la capa cromatográfica a una caja de agar inoculado, seguido de un proceso de difusión del compuesto, las zonas de inhibición son después visualizadas; otra técnica consiste en realizar una suspensión del microorganismo en un caldo, para posteriormente ser aplicado a la cromatografía en capa fina (TLC) desarrollada¹³⁶. La incubación en una atmósfera húmeda permite el crecimiento de la bacteria, las zonas de inhibición son después visualizadas con un reactivo de detección-actividad-deshidrogenasa, ej. sales tetrazolio (TTC) en el que las bacterias metabólicamente activas, convierten la sal tetrazolio en el correspondiente formazano intensamente coloreado¹⁴¹, otros indicadores redox tales como 2,6-diclorofenol-indofenol también pueden ser empleados; el uso de *p*-iodonitrotetrazolio violeta (INT) es uno de los más sensibles. Buenos resultados se han obtenido, con el método que se basa en la capacidad del organismo para hidrolizar la aesculina.¹⁴²

En comparación con la cromatografía en papel (PC), la técnica de TLC tiene un gran poder resolutivo y es el más rápido de las dos técnicas, ya que el lento desarrollo de la cromatografía en papel no da una separación satisfactoria de los diversos compuestos.¹⁴³⁻¹⁴⁴

Sin embargo, en las últimas décadas un amplio programa de rastreo de extractos de plantas se han realizado, no solo para determinar la actividad antibacterial y antifúngica,¹⁴⁵⁻¹⁴⁹ sino también para la actividad antiviral, antiparasitaria y otras actividades biológicas. En la literatura se ha informado que los agentes antimicrobianos responsables de estas actividades en las plantas son: los polifenoles, taninos, saponinas esteroidales, saponinas triterpénicas, ácidos monoterpénicos y alcoholes sesquiterpénicos, esteroides diterpenos e iridoídes.¹⁴⁵ Considerando el número enorme y la sorprendente diversidad estructural de los constituyentes de las plantas con actividad antimicrobiana, hace pensar que los agentes antimicrobianos prometedores que actúan localmente y/o sistémicamente, pueden ser descubiertas en el reino de las plantas.

2. ΜΕΤΟΔΟΛΟΓΙΑ.

2. METODOLOGÍA

2.1. ESTUDIO QUÍMICO.

Se adquirió el cedrón (*Aloysia triphylla*, colectado en el Estado de Puebla, San Andrés Jalpan) fresco en el mercado de Sonora, ubicado en la Delegación Venustiano Carranza, México, D.F., el 29 de Septiembre de 1996, fue identificada y clasificada por la M. en C. Abigail Aguilar, con número de registro 11875 y 11877 en el Herbario del Centro Médico Siglo XXI (IMSSM).

La planta fue separada en flores, flores-hojas y hojas-tallos; posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente. A cada parte se le adicionó disolvente de diferente polaridad, para obtener mediante maceración los extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos, y finalmente se procedió a realizar la hidrólisis de la planta en medio ácido, como se indica en la tabla XIV.

Partes de la planta (peso inicial en g.)	Extracto (peso en g.)			
	Hexánico	Clorofórmico	Metanólico	Hidrólisis en HCl al 5%
Hojas-tallos (3504.7)	55.3	98.8	345.2	0.8184
Flores-hojas (350.0)	10.42	12.6	42.80	0.3050
Flores (380.5)	9.17	14.9	35.0	0.3663

Tabla XIV. Pesos de los extractos obtenidos.

Los extractos fueron evaluados frente a *Artemia salina*, para determinar su LC₅₀ –tabla XV, pp 62– así mismo, se determinó su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, los resultados se muestran en las tablas XVI, XVIa y XVII respectivamente (pp 63-65).

2.1.1. EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS-TALLOS.

La separación de los metabolitos secundarios mayoritarios, se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna a vacío (CCV). Para lo cual se tomaron 295.4 g del extracto metanólico de hojas-tallo y se adsorbieron en 345.4 g de celita, los cuales fueron aplicados en una columna previamente empacada con sílica gel para CCF -1382.8 g, 13.5 cm de altura y 16.4 cm de diámetro- de donde se obtuvieron 489 fracciones de 500 ml cada una.

Hispidulina (111).

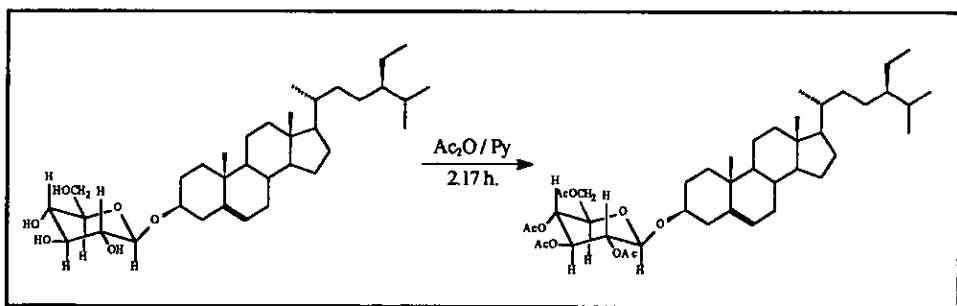
De las fracciones 8-24, obtenidas al eluir la columna con una polaridad de Hex-AcOEt (1:1), se purificaron mediante una serie de recristalizaciones por par de disolventes (MeOH-AcOEt), 74.5 mg (0.0252%) de un sólido amorfo de color amarillo claro, pf. 253.5-256°C, soluble en MeOH-AcOEt caliente y DMSO e insoluble en hexano, AcOEt y CHCl_3 , el cual da prueba positiva al revelar con FeCl_3 en etanol al 1%, dicha sustancia fue identificada como hispidulina, con base a los datos espectroscópicos de IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (los datos se encuentran en la pp 58).

β -D-glucósido del β -sitosterol (176).

De las fracciones 121-210, colectadas al eluir la columna con una polaridad de Hex-AcOEt (de 4:6 a 2:8), se obtuvieron 257.9 mg (0.0873 %) de un sólido amorfo de color blanco, soluble en propanol caliente y en una mezcla de MeOH- CHCl_3 caliente e insoluble en hexano, MeOH, EtOH y propanol a temperatura ambiente. El espectro de IR (espectro 4) muestra una banda muy intensa a 3381.1 cm^{-1} , lo que permitió suponer que la molécula tiene varios grupos hidroxilos, por lo que se realizó una reacción de acetilación para obtener el derivado *per*-acetilado de dicho compuesto.

Obtención del acetilado del β -D-glucósido del β -sitosterol (176a).

A 93.0 mg del sólido obtenido de las fracciones 121-184 fueron suspendidos en 7 ml de CHCl_3 y se hicieron a reaccionar con 1 ml de anhídrido acético, 0.5 ml de piridina y 6 gotas de ácido acético por 2.17 h. Una vez concluida la reacción, fueron agregados 7 ml de agua. La recuperación del producto se logró mediante extracciones con cloroformo (6 x 5 ml), la fase clorofórmica obtenida fue lavada con HCl al 10%, posteriormente se trató con una solución de NaHCO_3 al 10% y finalmente se realizaron lavados con agua y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El producto fue purificado por recristalizaciones por par de disolventes (CHCl_3 -Propanol), de donde se obtuvieron 71.2 mg (76.6%) de unos cristales en forma de agujas, solubles en hexano, CHCl_3 e insolubles en propanol, el cual presentó un pf. 166-168.5°C. La identificación y caracterización se hizo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas (pp 58 y 59), las que permitieron concluir que se trataba del *per*-acetil-glucósido del β -sitosterol, como se ilustra en el esquema 2.



Esquema 2. Reacción de acetilación del β -D-glucósido del β -sitosterol.

2.1.2. EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE HOJAS-TALLOS.

Se adsorbieron 93.7 g de extracto clorofórmico de hojas-tallos en 113.15 g de celita, y su diferenciación cromatográfica se llevó a cabo por CCV utilizando mezclas de disolventes de distinta polaridad creciente (Hex-AcOEt-Acetona-EtOH) colectándose 506 fracciones de 300 ml cada una.

Se realizó el seguimiento biodirigido del fraccionamiento de la columna frente a *Artemia salina* (tabla XVIII, pp 66).

β -sitosterol (177).

De las fracciones 101-113, eluidas con un sistema de Hex-AcOEt (97:3), se obtuvieron 105.5 mg (0.1128%) de un sólido amorfo de color blanco, soluble en AcOEt, acetona y metanol, con pf. 127-129°C; la identificación de esta sustancia se logró por medio de los datos obtenidos de sus análisis espectroscópicos de IR, RMN-¹H, y espectrométrico (los datos se localizan en la pp 59), lo que permitió concluir que se trataba del β -sitosterol

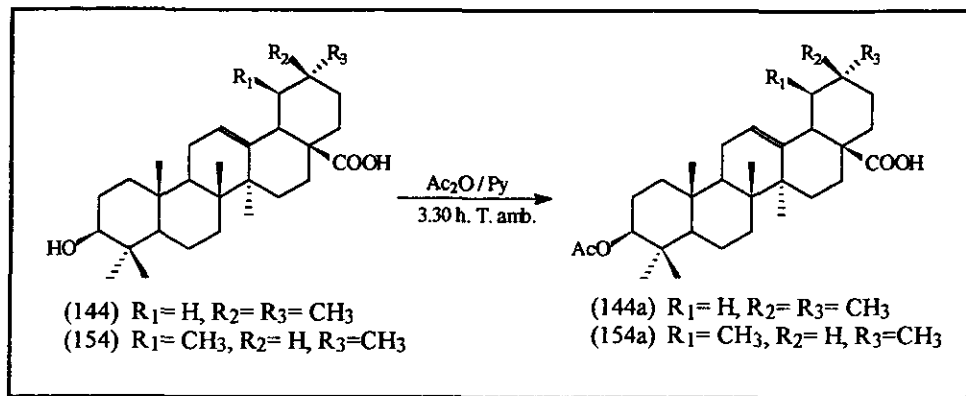
Ácido oleanólico y ácido ursólico (144 y 154).

De las fracciones 204-293, colectadas al eluir la columna con un sistema de Hex-AcOEt (9:1 - 7:3), se purificaron 170 mg (0.1814%) de un sólido blanco amorfo con pf. 70-72°C, soluble en acetona y AcOEt caliente e insoluble en AcOEt, acetona y MeOH a temperatura ambiente. En CCF se observó una mancha característica de un ácido al revelar con sulfato cérico amoniacal, además en su espectro de IR (espectro 10) se observa la presencia del grupo carboxílico e hidroxilo, por lo que se procedió a la obtención del correspondiente derivado acetilado.

Ácido 3 β -acetil oleanólico y ácido 3 β -acetil ursólico (144a y 155a).

A 297.7 mg del sólido (sustancias 144 y 145) obtenido de las fracciones 204-293, se le adicionaron 2 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina seca. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 3.30 h, siguiéndose el curso de la misma por CCF. Una vez terminada la reacción, se adicionaron 5 ml de agua, para posteriormente proceder de manera convencional a la recuperación del producto de interés, de donde se obtuvieron 290 mg (97.4%) de un producto cristalino de color beige con p.f. 158-161; en CCF se observó una mezcla de sustancias, las cuales fueron identificadas como ácido 3 β -acetil ursólico y

ácido 3 β -acetil oleanólico por medio de un análisis espectroscópico (IR, RMN-¹H) y espectrométrico (EM/IE), éstos datos se indican en la pp 60.



Esquema 3. Reacción de acetilación del ácido oleanólico y ursólico.

Hispidulina (111).

En los eluatos 271-348, recogidos con Hex-AcOEt (75:25 - 4:6) se determinó por medio de CCF la presencia de la hispidulina, sustancia previamente aislada del extracto metanólico de la especie vegetal objeto de estudio.

β -D-glucósido del β -sitosterol (176).

De las fracciones 352-384, colectadas con una polaridad de Hex-AcOEt (3:7) hasta AcOEt-Acetona (7:3), se aisló una sustancia, que fue recrystalizada por par de disolventes [AcOEt-MeOH caliente], de donde se obtuvieron 244.4mg (0.2608%) del β -D-glucósido del β -sitosterol sólido blanco amorfo que es insoluble en acetona, cloroformo y AcOEt caliente.

2.1.3. EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE FLORES.

Se pesaron 7.83 g de extracto, los cuales fueron adsorbidos en 14 g de celita, a continuación se aplicaron en una columna empacada con 77.9 g de sílica gel para CCF (6 cm de diámetro y 14 cm de altura), el fraccionamiento de la columna se realizó con hexano y mezclas de polaridad creciente, obteniéndose 844 fracciones de 50 ml cada una.

β -sitosterol (177).

De los eluatos 130-164, obtenidos con una polaridad de Hex-AcOEt (97:3), se detectó por CCF la presencia del β -sitosterol empleando como referencia una muestra auténtica.

Hispidulina (111).

En las fracciones 380-415, colectadas con una mezcla de Hex-AcOEt (87:13 - 84:15), se identificó la presencia de la hispidulina al ser comparada con una referencia de hispidulina.

Acido oleanólico y ácido ursólico (144 y 145).

De las fracciones 362-511, obtenidas con una mezcla de Hex-AcOEt (9:1 - 65:35), se identificó por medio de CCF la mezcla de ácido oleanólico y ursólico, al ser comparada con una muestra auténtica.

β -D-glucósido del β -sitosterol (176).

Al coleccionar las fracciones 561-651 con una mezcla Hex:AcOEt (6:4 - 4:6), se detectó en CCF la presencia al β -D-glucósido del β -sitosterol.

2.1.4. HIDRÓLISIS DE FLORES, FLORES-HOJAS Y TALLOS-HOJAS.

Después de realizar el extracto metanólico de flores y hojas, el vegetal fue colocado a reflujo con HCl al 5% por 13.30 h, posteriormente se neutralizó con NH₄OH al 70%, a la fase acuosa resultante se le realizó una extracción líq.-líq. con CHCl₃ por 38.7 h.

De igual manera, las hojas-tallo que fueron empleadas para obtener el extracto metanólico se pusieron a reflujo con HCl al 5% por 12.23 h, a continuación se neutralizó con una solución de NH₄OH, finalmente se filtró el precipitado formado y la fase acuosa fue extraída con CHCl₃ por 22 h.

De acuerdo a la CCF, los dos extractos obtenidos fueron reunidos para separar los metabolitos secundarios mayoritarios, por medio de una serie de recromatografías en columna abierta, de donde se obtuvo un residuo de aspecto aceitoso de color anaranjado, que en CCF muestra una mezcla de sustancias con igual R_f, las cuales fueron separadas y caracterizadas por medio de una Cromatografía de Gases acoplada a Masas y que corresponden a: 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (178) y 3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-ona (179), sus datos espectrométricos se indican en la pp 61. Además, se determinó la toxicidad de estos dos extractos frente a *Artemia salina*, como se muestra en la tabla XV (pp 62).

Una vez realizado el extracto metanólico de flores, éste se sometió a una hidrólisis en medio ácido, como ya se indicó anteriormente, para posteriormente realizar los bioensayos con *Artemia salina*, las pruebas microbiológicas y las pruebas antiinflamatorias, los resultados se indican en la pp 62-65.

2.1.5. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR.

A 12.32 Kg de hojas-tallo de planta fresca se le adicionó una solución de NaCl al 10%, para posteriormente realizar una destilación por arrastre de vapor, de donde se obtuvieron 3.0277 g de aceite esencial.

De igual manera 750 g de flores, se agregaron a una solución de NaCl al 10% para obtener 500 mg de aceite esencial.

El aceite esencial de las hojas-tallo y flores fueron evaluados microbiológicamente, los resultados de muestran en la XVI y XVIa (pp 63 y 64).

2. 1. 6. ESTUDIO QUÍMICO Y BIOLÓGICO PRELIMINAR DE *Aloysia triphylla*.

En un estudio preliminar realizado a las hojas de *Aloysia triphylla*, los extractos hexánico, acetónico y metanólico obtenidos mediante maceración fueron evaluados frente a *Artemia salina*, además se determinó su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, como se muestra en la tabla XV-XVII, pp 62-65.

Por otra parte, se realizó la hidrólisis de las hojas de la siguiente manera: se colocó a reflujo con CH₃COOH al 10% por 12.45 h., posteriormente se alcalinizó con KOH al 10% y finalmente se realizaron extracciones liq.-líq. Con CHCl₃ por 14.15 h. A continuación se realizaron a cada extracto pruebas cualitativas¹⁵⁰ para la detección de alcaloides, como se describe a continuación:

100 mg de cada extracto fueron disueltos en una pequeña cantidad de disolvente y aforados a 50 ml, posteriormente se tomaron alícuotas de 2 ml colocándolas en viales de 10 ml, para obtener una concentración de 4 mg, finalmente se dejó evaporar el disolvente.

A la par se realizó un control positivo, con el extracto etanólico de las semillas del colorín macho (*Erythrina americana*) y colorín hembra (*Erythrina americana*), pesando 50 mg de cada extracto y aforando a 50 ml, para obtener finalmente 3 mg al tomar alícuotas de 3 ml.

Por último a cada vial se le adicionaron lentamente 25 gotas de cada reactivo, los resultados se muestran en la tabla XIX (pp 67).

2.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

2.2.1. BIOENSAYOS CON *Artemia salina*¹⁵¹

Preparación de las muestras.

Se pesaron 20 mg de cada extracto o fracciones, los cuales se disolvieron en 2 ml de disolvente, a continuación se tomaron por triplicado 5, 50 y 500 μ l, colocándolos en viales de 20 ml. El disolvente se dejó evaporar para poder ser utilizados en el bioensayo.

Incubación de las *Artemias*:

Se incubaron 50 mg de huevecillos de *Artemia salina* en agua de mar artificial a una temperatura de 27-28°C, con un sistema de aereación continuo y bajo una lámpara eléctrica por 48 h. Después de este tiempo, las larvas fototróficas fueron colectadas con una pipeta Pasteur para ser empleadas en el bioensayo.

Bioensayo.

A cada vial con muestra, se le adicionaron 200 μ l de DMSO¹⁵² y 2 ml de agua de mar artificial, enseguida se colocaron 10 *Artemias* por vial, aforando posteriormente a 5 ml con agua de mar artificial, para tener finalmente las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. A la par se realizó un blanco bajo las mismas condiciones.

Los viales fueron colocados bajo iluminación por 24 h, después de este lapso de tiempo, se contaron las larvas muertas⁽¹⁾ y se calculó la LC₅₀ mediante un programa de cómputo que utiliza el análisis de probitas, descrito por Finney.

⁽¹⁾ En el caso donde en el blanco hubo muertes, el dato fue corregido usando la formula de Abbott's:
% muertes = [(prueba control)/control] x 100

2.2.2. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.

Método de Mitscher.¹⁵³

Preparación de los microorganismos.

Los microorganismos mantenidos en el agar nutritivo, fueron inoculados al medio de cultivo (CST) en tubos de ensayo, dejándolos incubar a 37°C por 24-48 h, para ser utilizados posteriormente en el bioensayo.

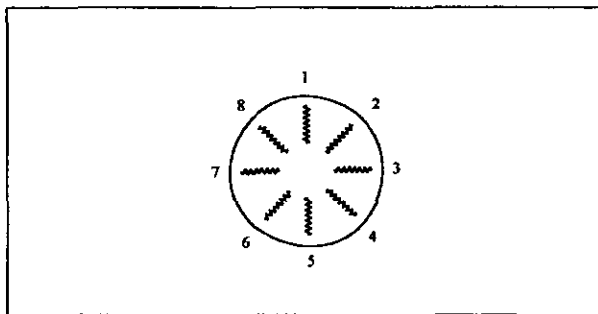
Preparación de las muestras para la prueba.

40 mg de muestra, se disolvieron en 0.5 ml de Tween-80 y 1.5 ml de solución salina al 0.8% en un vial de 10 ml, una vez solubilizado se adicionó la mezcla a un matraz Erlenmeyer que contenía 38 ml del medio AST a una temperatura de 50°C, se mezcló y se vertió por partes iguales en 2 cajas Petri. Una vez solidificado el agar, se incubó a 37°C durante 24 h. para realizar la prueba de esterilidad.

Prueba microbiológica.

Las dos cajas con el extracto⁽²⁾, fueron divididas en 8 sectores cada una, procediéndose a realizar la siembra por la técnica de estría, como se indica en el esquema 4. Finalmente se dejaron incubar las muestras a 37°C por 24 h. y se procedió a observar la inhibición o crecimiento del microorganismo en las cajas Petri. A la par fue realizado un blanco y un control positivo con sulfato de estreptomicina

⁽²⁾ De acuerdo con la prueba de esterilidad, se procedió a realizar el bioensayo.



Esquema 4. Forma del sembrado de los diferentes microorganismos por caja.

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Streptococcus mutans* ATCC 25175
3. *Escherichia coli* ATCC 8739
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9037
5. *Candida albicans* ATCC 10231
6. *Sarcina lutea* Patógena
7. *Mycobacterium smegmatis* DM-93-10
8. No se sembró ninguna cepa

Método de difusión en discos de papel filtro.¹³⁴

Preparación de los microorganismos.

Los microorganismos, se prepararon de igual manera como se indicó en el procedimiento anterior.

Preparación de las muestras para la prueba.

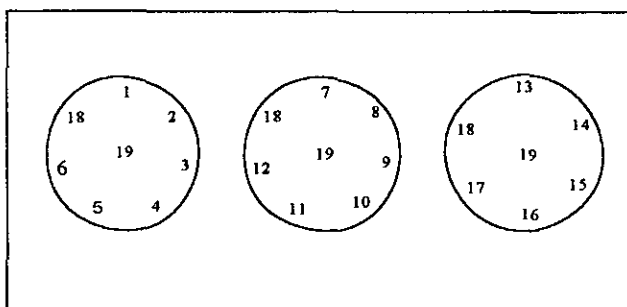
Se pesaron 5 mg de muestra, se disolvieron en 0.5 ml de Tween y 4.5 ml de solución salina al 0.8% en viales de 10 ml.

A la par fue preparado un blanco y un control positivo con sulfato de estreptomicina.

Prueba microbiológica:

A diez cajas Petri (10 x 3) se les adicionaron 20 ml del medio AST a cada una, se dejaron solidificar y se sometieron a prueba de esterilidad por 24 h a 37°C.

Posteriormente, se sembraron masivamente cada caja con cada uno de los microorganismos⁽³⁾. Los discos de papel filtro (0.65 cm de diámetro) fueron humedecidos con las muestras previamente preparadas y colocados en las cajas Petri, por cada microorganismo se emplearon 3 cajas Petri, como se indica en el esquema 5. Se dejaron incubar por 24 h a 37°C y se observó la inhibición o crecimiento del microorganismo al cabo de este tiempo.



Esquema 5. Posición de los discos de papel filtro en la caja Petri.

- | | |
|--|---|
| 1. Extracto hexánico de hojas. | 11. Extracto metanólico de hojas-tallo. |
| 2. Extracto acetónico de hojas. | 12. Extracto metanólico de hojas-flor. |
| 3. Extracto metanólico de hojas. | 13. Hidrólisis de flores en medio ácido. |
| 4. Extracto hexánico de flor. | 14. Mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico. |
| 5. Extracto hexánico de hojas-tallo. | 15. Hidrólisis de hojas-tallo-flor en medio ácido. |
| 6. Extracto hexánico de hojas-flor. | 16. Aceites esenciales de flor. |
| 7. Extracto clorofórmico de flor. | 17. Aceites esenciales de hojas-tallo. |
| 8. Extracto clorofórmico de hojas-tallo. | 18. Blanco. |
| 9. Extracto clorofórmico de hojas-flor. | 19. Control positivo con sulfato de estreptomicina. |
| 10. Extracto metanólico de flor. | |

⁽³⁾ Microorganismo empleado en cada caja Petri :

a. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, b. *Streptococcus mutans* ATCC 25175, c. *Escherichia coli* ATCC 8739, d. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, e. *Candida albicans* ATCC 10231, f. *Sarcina lutea* Patógena, g. *Mycobacterium smegmatis* DM-93-10, h. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4353, i. *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, j. *Salmonella typhimurium* ATCC CDC-10.

2.2.3. PRUEBAS ANTIINFLAMATORIAS.⁽⁴⁾

Se emplearon 3 ratones albinos por muestra, cuyo peso osciló de 28 a 30 g. Los animales fueron anestesiados y posteriormente se les aplicó una solución acetónica de TPA (2.5 µg en un volumen de 10 ml) en la parte interna de cada oreja.

Los compuestos de prueba así como los fármacos se disolvieron en vehículos apropiados y fueron aplicados a la dosis de 0.01 o 1.0 mg en la oreja derecha, mientras que en la oreja izquierda se aplicó el vehículo (oreja control).

La inflamación se desarrolló por espacio de 4 h y al finalizar este lapso de tiempo, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se tomó de la porción central de cada oreja un tapón de 6 mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado.

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

⁽⁴⁾ Estas pruebas fueron realizadas en el Instituto de Química de la UNAM por la M. en C. Teresa O. Ramírez Apan.

3. RESULTADOS.

3. RESULTADOS.

3.1. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS DE LOS EXTRACTOS.

◆ Hispidulina (111).

IR ν_{\max} cm^{-1} (nujol), espectro 1: 3368, 1660, 1610, 1571, 1463, 1378, 1166, 1094.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 + DMSO, TMS), espectro 2: δ 3.92 (*s*, 3H, OCH_3), δ 6.50 (*s*, 1H, H-3), δ 6.54 (*s*, 1H, H-8), δ 6.96 (*dd*, $J= 7.05\text{Hz}$ y 1.95 Hz , 2H, H-3' y 5'), δ 7.75 (*dd*, $J= 6.75\text{ H}$ y 1.95z , 2H, H-2' y 6'), δ 9.68 (*amplia*, 1H, OH-7), δ 13.01 (*s*, 1H, OH-5).

RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + DMSO), espectro 3: δ 182.12 (C-4), δ 163.85 (C-2), δ 160.66 (C-4'), 156.38 (C-7), δ 152.51 (C-5 y C-9), δ 130.95 (C-6), δ 127.53 (C-2' y C-6'), δ 121.50 (C-1'), δ 115.66 (C-3' y C-5'), δ 104.47 (C-10), δ 102.34 (C-3), 93.73 (C-8) y δ 60.84 (OCH_3).

◆ β -D-glucósido del β sitosterol (176).

IR ν_{\max} (CHCl_3) cm^{-1} , espectro 4: 3381, 2725, 1259, 1165, 1110, 1066

◆ *per*-acetil-glucósido del β sitosterol (176a).

IR ν_{\max} (nujol) cm^{-1} , espectro 5: 2958, 2870, 1754, 1371, 1039.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), espectro 6: δ 5.35 (*d*, $J= 5.4\text{ Hz}$, 1H, HC-6), δ 2.00-2.08 [*4s*, 12H, 4($\text{CH}_3\text{COO-}$)], δ 4.58 (*d*, $J= 8.1\text{ Hz}$, 1H, HC-1'), δ 4.95 (*dd*,

$J = 9.3$ y 8.1 Hz, 1H, HC-2'), δ 5.20 (*t*, $J = 9.45$ Hz, 1H, HC-3'), δ 5.07 (*t*, $J = 9.6$ Hz, 1H, HC-4'), δ 3.68 (*dddd*, $J = 10.5$ y 2 Hz, 1H, HC-5'), δ 4.26 (*dd*, $J = 12.45$ y 5.0 Hz, H_aC-6'), δ 4.11 (*dd*, $J = 12.45$ y 2.6 Hz, 1H, H_bC-6'), δ 3.45 (*ddd*, $J = 10$ y 5 Hz, 1H, HC-3), δ 0.68 (*s*, 3H, CH₃-18), δ 0.99 (*s*, 3H, CH₃-19), δ 0.84 (*d*, $J = 6.3$ Hz, 6H, CH₃-26 y CH₃-27), 0.93 (*d*, $J = 7$ Hz, 3H, CH₃-21).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃), espectro 7: 170.66-169.27 (4 AcO-), δ 140.36 (C-5) δ 122.15 (C-6), δ 99.65 (C-1'), δ 80.08 (C-3'). δ 72.71 (C-5'), δ 71.71 (C-3), δ 71.53 (C-2'), δ 68.60 (C-4'), δ 62.13 (C-6'), δ 56.78 (C-14), δ 56.08 (C-17), δ 50.20 (C-9), δ 45.87 (C-24), δ 42.34 (C-13), δ 39.75 (C-12), δ 38.93 (C-4), δ 37.21 (C-1), δ 36.73 (C-10), δ 36.12 (C-20), δ 33.97 (C-22), δ 31.95 (C-7), δ 31.88 (C-25), δ 29.46 (C-8), δ 29.20 (C-2), δ 28.23 (C-23), δ 26.12 (C-16), δ 24.29 (C-28), δ 23.09 (C-15), δ 21.06 (C-11), δ 20.70 (C-19), δ 20.61 (C-26), δ 19.79 (C-21), δ 19.34 (C-27), δ 19.04 (C-29), δ 18.78 (C-18).

E.M. (I.E.) m/z: 396 [M^+ -348, 100%], 331 (18%), 169 (44%), 145 (15%), 127 (13%), 109 (38%), 95 (15%), 81 (19%) y 43 (58%).

♦ **β -sitosterol (177).**

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃) cm⁻¹, espectro 8: 3625, 2925, 2859, 1602, 1044, 1379, 1261, 1193, 1094 y 1018.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), espectro 9: δ 0.68 (*s*, 3H, CH₃-18), δ 0.92 (*d*, $J = 7$ Hz, 3H, CH₃-21) δ 1.01 (*s*, 3H, CH₃-19), δ 0.83 (*t*, $J = 4.1$ Hz, 3H, CH₃-29), δ 0.84 (*d*, $J = 4.26$ Hz, CH₃-26 y CH₃-27), δ 5.35 (*d*, $J = 7.23$ Hz, 1H, CH-6), δ 3.50 (*dddd*, $J = 11$ y 6 Hz, 1H, CH-3) y δ 1.47 (*s*, amplitud, 1 H, H-C₃-OH).

E.M. (I.E.) m/z: 414 [M^+ , 43.21%], 329 (27.16%), 303 (22.22%), 273 (20.98%), 255 (23.46%), 213 (32.10%), 163 (22.22%), 161 (24.69%), 159 (27.16%), 145

(37.04%), 107 (50.62%), 105 (51.85%), 97 (34.57%), 95 (51.85%), 93 (43.21%), 91 (541.85%), 81 (50.62%), 79 (33.33%), 71 (39.51%), 69 (49.38%), 67 (34.57%), 57 (66.66%), 55 (86.42%), 43 (100%), 41 (51.85%) y 40 (32.10%).

♦ **Ácido oleanólico (144) y ácido ursólico (154).**

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} , **espectro 10:** 3369, 2928, 2857, 1733, 1638, 1462, 1373, 1321, 1119, 1027.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), espectro 11: δ 0.7 - 1.2 (señales múltiples), δ 2.20 (*d*, $J= 11.23$ Hz, 1H, H-18), δ 2.84 (*dd*, $J= 13.8$ y 4.3 Hz, 1H, H-18), δ 3.21 (*dd*, $J= 10.2$ y 5.4 Hz, 1H, H-3), δ 5.27 (*tt*, $J= 11.55$ y 3.75 Hz, 1H, H-12).

E.M. (I.E.) m/z: 456 [M^+ , 3.41%], 438 (3.84%), 248 (100%), 236 (5.12%), 203 (39.31%), 189 (12.82%), 175 (6.83%), 133 (23.07%), 119 (9.40%), 95 (10.25%), 69 (15.38%), 55 (15.38%), 43 (14.52%).

♦ **Ácido 3 β -acetil-oleanólico (144) y ácido 3 β -acetil ursólico (154).**

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl_3) cm^{-1} , **espectro 12:** 2973, 2925, 2873, 1691, 1736, 1459, 1314, 1386, 1369, 1250, 1214.

E.M. (I.E.) m/z: 498 [M^+ , 1.66%], 438 (4.16%), 300 (3.33%), 248 (100%), 219 (7.5%), 203 (35.83%), 190 (26.66%), 147 (6.66%), 133 (26.66%), 119 (9.16%), 69 (8.33%), 43 (8.33%).

Ácido 3 β -acetil ursólico (154).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), espectro 13: δ 5.24 (*t*, $J= 3.9$ Hz, 1H, CH-12), δ 4.50 (*t*, $J= 8.1$, 1H, H-C-OAc), δ 2.19 (*d*, $J= 10.2$ Hz, 1H, CH-18), δ 2.05 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), δ 1.20 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-27}$), δ 1.08 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-25}$), δ 0.98 (*s*, 3H, $\text{CH}_3\text{-24}$),

δ 0.94 (s, 3H, CH₃-23), δ 0.92 (s, 3H, CH₃-29), δ 0.85 (s, 3H, CH₃-30), δ 0.79 (s, 3H, CH₃-26).

♦ **2-furancarboxaldehido (178).**

RT (min), espectro 14: 13.61. GC-MS

E.M. (I.E.) m/z, espectro 14a: 126 [M⁺ 79.57 %], 97 (100%), 69 (21.05%), 41 (48.59%), 39 (23.23%).

♦ **3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (179).**

RT (min), espectro 14: 15.78. GC-MS

E.M. (I.E.) m/z, espectro 14b: 126 [M⁺ 76.76 %], 109 (84.50%), 81 (16.19%), 71 (100%), 53 (14.08%), 43 (27.46%), 41 (9.85%).

3.2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Tabla XV. Bioensayos de toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina*.

EXTRACTO	LC ₅₀ (ppm)	LSC LIC
HOJAS		
Hexánico	238.60	310.44 - 184.88
Acetónico	597.56	824.07 - 451.84
Metanólico	568.70	778.44 - 431.23
FLOR		
Hexánico	496.64	662.28 - 382.46
Clorofórmico	39.65	68.68 - 19.71
Metanólico	> 1000	----
Hidrólisis	72.25	96.12 - 53.41
HOJAS-FLOR		
Hexánico	> 1000	----
Clorofórmico	310.02	451.91 - 221.52
Metanólico	> 1000	----
HOJAS-TALLO		
Hexánico	> 1000	----
Clorofórmico	249.59	547.84 - 136.66
Metanólico	> 1000	----
HOJAS-TALLO-FLOR		
Hidrólisis	236.74	371.76 - 159.38

Tabla XVI. Evaluación microbiológica de los extractos obtenidos (1 mg/ml) por el método de Mitscher.

EXTRACTO	MICROORGANISMO						
	1	2	3	4	5	6	7
HOJAS							
Hexánico	-	-	-	-	±	-	±
Acetónico	-	-	-	-	-	-	±
Metanólico	-	-	-	-	-	-	±
FLOR							
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	±
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-FLOR							
Hexánico	-	-	-	-	-	-	±
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	±
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-TALLO							
Hexánico	-	-	-	-	-	-	±
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	±
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-TALLO-FLOR							
Hidrólisis	-	-	-	-	-	-	-
ACEITES ESENCIALES							
Hojas-tallo	-	-	-	-	±	-	+
Flor	-	-	-	-	-	-	±
MEZCLA DE ÁCIDOS URSÓLICO Y OLEANÓLICO							
	-	-	-	-	±	-	±

- = no hay inhibición

± = crecimiento ligero

+ = inhibición

1. *Staphylococcus aureus*.
2. *Streptococcus mutans*.
3. *Escherichia coli*.
4. *Pseudomonas aeruginosa*.

5. *Candida albicans*.
6. *Sarcina lutea*.
7. *Mycobacterium smegmatis*.

Tabla XVIa. Evaluación microbiológica de los extractos obtenidos (1 mg/ml) por el método de difusión en disco.

EXTRACTO	MICROORGANISMO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HOJAS										
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FLOR										
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-FLOR										
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-TALLO										
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanólico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HOJAS-TALLO-FLOR										
Hidrólisis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACEITES ESENCIALES										
Hojas-tallo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEZCLA DE ÁCIDOS URSÓLICO Y OLEANÓLICO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- = no hay inhibición

± = crecimiento ligero

+ = inhibición

1. *Staphylococcus aureus*.
2. *Streptococcus mutans*.
3. *Escherichia coli*.
4. *Pseudomonas aeruginosa*.
5. *Candida albicans*

6. *Sarcina lutea*.
7. *Mycobacterium smegmatis*.
8. *Lactobacillus acidophyllus*.
9. *Streptococcus faecalis*.
10. *Salmonella typhimurium*

Tabla XVII. Actividad antiinflamatoria de los extractos en el edema inducido con TPA en la oreja del ratón.

EXTRACTO	DOSIS (mg)	% DE INHIBICIÓN DEL EDEMA
HOJAS		
Hexánico	0.5	16.90
Acetónico	0.5	12.30
Metanólico	0.5	2.0
FLOR		
Hexánico	0.5	26.32
Clorofórmico	0.5	12.25
Metanólico	0.5	21.80
Hidrólisis	0.5	3.13
HOJAS-FLOR		
Hexánico	0.5	34.67
Clorofórmico	0.5	13.90
Metanólico	0.5	15.13
HOJAS-TALLO		
Hexánico	0.5	18.55
Clorofórmico	0.5	17.14
Metanólico	0.5	22.66

Tabla XVIII. Bioensayos de toxicidad del fraccionamiento del extracto clorofórmico frente a *Artemia salina*.

FRACCION	LC ₅₀ (ppm)	LSC LIC
1-3	50.28	69.83 - 35.35
37-70	> 1000	----
71-79	295.48	540.32 - 182.32
81-91	141.43	187.73 - 106.76
131-171	100.14	174.78 - 57.36
172-181	575.43	829.85 - 421.13
204 - 217	0.0121	0.51 - 0.00
304-312	> 1000	----
352-367	> 1000	----
382-417	> 1000	----
418-437	> 1000	----
494-503	505.07	1204.33 - 278.51

3.3. PRUEBAS DE ALCALOIDES DEL ESTUDIO PRELIMINAR.

Tabla XIX. Pruebas de alcaloides realizados al estudio preliminar de *Aloysia triphylla*.

EXTRACTO	REACTIVO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Hexánico (4 mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Acetónico (4 mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Metanólico (4 mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Colorín hembra (3 mg)	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Colorín macho (3 mg)	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Hidrólisis en medio ácido (6 mg)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

+ = turbidez o precipitación.

- = no hay turbidez o precipitación.

Reactivo:

- 1. Mayer I
- 2. Mayer II
- 3. Mayer III
- 4. Wagner I
- 5. Wagner II
- 6. Hager
- 7. Bouchardat
- 8. Valder
- 9. Dragendorf
- 10. Acido tánico
- 11. Scheibler
- 12. Erdann

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

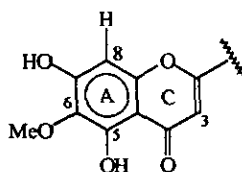
4.1. ANÁLISIS QUÍMICO.

Hispidulina (111, extracto metanólico de hojas-tallos).

De las fracciones 8-24 obtenidas con una polaridad de Hex-AcOEt (1:1), se obtuvo un sólido amorfo de color amarillo claro con pf. 253.5-256°C y que en CCF da prueba positiva al emplear como revelador químico FeCl_3 en etanol al 1%. En el espectro de IR (espectro 1) se observan las bandas en 1660 y 1610 cm^{-1} que pueden corresponder a un grupo carbonilo que forma un quelato con un hidrógeno de un grupo hidroxilo (3368 cm^{-1}). Además, en 1378 cm^{-1} se visualiza una banda correspondiente a un hidrógeno vinílico. Esto hace suponer que se trata de un flavonoide.

Lo anterior se comprueba en su espectro de RMN- ^1H (espectro 2), donde a campo bajo se detecta una señal simple en δ 13.01 que corresponde a un grupo hidroxilo quelatado con un grupo carbonilo (C₅-OH). Por otro lado en 9.68 ppm se observan una señal simple que integran para dos hidrógenos correspondientes a dos hidroxilos. Además, a campo alto se detecta una señal simple que integra para tres hidrógenos con δ 3.92, asignada a un metoxilo. Esto indica que la molécula tiene tres hidroxilos y un metoxilo.

El metoxilo fue asignado a C-6, mientras que la señal con δ 6.54 (s, 1H) corresponde a H-8. Estas asignaciones fueron corroboradas con el espectro de RMN- ^{13}C (espectro 3), donde la señal con δ 93.73 es característica de un C-8 no sustituido y la señal cuaternaria con δ 130.95 pertenece a C-6 cuando se encuentra sustituido por un grupo -OMe. Esto genera la fórmula parcial A

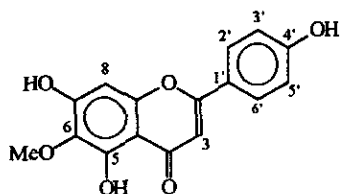


Fórmula parcial A

Por otro lado en 6.50 ppm se observa una señal simple que integra para un hidrógeno y que pertenece a un hidrógeno vinílico, lo que sugiere que el anillo C presenta un doble enlace, lo cual indica que el esqueleto base es el de una flavona.

El anillo B muestra un sistema AA'BB' (anillo aromático disustituido en las posiciones 1', 4'), de ahí que las señales en δ 7.75 ($J= 6.75$ y 1.95 Hz) corresponden a los hidrógenos H-2' y H-6', mientras que en δ 6.96 ($J= 7.05$ y 1.95 Hz) aparecen las señales de los H-3' y H-5'. Estos datos se complementan con los datos de RMN- ^{13}C (pp 58) y con la técnica de APT (espectro 3a, pp 157).

Con base en lo anterior y al comparar las propiedades espectroscópicas obtenidas con los ya informados en la literatura,¹⁵⁴⁻¹⁶¹ permitieron concluir que la sustancia analizada corresponde a la hispidulina. Cabe mencionar que la hispidulina fue purificada y caracterizada por primera vez de las hojas del extracto de *Ambrosia hispida*¹⁶² y más tarde fue detectada en otras especies.¹⁶³



(111)

β -D-glucósido del β -sitosterol (176, extracto metanólico de hojas-tallo).

A partir de la fracción 121-210 [Hex-AcOEt (6:4- 2:8)] se purificó un sólido amorfo de color blanco. En su espectro de IR (espectro 4) a 3381 cm^{-1} se visualiza una banda muy intensa que corresponde a la ν (O-H) y debido a su solubilidad en disolventes polares, se pudo deducir que se trataba de una sustancia muy hidroxilada, lo cual ocasiona que sea poco manejable para el análisis espectroscópico, por lo que se procedió a realizar el derivado acetilado.

Del producto de reacción de acetilación, se obtuvo un sólido cristalino, con pf. 166-168.5°C, soluble en CHCl_3 . Su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ion molecular en m/z 396 [M^+ -348, 100%]. El espectro de IR (espectro 5) muestra una banda en 1754 cm^{-1} , correspondiente a la ν (C=O) de los grupos acetatos adicionados a la molécula original, el cual fue corroborado con el espectro de RMN- ^{13}C (espectro 7), donde se observan cuatro señales entre 169-170.66 ppm de grupos carbonilos. Estos datos permitieron proponer como hipótesis estructural a un triterpeno derivado del β -sitosterol, al que le corresponde una fórmula molecular $\text{C}_{43}\text{H}_{29}\text{O}_{10}$.

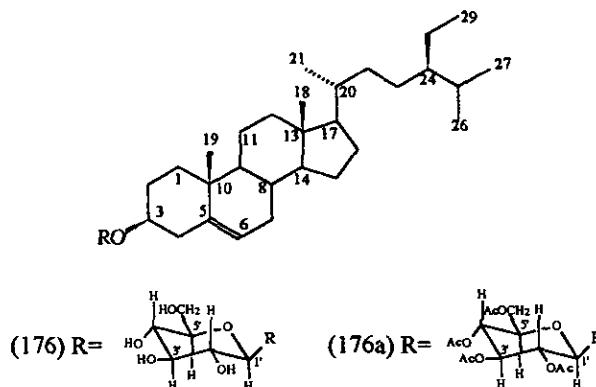
El espectro de RMN- ^1H (espectro 6) del producto de acetilación, presenta múltiples señales a campo alto asignados de la siguiente manera: δ 0.68 (s, 3H, CH_3 -18), δ 0.84 (d, J= 6.3 Hz, 6H, CH_3 -26 y CH_3 -27), δ 0.99 (s, 3H, CH_3 -19), δ 0.93 (d, J= 7 Hz, 3H, CH_3 -21). A campo más bajo se observa una señal doble, con un δ 5.35 (J= 5.4 Hz), la cual integra para 1H y es asignado a un hidrógeno vinílico del C-6. Por otro lado en el espectro de RMN- ^{13}C , al emplear la técnica de APT (espectro 7a) se observan 6 señales cerca de 20 ppm correspondientes a los metilos del triterpeno.

Los desplazamientos químicos, asignados a los hidrógenos de la parte glucosídica son los siguientes: δ 4.58 (d, J= 8.1 Hz, 1H, CH-1'), δ 4.95 correspondiente al CH-2' (dd, J= 9.3 y 8.1Hz, 1H), δ 5.20 (t, J= 9.45, 1H, CH-3'), δ 5.07 (t, J= 9.6 Hz, 1H, CH-4'), mientras que para CH-5' se asignó el δ 3.68 (dddd, J= 10.5 Hz, 1H), y para $\text{H}_\alpha\text{C-6'}$ y $\text{H}_\beta\text{C-6'}$

los δ 4.26 y δ 4.11, los cuales se visualizan como *dd*. Entre 2.00 y 2.08 ppm (4s, 12H) se localizan cuatro señales correspondientes a los cuatro metilos de los acetatos adicionados a la molécula original.

Por otro lado, en el espectro de RMN- ^{13}C a δ 122.15 y δ 140.36 se visualizan dos señales, que fueron asignadas a los carbonos vinílicos de la posición 6 y 5 respectivamente, a δ 99.65 se observa una señal asignada al C-1', las señales de los carbonos restantes de la parte glucosídica se encuentran entre 80.08-62.13 ppm.

Con base en la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas, con los informados en la literatura, se pudo concluir que la sustancia analizada es el *per*-acetil glucósido del β -sitosterol, por lo que la sustancia original es el glucósido del β -sitosterol.^{164, 165}



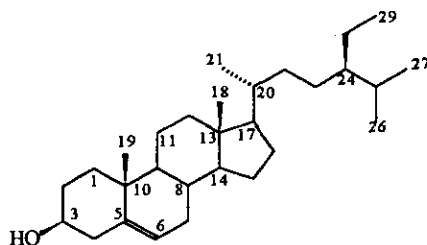
β -sitosterol (177, extracto clorofórmico de hojas-tallos).

De las fracciones 101-113 [Hex-AcOEt (97:3)], se aisló un sólido blanco con pf. 127-129°C. El espectro de masas por impacto electrónico, muestra un ion molecular de m/z 414, además se visualizan los fragmentos de m/z 329 y 303 característico de los esteroides que presentan una insaturación entre los carbonos 5 y 6. El espectro de IR (espectro 8),

muestra la presencia de un grupo hidroxilo, debido a las bandas de absorción en 3625 cm^{-1} ν (O-H), 1379 cm^{-1} ν (C-O) y 1044 cm^{-1} ν (O-H). En su espectro de RMN- ^1H (espectro 9), a campo alto se visualizan múltiples señales, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera: en δ 1.01 se observa una señal simple correspondiente al CH_3 -19, una señal doble a δ 0.92 perteneciente a CH_3 -21 ($J= 7\text{Hz}$, 3H), la señal en δ 0.83 (t , $J= 4.1\text{Hz}$, 3H) fue asignada al CH_3 -29, mientras que para los CH_3 -26 y CH_3 -27 les pertenece la señal en δ 0.84 (d , $J= 4.26\text{ Hz}$, 6H), y la señal simple a δ 0.68 que integra para tres hidrógenos fue asignada al CH_3 -18.

En δ 1.47 se observa una señal amplia, que integra para un hidrógeno que corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo. El δ 3.5 ($dddd$, $J= 11$ y 6 Hz , 1H) fue asignado al hidrógeno del C-3, base del grupo hidroxilo y la señal en δ 5.35 (d , $J= 7.23\text{ Hz}$, 1H) corresponde al hidrógeno vinílico del C-6.

Los datos anteriores permitieron deducir la fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ ($\Omega= 5$), al comparar sus constantes espectroscópicas y propiedades físicas con las informadas en la literatura para los fitosteroles se confirmó que la sustancia aislada es el β -sitosterol, sustancia ampliamente distribuida en la naturaleza.^{164 y 166}



(177)

Ácido oleanólico (144) y ácido ursólico (154).

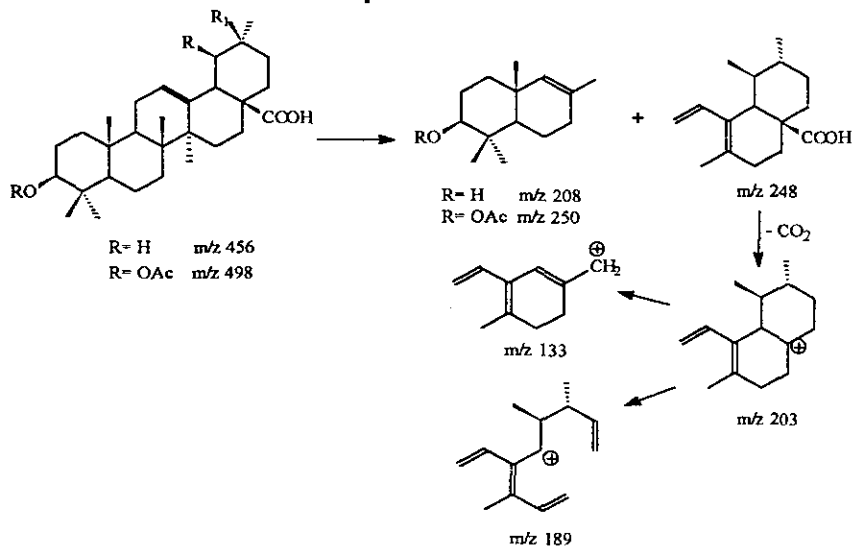
De las fracciones 204-293 colectadas al eluir la columna con una polaridad de Hex-AcOEt (9:1-7:3), se aisló un sólido de color crema. En el espectro de IR (espectro 10),

se observa una banda de absorción en 3369 cm^{-1} y otras en 1733 y 1638 cm^{-1} , correspondientes a ácidos carboxílicos. Así mismo, se observa la presencia de una banda en 2928 cm^{-1} perteneciente a la vibración ($\text{Csp}^2\text{-H}$), además de las bandas en 2857 cm^{-1} y 1462 cm^{-1} de la vibración (C-H) y (C-C) respectivamente con una hibridación sp^3 .

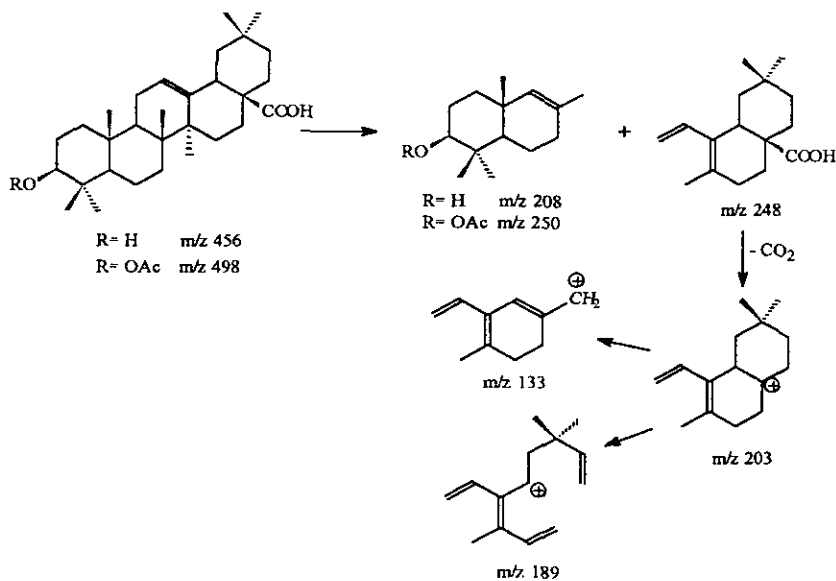
En el espectro de masas, se observa un ion molecular de m/z 456 al que se le puede asociar una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{98}\text{O}_3$ con seis grados de insaturación, la presencia de un pico base de m/z 248, permite suponer que se trata de un triterpeno pentacíclico con un grupo carboxilo en el anillo D o E y un doble enlace en C-12, correspondientes al esqueleto de la serie oleano y ursano,^{167 y 168} en el esquema 6 se indica el patrón de fragmentación característico para este tipo de sustancias. En este esquema se observa que la fragmentación principal para el ion molecular m/z 456 sigue un mecanismo via Retro Diels-Alder para producir el fragmento m/z 208 y m/z 248, el cual corresponde al pico base del espectro, mientras la pérdida del grupo COOH produce un pico de m/z 203, además la pérdida de 70 uma (C_5H_{10}) produce el fragmento m/z 133 y la pérdida de 14 uma (CH_2) genera un fragmento m/z 189.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Por otra parte en el espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (espectro 11) de esta mezcla, se observa un triplete a δ 5.27 (t , $J= 11.55$ y 3.75 Hz) que integra para un hidrógeno vinílico, asignado al H-12. La señal doble de doble (dd) centrada en δ 3.20 ($J=10.2$ y 5.4 Hz), se atribuye al hidrógeno geminal al grupo hidroxilo en C-3 que por su multiplicidad debe estar vecino a dos protones, el valor de la constante confirma la orientación β de este grupo funcional. La señal dd que integra para un protón situado en δ 2.84 ($J= 13.8$ y 4.3 Hz) corresponde al hidrógeno del C-18 y la multiplicidad de esta señal permite proponer que la sustancia en discusión tiene una estructura base de la serie oleano. En δ 2.20 aparece un doblete (d , $J= 11.23$ Hz, 1H) que corresponde al H-18 de la estructura base del grupo del ursano.¹⁷² Además, a campo alto se visualizan múltiples señales entre 2-1 ppm, lo que hace suponer que se trata de la mezcla de los compuestos oleano y ursano.

Esqueleto base del oleano.



Esqueleto base del ursano.



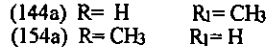
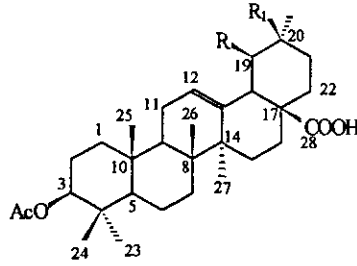
Esquema 6. Modelo de fragmentación del esqueleto base de la serie oleano y ursano.

Ácido 3β-acetil oleanólico (144a) y ácido 3β-acetil ursólico (154a).

En el espectro de IR del derivado acetilado (espectro 12) se observan dos bandas en 1756 cm^{-1} y 1691 cm^{-1} , correspondientes a un carbonilo de un ester, el cual se confirma con la banda de absorción en 1250 cm^{-1} , para una $\nu(\text{C-O})$ de un ester. En su espectro de masas por impacto electrónico se observa un ion molecular m/z 498 y un pico base en m/z 248, característico de los triterpenos con Δ^{12} -insaturación, obtenido por medio de un Retro Diels-Alder del anillo C.¹⁶⁷ También se observa un pico en m/z 438 debido a la pérdida de una molécula de ácido acético, ver esquema 6. Con estos datos nuevamente se confirma que las sustancias presentan el esqueleto de la serie oleano y ursano.

En el espectro de RMN-¹H (espectro 13), a campo bajo se observa una señal δ 5.24 (t, J= 3.9, 1H) asignada al protón vinílico H-12, en δ 4.5 (J= 8.1, 1H) se visualiza un triplete correspondiente a H-3, mientras que la señal doble en δ 2.19 (J= 10.2, 1H) corresponde a H-18, señal característica del grupo ursano.¹⁷² A los hidrógenos del grupo $\text{CH}_3\text{COO}-$, se le asignó la señal en 2.05 ppm, la cual integra para los tres hidrógenos. Para los grupos metilos les corresponde las siguientes señales: δ 1.2 (s, 3H) corresponde al metilo del C-27, el singulete que integra para tres hidrógenos en δ 1.08 corresponde al C-25, mientras que las señales simples de δ 0.98, δ 0.94, δ 0.92, δ 0.85 y δ 0.79. correspondientes a los metilos unidos a C-24, C-23, C-29, C-30 y C-26, respectivamente.

Los datos anteriores permitieron deducir la fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{O}_4\text{H}_{50}$, y al comparar sus constantes espectroscópicas con las informadas en la literatura, confirmaron que la sustancia es el ácido 3β-acetil ursólico, por lo que la otra sustancia corresponde al ácido 3β-acetil oleanólico

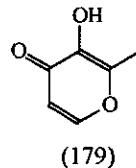
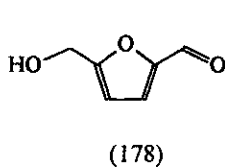


5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (178) y 3-hidroxi-2-metil-4H-pyran-4-ona (179).

Del producto de hidrólisis de las partes aéreas de la planta que fue sometida a un análisis de cromatografía de gases acoplado a masas (IE) se detectaron dos sustancias identificadas como: 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (178) y 3-hidroxi-2-metil-4H-pyran-4-ona (179), los datos espectrométricos se localizan en la pp 58. La primera sustancia presenta un tiempo de retención de 13.61 min, en el espectro de masas se observa un ion molecular en m/z 126, con un pico base en m/z 97, al que le corresponde una fórmula molecular $C_6O_3H_6$ con cuatro grados de insaturación.

Mientras que la 3-hidroxi-2-metil-4H-pyran-4-ona (179) tuvo un tiempo de retención de 15.78 min, en su espectro de masas presenta un ion molecular en m/z de 126 y un pico base m/z de 71, con una fórmula molecular $C_6O_3H_6$ y cuatro grados de insaturación.

De estas dos sustancias no fue posible obtener otros datos espectroscópicos que contribuyeran a comprobar su estructura, tampoco se pudo obtener de la literatura los datos espectrométricos, de estas dos sustancias, para poder hacer una comparación entre los resultados obtenidos experimentalmente y los de la literatura.



Pruebas cualitativas para la detección de alcaloides.

Del estudio preliminar realizado para la detección de alcaloides (tabla XVIII, pp 64) se encontró la ausencia de alcaloides en la planta, dado que únicamente dieron positiva una o dos pruebas, por lo que se considera que estos resultados no son muy contundentes para afirmar la presencia de estas sustancias. Cabe mencionar que los reactivos empleados tienen una alta sensibilidad, ya que detectan del 0.1-0.001 % de solución del alcaloide,¹⁵⁰ además en el método no interfieren la presencia de pigmentos y resinas de la planta, que pudieran disminuir la sensibilidad de la reacción, como en el caso de otros métodos (Método de Lander, Clarkee-Williams).

Por otra parte, se consideraron como control positivo a los extractos colorín macho y colorín hembra los cuales tienen un alto contenido de alcaloides, de acuerdo a lo informado en la literatura y que dieron positiva 5 pruebas cualitativas, como se indica en la tabla XIX.

4.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

A. BIOENSAYOS FRENTE A *Artemia salina*.

Como se puede observar en la tabla XV (pp 63), de todos los extractos evaluados, el extracto clorofórmico de flores, resultó ser el más tóxico para *A. salina* con una LC_{50} = 39.65 ppm. Al evaluar la toxicidad de los extractos de hojas-flores y hojas-tallos, los únicos que tuvieron actividad fueron los extractos clorofórmicos (LC_{50} =310.02 y 249.59 ppm respectivamente). Mientras que de los extractos de las hojas todos fueron tóxicos para *A. salina*, siendo el extracto hexánico el más activo (LC_{50} = 238.60 ppm), pero en mucho menor grado que el clorofórmico de flores. En lo que respecta a la hidrólisis realizada de flores y de hojas-tallo-flores, el más letal fue el primero con una LC_{50} = 72.25 ppm.

De estos resultados se visualiza que el extracto clorofórmico de flores es el que presenta una mayor concentración de sustancias activas o bien contiene las sustancias que poseen la toxicidad. Sin embargo, cuando se juntan las flores con las hojas y al realizar los extractos y al ser evaluados con *Artemia salina*, su extracto clorofórmico presentó una $LC_{50} = 310.02$ ppm, visualizándose así una disminución notoria de la toxicidad de las flores, pero aumentando la de hojas (en el caso de los extractos clorofórmicos), con lo que se reafirma que las flores, son las que poseen las sustancias activas o bien la tiene en una mayor concentración. Esto se apoya en el análisis químico realizado en el que se encontró una gran cantidad de ácido ursólico y oleanólico en el extracto clorofórmico de flores, así como de otras sustancias que se encuentran en menor cantidad y que no fueron posibles de purificar dado su cantidad.

Algo similar sucede con el extracto hexánico de hojas y flores, ya que al estar separadas resultan ser letales para el crustáceo (flores, $LC_{50} = 496.64$ y hojas, $LC_{50} = 238.60$ ppm), mientras que cuando se evalúa el extracto hexánico de hojas-flores resulta no tener toxicidad, por lo que se considera que posiblemente exista un antagonismo entre las sustancias de ambos extractos.

Mientras que los extractos metanólicos de flores, hojas-tallos y hojas-flores, ninguno fue letal, ya que su LC_{50} fue mayor de 1000 ppm, considerándose que no poseen sustancias tóxicas o bien las tiene pero en muy baja concentración, como lo son las saponinas, dado que en la literatura se informa que éstos metabolitos secundarios¹⁷³ presentan toxicidad frente a *Artemia salina*, lo anterior se apoya en la CCF de los extractos metanólicos de *Aloysia triphylla* del presente estudio, que dieron prueba positiva para saponinas con el revelador químico $SbCl_3$ y vainillina-ácido fosfórico.

Al realizar las evaluaciones de citotoxicidad del fraccionamiento del extracto clorofórmico de hojas-tallo frente a *Artemia salina* (tabla XVIII, pp 66), se encontró que casi todas las fracciones obtenidas con una baja y mediana polaridad resultaron ser letales para este crustáceo, mientras que la mayor parte de las fracciones colectadas con una mayor polaridad fueron inactivas. De las fracciones que fueron letales, se observó que las

fracciones con una mayor toxicidad fueron las fracciones 204-217 que presentaron una $LC_{50} = 0.0121$ ppm, de acuerdo al análisis químico de estas fracciones, se purificó y caracterizó únicamente a la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico, al comparar este valor con el reportado en la literatura, se observa que al encontrarse como mezcla, es mucho más activo que cuando están separados, siendo que en la literatura¹⁷⁴ se da un valor de la $LC_{50} = 7.2$ ppm para el ácido ursólico. Así mismo, se ha informado en la literatura que cuando el ácido oleanólico se encuentra como saponina presenta toxicidad cuando el grupo $-COOH$ del ácido glucoronido se encuentra libre¹⁷³.

Las fracciones 1-3 ($LC_{50} = 50.28$ ppm) también tuvieron toxicidad notoria en comparación con las fracciones restantes, sin embargo, no fue posible purificar y caracterizar la mezcla de sustancias presentes en estas fracciones, dado la poca cantidad que se obtuvo de estas fracciones, pero que por su polaridad y aroma sean posiblemente monoterpenos o sesquiterpenos de baja polaridad, los cuales presentan diversas actividades biológicas.

B. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.

a. Método de Mitscher.

Como se puede apreciar en la tabla XVI, pp 63, los aceites esenciales de hojastallo tuvieron actividad inhibitoria contra *Mycobacterium smegmatis*; así mismo, la mayor parte de los extractos (de baja y mediana polaridad a excepción del extracto hexánico de flores), presentaron una ligera actividad frente a dicho microorganismo a una concentración de 1mg/ml, de acuerdo a las especificaciones del método de Mitscher. Sin embargo, el hecho de que la mayoría de los extractos resultaron no tener actividad antimicrobiana, estas muestras pudieran tener actividad, pero debido a la baja concentración en que se encuentran las sustancias, no se logre ver el efecto que tiene los extractos hacia los microorganismos, o bien al estar la mezcla de las sustancias impuras

impidan que se visualice la inhibición de las mismas que al estar ya puras, ya que se ha reportado en la literatura que los triterpenos (β -sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico),^{115, 175} saponinas^{176, 177} y flavonoides¹⁷⁸ poseen actividad antimicrobiana, de acuerdo al análisis químico realizado a *Aloysia triphylla*, éstas son las sustancias presentes en los extractos. Por ejemplo, al evaluar la actividad antimicrobiana de la mezcla de ácidos, estos presentaron una ligera inhibición frente a *Candida albicans* y *M. smegmatis*, mientras que en la literatura se informa que el ácido ursólico tiene actividad contra *S. aureus* y *Microsporium lenosum*,¹⁷⁹ por otra parte, el ácido oleanólico tipo saponina exhibe un amplio espectro de actividad antifúngica, especialmente contra cepas de *Candida glabrata*, el ácido oleanólico y ursólico inhiben *S. mutans*.¹¹⁵

Algo similar sucede con los aceites esenciales, ya que en la literatura se ha informado, de una actividad bactericida frente *E. coli*, *M. tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Tetranychus telarius* y *Aphis gossypii*; sin embargo, en este trabajo no mostraron un amplio espectro, dado a que únicamente presentaron actividad antimicrobiana frente a *M. smegmatis*. De acuerdo, a lo reportado en la literatura existen varios factores que pueden modificar los resultados, como son: la técnica utilizada, el microorganismo, el medio de cultivo^{95, 98}, los aceites esenciales¹⁸⁰ (origen botánico, el tiempo de cosecha, si el material esta seco o fresco y la técnica de aislamiento de los aceites esenciales), por lo que resulta difícil hacer una comparación de los resultados obtenidos en el presente trabajo con los ya informados en la literatura.

b. Método de difusión en disco.

Como se puede visualizar en la tabla XVIa, ninguna muestra tuvo actividad antimicrobiana, con las cepas ensayadas; como se observa estos resultados difieren de los del método anterior; debido posiblemente, a que las sustancias y/o extractos poseen poco o nulo poder de difusión, lo cual es imprescindible para observar los halos de inhibición. Además, de acuerdo a la literatura^{95, 98} este método no es aceptable cuando la muestra no es soluble en agua, como en el caso de los aceites esenciales o extractos no polares.

Al comparar ambos métodos, se observa que el método más sensible es el de difusión en agar (Mitscher), dado que las muestras están en contacto directo con el microorganismo.

C. PRUEBAS ANTIINFLAMATORIAS.

En la tabla XVII, pp 65, se visualiza que los extractos con un menor porcentaje de inhibición del edema, son los clorofórmicos de flores, hojas-tallo y hojas-flores (12.25, 17.14, 13.90 % de inhibición respectivamente), esperándose que estos extractos tuvieran un alto porcentaje de inhibición por su alto contenido de ácido ursólico y el ácido oleanólico, ya que en la literatura se informa que el ácido oleanólico y ursólico poseen un alto porcentaje de efecto antiinflamatorio pero al ser evaluados de manera individual,¹¹⁵⁻¹¹⁷ y en los extractos se encuentra como mezcla, por lo que se considera que al encontrarse otros metabolitos secundarios en los extractos pudieran interferir con los resultados obtenidos, así como también los pigmentos o resinas del extracto.

Mientras que los extractos con un mayor % de inhibición del edema, fueron los extractos hexánicos de flores, hojas-flor y hojas (26.32 %, 34.67 %, 16.90 % respectivamente). Sin embargo, estos resultados no fueron muy notorios.

*IV. ESTUDIO QUÍMICO Y
BIOLÓGICO DE *Cirsium jorullense*.*

5. ANTECEDENTES.

5. ANTECEDENTES.

5.1. GENERALIDADES SOBRE LA FAMILIA ASTERACEAE.

El orden Asterales (ver digrama I, pp 8) consiste de una simple familia llamada Asteraceae (Compositae), de distribución cosmopolita comprendida por 1535 géneros y 23 000 especies, considerándose como una de las más grandes familias de las dicotiledóneas (Clase Magnoliopsida). La clasificación subfamiliar se da a conocer en la tabla XX.¹⁸¹

La familia Asteraceae es de gran importancia desde el punto de vista alimenticio, farmacéutico e industrial; así mismo, muchas especies constituyen la base de la floricultura. Son hierbas anuales o perennes, algunas especies son arbustos, raras veces son árboles pequeños. Hojas principalmente alternas, pero a menudo también opuestas o verticiladas, simples o compuestas, extraordinariamente variadas en forma, tamaño y disposición, incluso superpuestas. Inflorescencia: flores en densas cabezuelas, en secuencia racemosa, cimosas, el receptáculo es convexo, cónico o algunas veces cilíndrico. Flores simpetalos perfectas o algunas veces cabezas radiadas, discoides, disciformes o ligulada acorde al tipo y arreglo de las flores, actinomorfa o cigomorfa, bilabiadas y pseudobilabiadas, unisexual o estéril; cáliz ausente o transformado en vilano de escamitas o cerdas rígidas o flexibles, escasas o numerosas; los estambres tienen anteras connadas. Los estilos varían con respecto al grado de bifurcación, área estigmática, entre otros aspectos. Corola simpetala, tubulosa; ovario ínfero, bicarpelar unilocular, óvulo solitario, anteras connadas; la capitula son usualmente solitarias o arregladas en corimbosa y algunas veces paniculadas sin inflorescencia, son descritas como radial, disciforme o discoide, homogamo, heterógamo. Las brácteas pueden ser arregladas en varias paleas, pocas y simples paleas; fruto en aquenio.^{7, 181, 182}

Como se puede observar en la tabla XX, la subfamilia Cichorioideae comprende 6 tribus. Es parafilética, sin embargo, tendría que ser reclasificada dentro de una pequeña

subfamilia monofilética. Cabe mencionar, que las interrelaciones de las tribus no están completamente resueltas, así la reclasificación es aún prematura. Una de las tribus que se localiza dentro de esta subfamilia es la Cardueae, en la cual existen grandes géneros (*Centaurea*, *Cirsium*, *Cousinia*, *Jurinea* y *Saussurea*) con cientos de especies.

FAMILIA	SUBFAMILIA	TRIBUS	SUBTRIBU	GÉNERO	ESPECIE
ASTERACEAE	Barnadesioideae	Barnadesieae	---	9	92
	Cichorioideae	Mutisieae	2	76	970
		Cardueae	4	83	2,500
		Lactuceae	11	98	1,550
		Vernonieae	6	98	1,300
		Liabeae	---	14	160
		Arctoteae	2	16	200
	Asteroideae	Inuleae	---	38	480
		Plucheeae	---	28	220
		Gnaphalieae	5	181	2,000
		Calenduleae	---	8	110
		Astereae	3	174	2,800
		Anthemideae	12	109	1,740
		Senecioneae	3	120	3,200
		Helenieae	8	110	830
		Heliantheae	10	189	2,500
	Eupatorieae	16	170	2,400	

Tabla XX. Clasificación de la Asteraceae, con número de subtribu, género y especie.

Cardueae es una tribu monofilética bien circunscrita, aunque existen pocos géneros de posición incierta, es un grupo con 83 géneros y 2 500 especies. Es dividida en 4 subtribus, representadas por tres grupos monofiléticos bien soportados: Echinopsidinae, Carlininae y Carduinae + Centaureinae. Este último par de subtribus es un caso clásico de un grupo parafilético (Carduinae) con su contraparte monofilética (Centaureinae). Existen géneros grandes, cada uno con varios cientos de especies, llamadas *Centaurea*, *Cirsium*, *Cousinia*, *Jurinea* y *Saussurea*, en el diagrama II se indica la posición de cada uno de estos géneros dentro de las subtribus de la Cardueae. La distribución es predominantemente del Viejo Mundo en el Norte de África, pocos géneros extienden su distribución a América del Norte, África tropical y dentro del Hemisferio Sur en Australia y en América del Sur.¹⁸¹

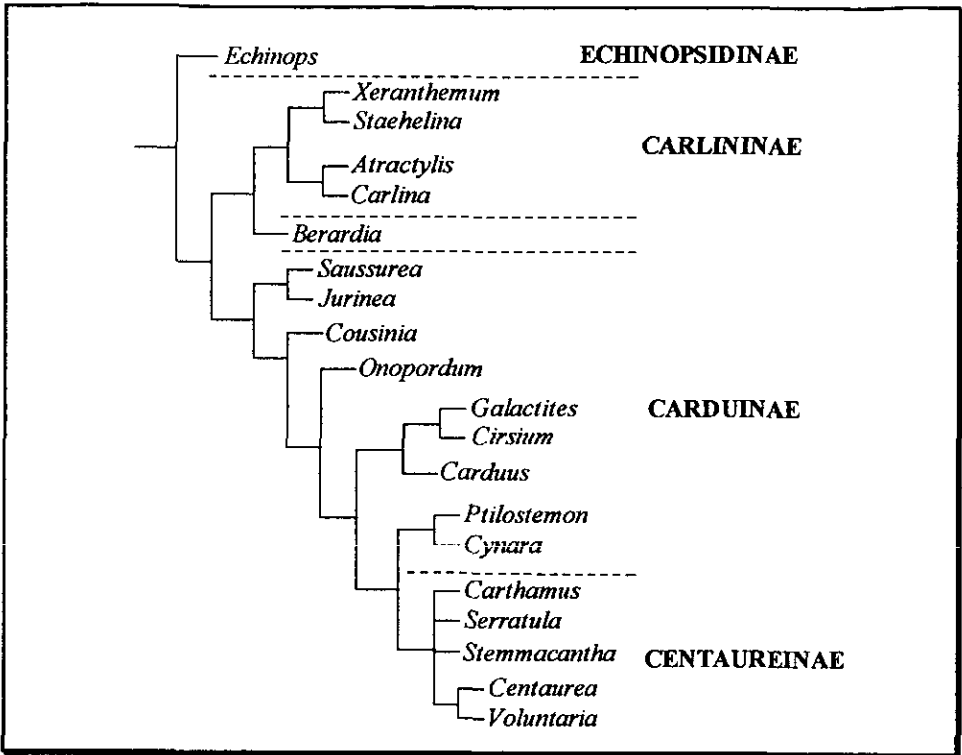


Diagrama II. Árbol obtenido de un estricto consenso de 5 cladogramas de la Cardueae.

5.1.1. GENERALIDADES SOBRE EL GÉNERO *Cirsium*.

Como se observa en el diagrama II, uno de los géneros pertenecientes a la subtribu Carduinae es el *Cirsium* con 250-300 especies.¹⁸³

El género *Cirsium* presenta cabezuelas homógamas, discoideas, solitarias o agrupadas en corto número, cabizbajas. Flores rojas, púrpúreas, rosas, blancas o amarillentas, tubulosas, hermafroditas o dioicas, estambres de filamentos frecuentemente pilosos, anteras más o menos sagitadas en la base; estilo con las ramas lineares, pegadas o

apenas libres en el ápice, con una coronita de pelos por debajo de la bifurcación, capítula solitaria, corimbosa o agrupadas; brácteas involucrales; corola cigomórfica con un lóbulo separado por una profunda división. Aquenios oblongos, glabros, con el vilano formado de numerosos pelos plumosos. Hierbas anuales o perennes, con las hojas decurrentes y espinosas.¹⁸¹

A partir del género *Cirsium* se han aislado diversos metabolitos secundarios como son: flavonoides, poliacetilenos, poliolefinas, sesquiterpenos, triterpenos pentacíclicos y alcaloides, los cuales se aprecian en la tabla XXI.

Tabla XXI. Constituyentes químicos del género *Cirsium*.

POLIACETILENOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. acaule</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	
<i>C. arcense</i> (<i>C. incanum</i>)	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	
<i>C. candolleamum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	
<i>C. canum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	
<i>C. carniolicum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
		Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	
<i>C. decussatum</i> (<i>C. polonicum</i>)	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraíno (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaíno (181)	

<i>C. eriophorum</i> (<i>C. vandasii</i>)	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	
<i>C. crisithales</i>	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	
<i>C. ferox</i>	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	
<i>C. heterophyllum</i> (<i>C. helenoides</i>)	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	Raïces	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	183
		Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triïno (182)	184
		Trideca-1,3-dien-5,7,9,11-tetraïno (183)	
		Trideca-1,3,5-trien-7,9,11-triïno (184)	
<i>C. hypoleucum</i>	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	
<i>C. japonicum</i>	Raïces	Cis-8,9-epoxiheptadeca-1-en-11,13-diïno-10-ol (185)	183, 185, 186, 187
		Heptadeca-1-en-11,13-diïno-8,9,10-triïno (186)	186, 187
		Cirineol A (187)	186
		Cirineol B (188)	
		Cirineol C (189)	
		Cirineol D (190)	187
Cirineol E (191)			
<i>C. lanceolatum</i>	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	
	---	Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-triïno (182)	
<i>C. montanum</i> (<i>C. tricephalodes</i>)	---	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraïno (180)	183
	---	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaïno (181)	

<i>C. montanum (C. tricephalodes)</i>	----	Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-trinol (182)	183
<i>C. occidentalis</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
<i>C. oleraceum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
	----	Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-trinol (182)	
<i>C. palustre</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
	----	Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-trinol (182)	
<i>C. pannonicum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
<i>C. spinosissimum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
<i>C. syriacum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
<i>C. tuberosum</i>	----	Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraino (180)	183
	----	Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)	
	----	Tetradeca-4,6-dien-8,10,12-trinol (182)	
POLIOLEFINAS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. arvense</i>	Raíces	Aplotaxeno (192)	188
	Raíces	8,9-epoxiheptadeca-1,11,14-trieno (193)	

<i>C. arvense</i>	Raíces	8,9-dihidroheptadeca-1,11,14-trieno (194)	188
	----	Heptadeca-1,8,11-trieno (195)	
	----	Heptadeca-1,8-dieno (196)	
	----	1-Heptadeceno (hexahidroaplotaxeno, 197)	
<i>C. canum</i>	----	Aplotaxeno (192)	183
<i>C. dipsacolepis</i>	Raíces	Aplotaxeno (192)	189
		Heptadeca-1,8,11-trieno (195)	
		Heptadeca-1,8-dieno (196)	
		1-Heptadeceno (hexahidroaplotaxeno, 197)	
		(2E, 4E) 2,4,10-undecatrienal (198)	
		(2E, 4E) 2,4,11-dodecatrienal (199)	
		(2E, 4Z) 2,4,11-dodecatrienal (200)	
		(2Z, 4E) 2,4,11-dodecatrienal (201)	
		(2Z, 4Z) 2,4,11-dodecatrienal (202)	
		(2E) 2,8-nonadienal (203)	
		(2E) 2,9-decadienal (204)	
		(2E) 2,10-undecadienal (205)	
		Dihidroaplotaxeno (206)	
		Tetrahidroaplotaxeno (207)	
		1-Dodéceno (208)	
		1-Tetradeceno (209)	
1-Pentadeceno (210)			
1-Hexadeceno (211)			
1-Octadeceno (212)			
<i>C. helenoides</i>	Raíces	Aplotaxeno (192)	184
		8,9-epoxiheptadeca-1,11,14-trieno (193)	
		8,9-hidroxiheptadeca-1,11,14-trieno (194)	
		Dihidroaplotaxeno (206)	
		Tetrahidroaplotaxeno (207)	
<i>C. helenoides</i>	Raíces	8,9-diacetoxi heptadeca-1,11,14-trieno (213)	184
		8-acetoxi-9-hidroxiheptadeca-1,11,14-trieno (214)	
<i>C. hypoleucum</i>	Raíces y partes aéreas	9-acetoxi-8-hidroxih eptadeca-1,11,14-trieno (215)	183, 190
		Aplotaxeno (192)	
<i>C. japonicum</i>	Raíces	Epóxido de aplotaxeno (216)	184, 190
		Aplotaxeno (192)	183, 191, 192

<i>C. japonicum</i>	Raíces	Heptadeca-1,8,11-trieno (195)	188
		Heptadeca-1,8-dieno (196)	188
		1-Heptadeceno (Hexahidroaplotaxeno, 197)	183, 191, 192
		Dihidroaplotaxeno (206)	
		Tetrahidroaplotaxeno (207)	183, 191
1-Pentadeceno (210)			
<i>C. nipponicum</i>	Raíces	Shikokiol A (217)	193
		Shikokiol B (218)	
		Shikokiol C (219)	

HIDROCARBUROS SATURADOS

Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. dipsacolepis</i>	Raíces	n-Dodecano (220)	189
		2-metildodecano (221)	
		n-tridecano (222)	
		3-metiltridecano (223)	
		n-tetradecano (224)	
		2-metiltetradecano (225)	
		n-pentadecano (226)	
		3-metilpentadecano (227)	
		n-hexadecano (228)	
		2-metilhexadecano (229)	
		n-heptadecano (230)	
		n-octadecano (231)	
		n-nonadecano (232)	
n-eicosano (233)			

SESQUITERPENOS

Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. hypoleacum</i>	Raíces	Furanosesquiterpeno (234)	190
<i>C. japonicum</i>	Raíces	Cariofileno (20)	192
		α -himachaleno (33)	
<i>C. dipsacolepis</i>	Raíces	Thujopseno (235)	194
		Ciperenal (236)	
		Acetato de ciperenilo (237)	

TRITERPENOS

Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. arvense</i>	----	β -amirina (142)	195

<i>C. arvense</i>	---	Taraxasterol (238)	195, 196
		Acetato de taraxasterilo (239)	195, 196
		Stigmasterol (240)	196
		Acetato de stigmasterilo (241)	196
<i>C. arvense</i> var <i>setosum</i>	Raíces, hojas y flores	β -sitosterol (177)	197
<i>C. canum</i>	Raíces y partes aéreas	Taraxasterol (238)	190
		Acetato de taraxasterilo (239)	
		Lupeol (163)	
		Acetato de lupeilo (242)	
<i>C. carolinianum</i>	Raíces y partes aéreas	Acetato de lupeilo (242)	190
		Acetato de taraxasterilo (239)	
		Acetato de β -amirina (243)	
<i>C. echinus</i>	Partes aéreas	β -sitosterol (177)	198
<i>C. hypoleucum</i>	Partes aéreas	Lupeol (163)	190
		Acetato de lupeilo (242)	
		β -amirina (142)	
		Acetato de β -amirina (243)	
		Acetato de taraxasterilo (239)	
<i>C. segetum</i>	Partes aéreas	Taraxasterol (238)	199
		Acetato de taraxasterilo (239)	
		β -sitosterol (177)	
		Stigmasterol (240)	
<i>C. syriacum</i>	Partes aéreas	β -sitosterol (177)	200
		β -D-glucósido del β -sitosterol (176)	
<i>C. olearaceum</i>	---	Taraxasterol (238)	201
		β -sitosterol (177)	
		Stigmasterol (240)	
<i>C. texanum</i>	Raíces y partes aéreas	taraxasterol (238)	202
		Acetato de taraxasterilo (239)	

LACTONAS

Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. carolinianum</i> (Walt)	Partes aéreas	Dehidrocostus lactona (244)	190
		Dihidrodehidrocostus lactona (245)	

ALCALOIDES

Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. wallichii</i>	Raíces	O-acetiljacolina (246)	203

FLAVONOIDES

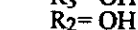
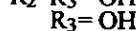
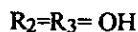
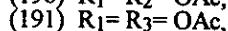
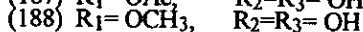
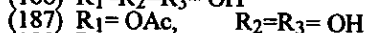
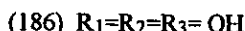
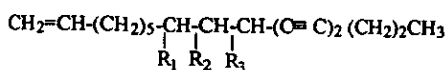
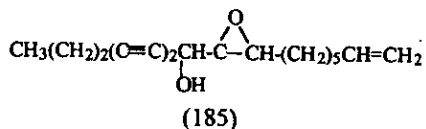
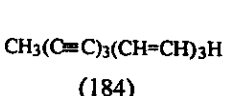
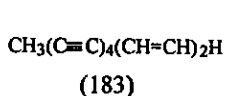
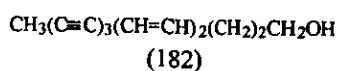
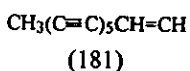
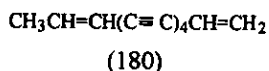
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.		
<i>C. arvense</i>	----	Apigenina (138)	204		
		Luteolina (132)			
		7-ramnoglucósido de apigenina (247)			
				7 β -glucósido de apigenina (248)	204, 205
				7 β -D-glucósido de acetina (249)	205
				5-O-glucósido de tricina (250)	206
				3-O-digalactósido de quercetina (251)	
		3-O-ramnoglucósido de quercetina (252)			
<i>C. arvense</i> var. <i>setosum</i>	----	Rutina (3-O-ramnoglucósido de quercetina, 252)	207		
<i>C. arisanense</i>	Hojas	Pectolarina (253)	208		
		Glicósido de linarina (254)	209		
<i>C. aomorense</i>	----	4'-glucósido cirsimaritina (255)	210		
<i>C. amplexifolium</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206		
<i>C. albescens</i>	Hojas	Linarina (257)	211		
<i>C. babanum</i> Var. <i>otayae</i>	----	Pectolarina (253)	206		
<i>C. bitchuense</i>	----	Rhoifolina (7-ramnoglucósido de apigenina, 247)	206		
<i>C. brevicaule</i>	----	Pectolarina (253)	206		
<i>C. brevistilum</i>	Hojas	4'-O-rutinósido de cirsimaritina (258)	210		
<i>C. buergeri</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206		
<i>C. carolinianum</i>	Partes aéreas	Hispidulina (111)	190		
<i>C. carolinianum</i>	Partes aéreas	Scutelarina (259)	190		
<i>C. coloradense</i>	Hojas	Linarina (257)	212		
		Pectolarina (253)			
<i>C. dipsacolepis</i>	----	Pectolarina (253)	206		
<i>C. echinus</i>	Partes aéreas	Luteolina (132)	198		
		Rutina (252)			
<i>C. ferum</i>	Hojas	Pectolarina (253)	209		
<i>C. gyojanum</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206		
<i>C. heterophyllum</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	213		
		4'-O- β -glucósido de luteolina (260)			
<i>C. hosogawa</i>	Hojas	Luteolina (132)	211		
		7 β -O-glucósido de luteolina (256)			
		Linarina (257)			
<i>C. inundatum</i>	Hojas	Pectolarina (253)	206, 214		

<i>C. japonicum</i>	Hojas	Pectolarina (253)	206, 215
		Linarina (257)	211
	----	7-neohesperidósido de hispidulina (261)	216
		4'-glucósido de cirsimarina (255) 7-rutinósido de acetina (257)	
<i>C. kagamuntanum</i>	Hojas	Pectolarina (253)	206, 214
<i>C. kamtschaticum</i>	----	Pectolarina (253)	206
		Linarina (257)	
<i>C. kawakamii</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	217
	Hojas	Linarina (257)	211
<i>C. lucens</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206
<i>C. lineare</i>	----	4'-glucósido de cirsilinol (262)	206
		4'-glucósido de cirsilol (263)	
		3-O-glucósido de kaemferol (264) 3-O-glucósido de quercetina (265) 3-O-galactósido de quercetina (266) 7-O-digluósido de apigenina (267) 4'-O-glucósido de genkwanina (268)	
<i>C. lanceolatum</i>	Flores		218
<i>C. maritimum</i>	Hojas	Cirsimarina (269)	206, 210 219
<i>C. matsumurae</i>	Hojas	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206, 214
<i>C. microspicatum</i>	Hojas	Pectolarina (253)	206, 215
<i>C. microspicatum</i>	----	Pectolarina (253)	206
<i>C. nipponicum</i>	Partes aéreas	7-O- α -L-ranopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido de pectolarigenina (271)	220
<i>C. nipponicum</i>	Partes aéreas	Pectolarina (253)	220
<i>C. nipponicum</i>	----	7 β -O-glucósido de luteolina (256)	206
<i>C. oleraceum</i>	----	7- β -O-glucósido de luteolina (256)	221
		7- β -glucósido de apigenina (248)	
		7-rutinósido de acetina (257)	
		7-rutinósido de pectolarigenina (270)	
	Flores	3-O-metil kaemferol (271)	222
		Apigenina (138)	
		Luteolina (132)	
		Linarina (257)	223
		Pectolarina (253)	
	Quercetina (272)		
	Hojas	3-O-metilquercetina (273)	224
Pectolarina (253) Linarina (257)			

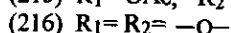
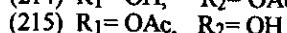
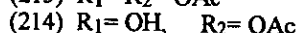
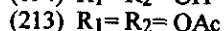
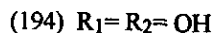
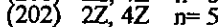
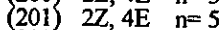
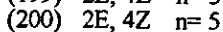
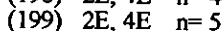
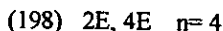
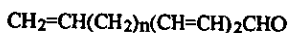
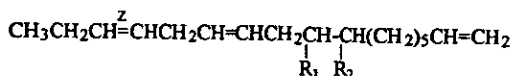
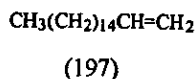
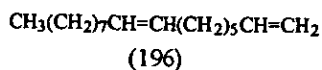
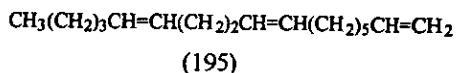
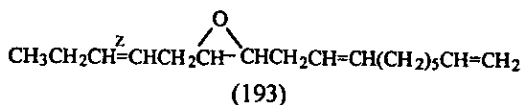
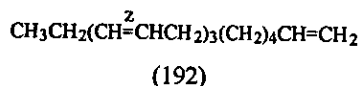
<i>C. oleraceum</i>	Hojas	4'-O-β-D-glucósido de hispidulina (274)	225
		4'-O-β-D-glucósido de nepetina (275)	
		7,4'-diglicósido de hispidulina (276)	
		2-Vicenina (277)	
<i>C. otayae</i>	Hojas	Pectolarina (253)	215
<i>C. palustre</i>	----	7-β-O-glucósido de luteolina (256)	226
<i>C. pectinellum</i>	----	Pectolarina (253)	206
		Linarina (257)	
<i>C. pendulum</i>	----	Cirsimarina (269)	227
<i>C. purpuratum</i>	----	Linarina (257)	206
	Hojas	7-Rutinósido de acetina (257)	215
<i>C. rhinoceros</i>	Partes aéreas	Apigenina (138)	228
		Luteolina (132)	
		7-O-β-glucopiranosido pectolarigenina (278)	
		Linarina (257)	
		Pectolarina (253)	
		7-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido de hispidulina (279)	
<i>C. setosum</i>	Hojas	Acetina (280)	229
		Glucósido de linarina (254)	230
<i>C. sieboldi</i>	----	7β-O-glucósido de luteolina (256)	206
<i>C. syriacum</i>	Partes aéreas	Apigenina (138)	200
		Kaenferol (281)	
<i>C. syriacum</i>	Partes aéreas	Luteolina (132)	200
		7-O-glucósido de apigenina (248)	
		7-O-diglicósido de apigenina (267)	
	Fruto	Apigenina (138)	
		Luteolina (132)	
		7-O-glucósido de apigenina (248)	
<i>C. spinosum</i>	----	Linarina (257)	206
<i>C. suffultum</i>	----	7β-O-glucósido de luteolina (256)	206
<i>C. tanakae</i> ssp <i>aomorense</i>	----	Cirsimarina (269)	206
<i>C. tanakae</i>	----	4'-O-glucósido de cirsimarina (255)	210
<i>C. wallichii</i>	----	7β-O-glucósido de luteolina (256)	217
<i>C. xanthocanthum</i>	Raíces	Linarina (257)	231
<i>C. yakusimense</i>	----	7β-O-glucósido de luteolina (256)	206
<i>C. yezoense</i>	----	Pectolarina (253)	206
<i>C. yoshizawae</i>	Hojas	Pectolarina (253)	215

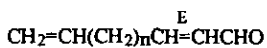
AMIDAS			
Especie	Partes estudiadas	Compuestos (estructura)	Ref.
<i>C. brevicaula</i>	----	Cirsiumamida (282)	232
FURANOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. chlorolepis</i>	Raíces	5-hidroximetil-2-furancarboxaldehído (283)	233
		5-metoximetil-2-furancarboxaldehído (284)	
		Cirsiumaldehído (285)	
		Cirsiumosido (286)	
ÁCIDOS			
Especie	Partes estudiadas	Compuesto (estructura)	Ref.
<i>C. lanceolatum</i>	Flores	Ácido <i>p</i> -coumárico (287)	218
		Ácido caféico (288)	
		Ácido ferúlico (289)	
		Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (290)	
		Ácido vanílico (291)	
<i>C. arisanense</i>	Hojas	Ácido fumárico (292)	208
<i>C. ferum</i>	Hojas	Ácido fumárico (292)	209

POLIACETILENOS



POLIOLEFINAS





(203) $n=4$

(204) $n=5$

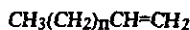
(205) $n=6$



(206)



(207)



(208) $n=9$

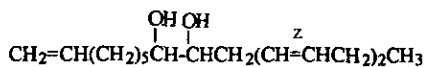
(209) $n=11$

(210) $n=12$

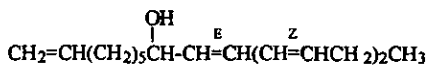
(211) $n=13$

(197) $n=14$

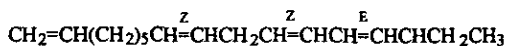
(212) $n=15$



(217)



(218)



(219)

HIDROCARBUROS SATURADOS



(220) $n=10$

(222) $n=11$

(224) $n=12$

(226) $n=13$

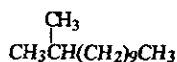
(227) $n=14$

(230) $n=15$

(231) $n=16$

(232) $n=17$

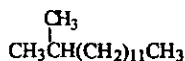
(233) $n=18$



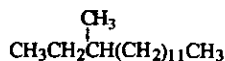
(221)



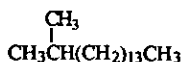
(223)



(225)

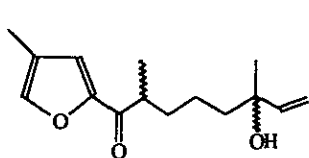


(227)

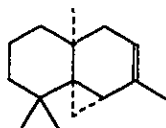


(229)

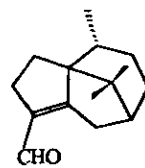
SESQUITERPENOS



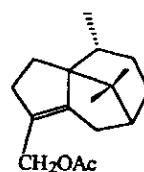
(234)



(235)

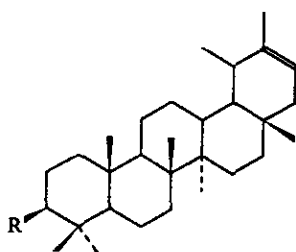


(236)

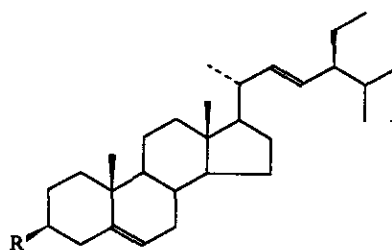


(237)

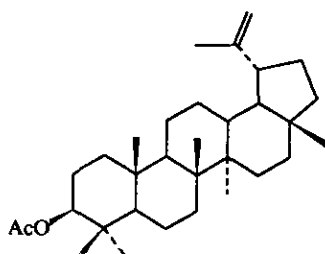
TRITERPENOS



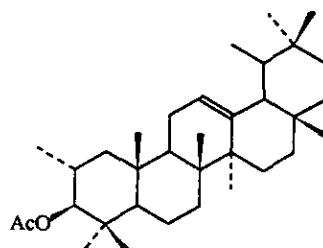
(238) R= OH
(239) R= OAc



(240) R= OH
(241) R= OAc

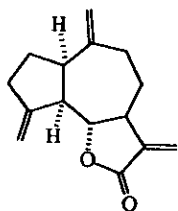


(242)

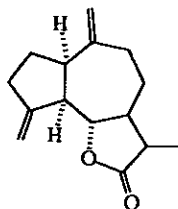


(243)

LACTONAS

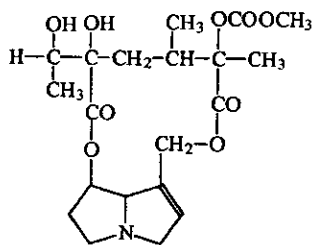


(244)



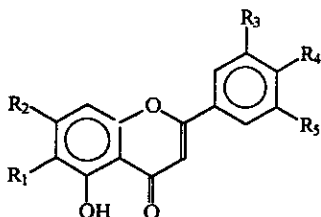
(245)

ALCALOIDES

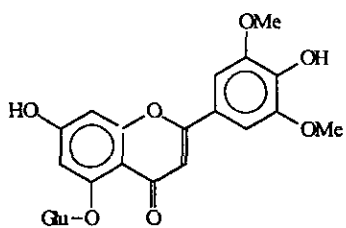


(246)

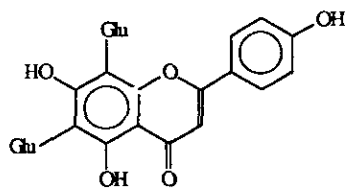
FLAVONAS



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(247)	H	Ramnoglucósido	H	OH	H
(248)	H	β-Glucósido	H	OH	H
(249)	H	β-Glucósido	H	OMe	H
(253)	OMe	O-Rutinósido	H	OMe	H
(254)	H	O-Glicósido	H	OMe	H
(255)	OMe	OMe	H	Glucósido	H
(256)	H	O-β-Glucósido	OH	OH	H
(257)	H	O-Rutinósido	H	OMe	H
(258)	OMe	OMe	H	O-Rutinósido	H
(259)	OH	OH	H	OH	H
(260)	H	OH	OH	O-β-Glucósido	H
(261)	OMe	Neohesperidósido	H	OH	H
(262)	OMe	OMe	OMe	O-Glucósido	H
(263)	OMe	OMe	OH	O-Glucósido	H
(267)	H	O-Diglicósido	H	OH	H
(268)	H	OMe	H	OH	H
(269)	OMe	OMe	H	O-Glucósido	H
(270)	OMe	O-α-L- Ramnopiranosil- (1→6)-β-D- Glucopiranosido	H	OMe	H
(274)	OMe	OH	H	O-β-D-Glucósido	H
(275)	OMe	OH	OH	O-β-D-Glucósido	H
(276)	OMe	Glicósido	H	Glicósido	H
(278)	OMe	O-β-Glucósido	H	OMe	H
(279)	OMe	O-α-L- Ramnopiranosil- (1→2)-β-D- Glucopiranosido	H	OH	H
(280)	H	OH	H	OMe	H

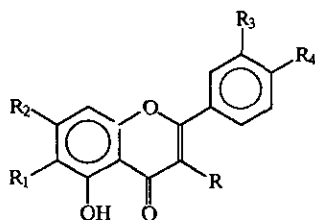


(250)



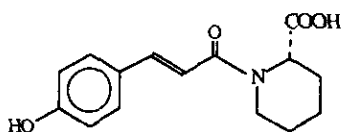
(278)

FLAVONOLES



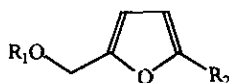
	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(251)	<i>O</i> -digalactósido	H	OH	OH	OH
(252)	<i>O</i> -rutinósido	H	OH	OH	OH
(265)	<i>O</i> -glucósido	H	OH	OH	OH
(266)	<i>O</i> -galactósido	H	OH	OH	OH
(271)	OMe	H	OH	H	OH
(272)	OH	H	OH	OH	OH
(273)	OMe	H	OH	OH	OH
(281)	OH	H	OH	H	OH

AMIDAS



(283)

FURANOS



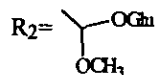
(284) $R_1 = H$

$R_2 = CHO$

(285) $R_1 = CH_3$

$R_2 = CHO$

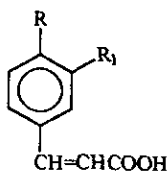
(287) $R_1 = H$



(286) $R_1 = \text{H}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-\text{CH}_2-$

$R_2 = CHO$

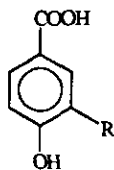
ÁCIDOS



(288) $R = OH$ $R_1 = H$

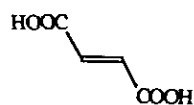
(289) $R = R_1 = OH$

(290) $R = OH$ $R_1 = OCH_3$



(291) $R = H$

(292) $R = OCH_3$



(293)

5.1.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALGUNAS SUSTANCIAS

AISLADAS DEL GÉNERO *Cirsium*.

En la tabla XXII se dan a conocer los estudios biológicos realizados a algunas sustancias aisladas del género *Cirsium*, en la cual se puede observar que los constituyentes más estudiados son los acetilenos y poliolefinas, ya que se ha informado que estos poseen toxicidad en un amplio rango de organismos, tales como: hongos, bacterias, nemátodos, insectos y células de mamíferos.

SUSTANCIA	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REF.
Cirineol A (187)	Actividad antitumorígena, inhiben el crecimiento de células KB	192, 185, 186
Cirineol B (188)		
Cirineol C (189)		
Cirsiumamida (284)	Antioxidativo y antimicrobiano (<i>S. thyphimorium</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. vulgaris</i>)	231
8,9-hidroxiheptadeca-1,11,14-trieno (194)	Potente inhibidor de la actividad 5-Lipooxigenasa <i>in vitro</i>	183
Trideca-1,11-dien-3,5,7,9-tetraeno (180)	Actividad antimicótica y antibacteriana	182
Trideca-1-en-3,5,7,9,11-pentaino (181)		
Pectolinarina (253)	Antihemorrágico	234
Shikokiol A (217)	Potente inhibidor de la actividad 5-lipooxigenasa <i>in vitro</i> en la contracción traqueal de conejillos de india.	192
Poliacetilenos C-17	Inhiben el crecimiento de células del sarcoma 180 de leucemia murina <i>in vitro</i> , también inhiben la síntesis de DNA, RNA y síntesis de proteínas en células sarcoma 180 ascítico murina.	183

Tabla XXII. Actividad biológica de algunos metabolitos secundarios aislados del género *Cirsium*.

5.1.3. USOS MEDICINALES DEL GÉNERO *Cirsium*.

En el país existen diferentes especies del género *Cirsium* que son empleadas en el tratamiento de diversos padecimientos, y se muestran en la tabla XXIII, entre las que se encuentra *C. jorullense*, la cual es empleada para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias y gastrointestinales, por los habitantes de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México.

Cirsium jorullense es una hierba erecta de hojas oblongas, de 6-9 cm de largo, lobulado-dentadas, espinosas en el margen; cabezuelas agrupadas en el extremo de las ramas, miden unos 2 cm; flores violáceas; florece los meses de julio y agosto.⁹

Tabla XXIII. Usos medicinales de algunas especies del género *Cirsium*.

Nombre científico	Nombre popular	Localidad	Padecimiento y uso	Parte utilizada	Preparación	Ref.
<i>C. anartiolepis</i>	Cardo santo	Michoacán	Para curar granos, heridas y para tratar el asma	----	----	235
<i>C. conspicuum</i>	Cardo santo	Quimixtlán y Puebla	Dolor de corazón y pulmón	Flor	Cocimiento	236
<i>C. chrenbergi</i>	Cardo	Centro del País	Problemas respiratorios, detener el flujo vaginal, regular la presión arterial, irritación de los ojos, desinflamar heridas y para el reumatismo	----	----	235
<i>C. chlorolepis</i>	----	----	Fractura y hematuria	Raíces	----	233
<i>C. jorullense</i>	Cardo	Edo. Méx.	Enfermedades de las vías respiratorias y gastrointestinales.	Flor	Infusión	236

Continuación:

<i>C. japonicum</i> DC. Var <i>ussuriense</i>	---	----	Inflamación	----	----	216
<i>C. japonicum</i>	---	----	Para el tratamiento de artritis reumatoide, hematemesis y hematuria	---	----	186, 216
<i>C. mexicanum</i>	Cardo santo	Edo. de México	Calentura y para el "mal de orin".	Flor	Infusión	236
		Misantla, Ver.	Diabetes	Raiz	Cocimiento	
<i>C. cf.</i> <i>Pinetorum.</i> <i>Greenm</i>	Cardo santo	Tlaxcala	Desinflamación de heridas cutáneas	----	Infusión	236
<i>C.</i> <i>rhapilepsis</i>	Cardo santo	Huitil, Hgo.	Diabetes, riñón	Flor	Infusión	236
<i>C.</i> <i>subcoreaceum</i>	Cardo santo	Puebla	Reumas	----	----	235
		Michioacán	Dolor del corazón	----	---	235
		Benito Juárez, Puebla y Oaxaca	Tos	Flor	----	236
Otras especies	----	----	Antiflogístico, tónico, diurético y antidiarréico	---	----	200

5.2. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE FLAVONOIDES.

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino de las plantas y se pueden encontrar libres o glicosilados. Existe una gran variedad de aplicaciones de los flavonoides, por ejemplo son empleados para el curtimiento de pieles, fermentación, condimento o aderezo de comestibles, mientras que otros tienen propiedades farmacológicas.^{237, 238}

En lo que respecta a las actividades biológicas, este grupo de sustancias presenta un amplio espectro, entre las que se encuentran: antiinflamatorias, antitumorígenas, antihepatotóxica, efectos en el sistema vascular, antimicrobiana, antiviral, antialérgica, trastornos gastrointestinales, antiulcérica, analgésica, antimalárica, hipoglucémico, anticoagulante, además inhiben la actividad de diferentes enzimas (reductasa aldosa, xantina oxidasa, cAMP, ATPasa-Ca, proteincinasa tirosina, β -glucuronidasa, aromatasas) mientras que otros tienen actividad antioxidante.²³⁷

Dada la diversidad de las actividades biológicas que presentan los flavonoides y por los fines del presente trabajo, se discutirán detalladamente esta clase de compuestos en términos de su capacidad para afectar las respuestas inflamatorias.

5.2.1. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE FLAVONOIDES.

El interés de los flavonoides como agentes antiinflamatorios naturales, se debe a que presentan ciertas ventajas sobre los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), entre las que se encuentran un alto margen de seguridad y mínima ulcerogenicidad, además de su baja toxicidad cuando son empleados en un tratamiento prolongado.²³⁹

Los flavonoides pueden inhibir varios estados de la inflamación, incluyendo formación de tejido de granulación, artritis crónica y el incremento en la permeabilidad capilar. Algunos efectos de los flavonoides en los procesos inflamatorios se muestran en la tabla XXIV.

5.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE FLAVONOIDES.

El mecanismo de acción de los flavonoides, se atribuye a los siguientes aspectos:

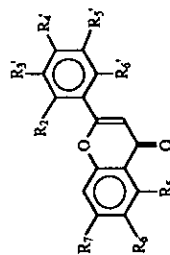
- **Inhibición de la liberación de histamina.** La degranulación de los mastocitos y la liberación de histamina se lleva a cabo por una variedad de agentes, tales como: concanavalina A, antígeno, lectinas, dextranos de alto peso molecular, ATP y el ionoforo carboxilato A23187, los cuales son dependientes de la presencia de calcio extracelular.^{243, 257} Ciertas flavonas (notablemente la quercetina, 272) incrementan la eficiencia de la bomba de iones dependientes de ATP, inhibiendo la ATPasa-Na/K⁺ y la ATPasa-Ca²⁺ mitocondrial, siendo esta última la responsable para el mantenimiento de bajos niveles de calcio intracelular, inhibiendo la secreción de histamina que es dependiente de un incremento de calcio libre intracelular. También se considera que los flavonoides previenen la activación del receptor IgE.^{244, 255}

- **Efectos en leucocitos.** Algunos reportes indican que los flavonoides suprimen la producción de óxido nítrico (NO) en fagocitos.²⁴⁸

Además, la quercetina es un inhibidor potente de la quimiotaxis, desgranulación de neutrófilos, producción de superóxidos, también bloquea varias C-cinasas que son necesarias para la activación de neutrófilos. Así mismo inhibe la reacción de fosforilación dependiente de calmodulina importante para la activación de neutrófilos, mastocitos y basófilos.²⁵³

Tabla XXIV. Efectos de los flavonoides en los procesos inflamatorios.

FLAVONAS

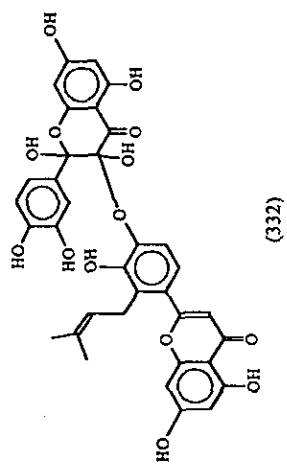
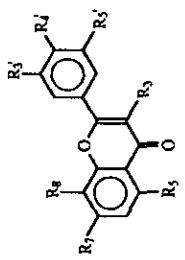


5	6	7	8	3'	4'	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
OH		OH		OH		Apigenina (138)	A, B, C	----	238, 240
OH		OGlu		OH		7-O-β-D-glucósido de apigenina (248)	A	----	238
OH		OCH ₃		OCH ₃		7,4'-dimetileter apigenina (293)	D	Carragenina	238
OH		OH	C-Gli	OH		Vitexina (294)	E, F y G	Carragenina	238
OH		OH		OH	OH	Luteolina (132)	A, B y C	----	237, 238, 240
OH		OGlu		OH	OH	7-O-β-D-glucósido de luteolina (256)	H	----	238
OH		OH		OCH ₃		Acetina (281)	----	Formalina	241
OH	OH	OH				Baicaleina (295)	B, C, I, J, K	Acido acético y compuesto 48/80	240, 242-245
OH	OH	OGlu				7-O-β-D-glucósido baicaleina (baicalina, 296)	B, C, I, J, K	Acido acético y comp. 48/80	238, 240, 243-245
OH	OH		OCH ₃			Wogonina (297)	B, I, J, K	Acido acético y comp. 48/80	238, 244, 245

OH			OH	OCH ₃	Diosmina (298)	----	Carragenina	238
OH		OH	OH	OH	8-O-β-D-glucósido de hipolaetina (299)	A, B, C, I, L y M	Carragenina	237, 238, 240
OH	OCH ₃	OGLu	OH	OH	7-O-β-D-glucósido nepetina (nepetrina, 300)	E, F y N	Carragenina, bolas de algodón y formaldehído	237, 238
OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	Sideritoflavona (301)	B y C	Carragenina	238, 240
OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	Nobiletina (302)	D	Carragenina	240
OH		OH	OH	OH	Chrisina (303)	B y C	----	240, 245
OH		OH	OH	OCH ₃	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (304)	B y C	----	240
OH	OH	OCH ₃	OH	OH	Diosmetina (305)	B y C	----	240
OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	Pedalitina (306)	B y C	----	240, 246
OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	Cirsiliol (139)	B, C y J	----	240, 246 y 247
OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	3',4'-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (307)	B y C	----	240
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	7,4'-dihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona (308)	B y C	----	248
OH		OGLu-ORha	OCH ₃	OCH ₃	Pectolarina (253)	C	Carragenina	241
OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona (8-metoxicirsilineol, 309)	N	----	249
5	6	7	8	2'	6'	5'	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN
OH		OH	OCH ₃	OH	OH	B	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	B y C	----	245
OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	B y C	----	245

OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	5,4'-dihidroxi-6,7,8,3',5'- pentametoxiflavona (312)		N	----	249
OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	Eupatilina (313)		B	----	247

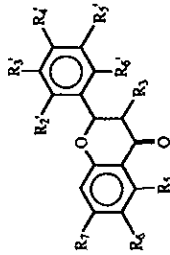
FLAVONOLES



3	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
OH	OH		OH				OH		Kaempferol (282)	B y C	Carragenina	240, 242 y 250
OH	OH		ORha				OH		7-O-α-L-ramnósido de kaempferol (314)	H	----	237 y 238
ORha	OH		ORha				OH		3,7-O-α-L-ramnósido de kaempferol (315)	H	----	237 y 238
OGlu-	OH		OH				OH		3-O-soforósido de kaempferol (316)	E y F	----	251
OGlu	OH		OH				OCH ₃		4'-O-metileter kaempferol (317)	D	Carragenina	252
OGal-	OH		ORha				OH		Robinina (318)	D	----	238
ORha ^a												

OH											Fisetina (319)	B, C, E y O	Carragenina	240 y 253
OH	OH										Quercetina (272)	B, C, E, H, L, O, P y Q	Carragenina	240-244, 253-258
OGal	OH	OH									3-galactósido de quercetina (266)	H	Bolas de algodón	237
OH	OH										Quercimeritrina (320)	H	Carragenina	237 y 238
OGal	OH	OGlu									Hyperósido (321)	H	Carragenina	237 y 238
OGlu-ORha ^b	OH	OH									3-O-β-D-neohesperidósido de quercetina (322)	E	Carragenina	243
OGlu-ORha ^a	OH	OH									3-O-β-D-rutinósido de quercetina (rutina, 252)	B y C	Carragenina	240
OH	OH	OGlu									Gossipina (323)	D	Carragenina	238
OH	OH	OH	OGlu								Hibifolina (324)	A y M	Carragenina	238
O-Rha	OH	OH									Quercitrina (3-O-α-L-ramnósido de quercetina, 325)	E y C	----	240, 258, 260
O-Xil Rham	OH	OH									3-O-xilosil (1→2) ramnósido de quercetina (326)	D	TPA	258
OCH ₃	OH	OH									3-metil quercetina (327)	C	TPA	261
OH	OH	OH									Miricetina (328)	B, C, E y O	----	240 y 253
OCH ₃	OH	OH	OCH ₃								Gnafalina (329)	B y C	----	262
OH	OH	OH									Galangina (330)	C	----	262
OCH ₃	OH	OCH ₃	OH								7,4'-dihidroxi-3,6-dimetoxiflavona (331)	B y C	----	248
OCH ₃	OH	OCH ₃	OH								3,6-dihidroxi-7-hidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (332)	B y C	----	248
OH	OH										Morina (333)	B	----	263
OH	OH	OH									Podoverina A (334)	C	----	264
		OH									Podoverina B (335)	C	----	264

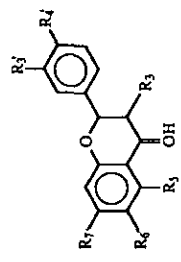
FLAVANONAS



5	6	7	3'	4'	5'	6'	2'	3	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref
OH		OH		OH					Naringenina (336)	B y H	----	238, 240 y 263
OH		OGlu		OH					7-O-β-D-glucósido de naringenina (prunina, 337)	H	----	238
OH		Oglu-ORha ^b		OH					Naringina (338)	L	Formaldehído	238
OH		Oglu-ORha ^a	OH	OCH ₃					Hesperidina (339)	B y C	----	238 y 240
OH		OH	OH	OCH ₃					Hesperetina (340)	B y C	----	240
OH		Oglu-ORha ^b	OH	OCH ₃					Neohesperidina (341)	D	----	240
	Pr	OCH ₃		OH					Bavachinina A (342)	D	Carragenina	238
OH		OH	OH	OH	OH				Plantagósido (343)	R	----	264
OH		OH				OH	OH		2,5,6,7-tetrahidroxiflavanona (344)	B y C	----	245

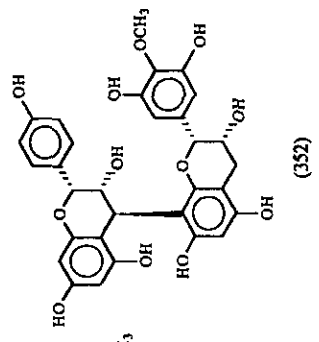
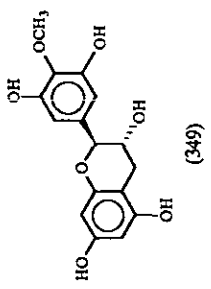
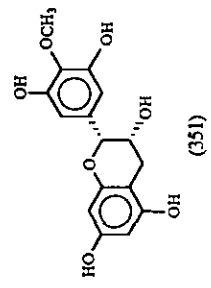
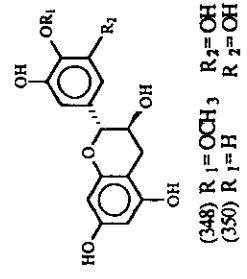
OH	OH	OH	OH	OH	OH	OCH ₃	2',3,5,6',7-pentametoxiflavanona (345)	C	----	245
----	----	----	----	----	----	------------------	---	---	------	-----

DIHIDROFLAVONOLES



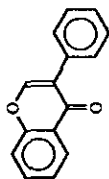
3	5	6	7	3'	4'	5'	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
OH	OH		OH	OH	OH		Taxifolina (346)	B, C, E, G-H	Formaldehído	238, 240

CATEQUINAS



SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
(+)-Catequina (347)	B, C y D	Carragenina, serotonina, dextrano o formalina	238, 240, 264 y 265
4'-O-Me-ent-galocatequina (348)	C	----	265
(+)-galocatequina (349)	C	----	265
Ouratea-catequina A (350)	C	----	265
Ouratea-proantocianidina A (351)	C	----	265
(-)-epicatequina (352)	B, C y D	Carragenina	238, 240

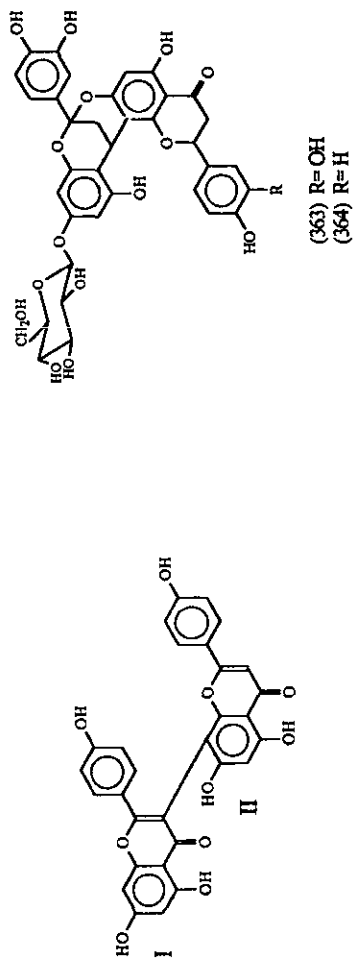
ISOFLAVONAS



SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCIÓN*	INDUCCIÓN DEL EDEMA	Ref.
Genistina (353)	D y Ñ	Levadura, bolas de algodón	238 y 249
Soforicósido (354)	D	Carragenina	238
Prunetrina (355)	I	----	238
Lanceolarina (356)	D	Carragenina	238
Orobol (357)	B y C	----	240

OH	OH	O-Glu	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	3'-O-β- glucósido de vavaina (358)	C	----	266
OH	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	Vavaina (359)	C	----	266

BIFLAVONAS



I	II	SUSTANCIA	MECANISMO DE ACCION*	INDUCCION DEL EDEMA	Ref.
3'	3'	GB1 (360)	C y D	Carragenina, levaduras y bolas de algodón.	238
OH	OH	GB2 (361)	D	Carragenina, levaduras y bolas de algodón.	238

OH	OH	OCH ₃				Kolaflavona (362)	D	Carragenina, levaduras y bolas de algodón.	238
						Diinsinínol (363)	C	----	267
						Diinsinina (364)	C	----	267

Api= aptosa, Glur= ácido glucorónico, Rham= ramnósido, Xil= xilósil, Pr= prenil, a= O-β-D-(ramnosil-(1→6)-glucósido, b= O-β-D-(ramnosil-(1→2)-glucósido.

Mecanismo de Acción*:

- A. Disminuye la infiltración de leucocitos.
- B. Inhibe la 5-lipooxigenasa.
- C. Inhibe la ciclooxigenasa.
- D. Inhibe el edema.
- E. Inhibe la liberación de histamina.
- F. Inhibe la formación de bradicinina.
- G. Antiserotonina
- H. Inhibe la fase exudativa y proliferativa de la prueba de granuloma de bolas de algodón.
- I. Inhibe el incremento de la permeabilidad vascular.
- J. Inhibe la 12-lipooxigenasa
- K. Inhibe la liberación de mediadores químicos de células mastocitos
- L. Inhibe la liberación de enzimas lisosomales.
- M. Reduce el volumen del exudado.
- N. Tiene actividad en la angiotensina
- Ñ. Inhibe la producción de NO en macrófagos
- O. Interfiere en la actividad del transporte de ATPasa
- P. Inhibe el efecto de la C-kinasa y la reacción de fosforilación dependiente de calmodulina
- Q. Inhibe las funciones de los neutrófilos: liberación de enzimas lisosomales, consumo de oxígeno, generación de radicales libres y quimiotaxis.
- R. Suprime la respuesta de anticuerpo y disminuye la proliferación de leucocitos.

- **Metabolismo del ácido araquidónico.** Se ha demostrado que los flavonoides interfieren con la enzima del metabolismo de ácido araquidónico (fosfolipasa A₂) inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y del FAP.^{249, 256, 258}

De esta manera los flavonoides inhiben las propiedades de las enzimas CO-1 y CO-2 necesarias para la biosíntesis de prostaglandinas y/o la 5-LO, en diferentes potencias y selectividades; cabe mencionar, que algunos compuestos son inhibidores selectivos de CO y LO, mientras que otros tienen una inhibición dual.^{243, 245, 250, 255 y 258}

El mecanismo de interacción de los flavonoides con la PG sintetasa, aún no está bien definido, pero se ha propuesto que el compuesto que posee propiedades antioxidantes o de radicales libres se une a la enzima, interfiriendo con su actividad. Las propiedades antioxidantes de flavonoides se deben al hidroxilo fenólico y al grupo 4 ceto.²⁵⁹

En lo que respecta al mecanismo de acción en la lipooxigenasa, se ha sugerido que los hidroxilos 3',4' permiten la formación de quelatos con Cu²⁺ y otros iones divalentes conocidos para catalizar muchos procesos que conducen a la aparición de radicales libres. Estas propiedades antioxidantes de los flavonoides determinada por su estructura polihidroxilada, está relacionada con la actividad inhibitoria de la lipooxigenasa.²³⁹

5.2.3. RELACIÓN ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE FLAVONOIDES.

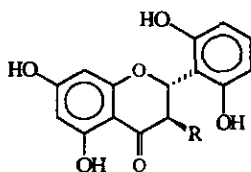
El gran interés de los flavonoides con propiedades antiinflamatorias, permite que se continúe trabajando por encontrar nuevas moléculas y poder establecer una relación estructura actividad y obtener compuestos con mayor actividad.

En cuanto a las relaciones estructurales necesarias para la inhibición de la CO, se estableció la presencia del grupo pirocatecol, incrementando el efecto inhibitorio con el

grado de hidroxilación en el anillo A y B. En flavonoles la hidroxilación en la posición 3 es suficiente, especialmente si el compuesto posee otro hidroxilo en la posición 5. Además el doble enlace 2,3 aumenta la actividad.²⁶³ La glicosilación disminuye la actividad de los compuestos,²⁵⁵ mientras un pequeño sustituyente apolar en el anillo A, parece ser favorable.

Por otro lado en las flavonas y flavanonas los grupos esenciales para la inhibición de la 5-LO son el grupo carbonilo en la posición 4, los hidroxilos en 3,5,7,4' y el doble enlace 2,3, además un hidroxilo o un metoxilo en la posición 6 pueden incrementar la actividad.²³⁹

El efecto inhibitorio de la enzima 5-LO se ilustra en la tabla XXV, en la que se puede observar que la formación de 5-HETE fue inhibida por varios flavonoides, el valor de IC₅₀ para la 5-lipooxigenasa fue en el orden siguiente: baicaleina (295) > 2',5,5',7-tetrahidroxi-6',8-dimetoxiflavona (310) > skulcapflavona II (311) > baicalina (296) > wogonina (297), de estos resultados se puede suponer que la correlación entre la estructura de estos flavonoides y su efecto inhibitorio se debe a dos grupos hidroxilos fenólicos en la posición C-5 y C-6 del anillo A, además de un grupo hidroxilo en la posición C-2' del anillo B del esqueleto de la flavona. Mientras que para la inhibición de la formación de HHT, el valor IC₅₀ tiene el siguiente orden (2S), 2',5,6',7-tetrahidroxiflavanona (365) > wogonina (297) > 2',5,5',7-tetrahidroxi-6',8-dimetoxiflavona (310) ≥ skulcapflavona II (311) ≥ (2R, 3R), 2',3,5,6',7-pentahidroxiflavanona (366) ≥ baicaleina (295) > crisina (303), estos resultados sugieren que un número de grupos metoxilo en el esqueleto de la flavona son esenciales para la inhibición de la formación de HHT.²⁴⁵



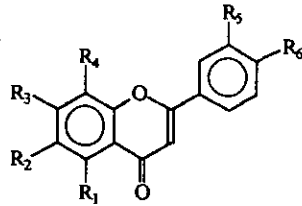
(365) R= H

(366) R= OH

COMPUESTO	IC ₅₀ (μM)	
	5-HETE (producto LO)	HHT (producto CO)
Baicaleina (295)	7.13 ± 0.767	55.30 ± 16.90
Baicalina (296)	180.00 ± 17.80	No hay efecto
Wogonina (297)	> 1000	14.60 ± 3.51
Skulcapflavona (311)	72.70 ± 11.70	44.00 ± 3.01
2',5,5',7-tetrahidroxi-6',8-dimetoxiflavona (310)	25.80 ± 4.13	41.30 ± 1.67
Crisina (303)	No hay efecto	640.00 ± 62.40
(2S),2',5,6',7-tetrahidroxiflavanona (365)	670.00 ± 85.00	5.63 ± 1.27
(2R,3R),2',3,5,6',7-pentahidroxiflavanona (366)	No hay efecto	50.00 ± 4.04

Tabla XXV. Efectos de varios flavonoides en la formación de 5-HETE y HHT en leucocitos polimorfonucleares de ratas

Por otro lado, en la tabla XXVI se aprecia que las flavonas sin sustituir presentan una actividad muy débil, así mismo, los compuestos F-77 (371, R₅= H, R₆= OH), F-79 (372, R₅= OH, R₆= OCH₃) y F-75 (373, R₅=R₆= OCH₃) fueron mucho menos activos, mientras que el cirsilio y pedalitina son más activos, estos compuestos tienen la estructura catecol en el anillo B que es necesaria para inhibir la 5-LO. Además, la modificación del grupo 5-hidroxilo del cirsilio disminuye el efecto inhibitorio como en F-81 (308, R₁= OCH₃). Pedalitina (306, F= 27) con un 6-hidroxilo fue activo como el cirsilio. La desmetilación de la posición 7 reduce el efecto inhibitorio como se observa en F= 28.²⁴⁶



COMPUESTO	SUSTITUCIÓN						ACTIVIDAD DE LA ENZIMA (%)	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	1µm	10µm
F-0 (Flavona)	H	H	H	H	H	H	91	77
F-26 (cirsiol, 263)	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OH	8	0
F-77 (367)	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	92	36
F-79 (368)	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	89	78
F-75 (369)	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	98	92
F-27 (pedalitina, 306)	OH	OH	OCH ₃	H	OH	OH	9	0
F-28 (370)	OH	OH	OH	H	OH	OH	50	9
F-81 (308)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OH	33	6
F-2 (301)	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	17	0
F-8 (quercetina, 271)	OH	H	OH	H	OH	OH	70	15

Tabla XXVI. Efecto de varios flavonoides en la 5-lipooxigenasa.

6. METODOLOGÍA.

6. METODOLOGÍA.

6.1. ESTUDIO QUÍMICO.

Cirsium jorullense fue colectada en un bosque de pinos a 2740 m snm, entre las 10 y 14 horas del 3 de septiembre de 1996 por el M. en C. Arturo E. Cano Flores a 3 Km al NO de San Rafael Tlalmanalco, Estado de México. Se depositó en el Herbario MEXU del Instituto de Biología de la UNAM. Fue identificada y clasificada por el Dr. Osvaldo Téllez (el número de registro del Herbario se encuentra en proceso de obtención).

Las partes aéreas de la planta fueron separadas en hojas-tallo y flores, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a realizar los extractos de baja, mediana y alta polaridad como se describe a continuación, ver la tabla XXVII.

Hojas-tallos.

1280 g de hojas-tallo se sometieron a extracciones sólido-líquido con *n*-hexano, de donde se obtuvieron 21.739 g. de extracto hexánico.

Posteriormente el residuo vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron extracciones sólido-líquido (percolación) con acetato de etilo caliente, para lo cual se empleó una columna de vidrio (70 cm de largo por 9 cm de diámetro) empacada con la planta molida, a través de la cual se hizo pasar el disolvente caliente en repetidas ocasiones y de donde se obtuvieron 6.77 g del extracto de acetato de etilo. Cabe mencionar que durante la eliminación del disolvente para la obtención del extracto fue separado por filtración a vacío 876 mg de un sólido de color verde-amarillento, sólido A.

Una vez seco el material vegetal se procedió a obtener el extracto etanólico de la misma manera descrita para la obtención del extracto de acetato de etilo. Después de concentrar el disolvente, se obtuvieron 71.11 g de un sólido amarillo-verdoso (sólido B) que fue separado por filtración a vacío y 27.6832 g de residuo que corresponde a las aguas madres del extracto etanólico.

Flores.

Se colocaron 1470 g de flores a extracciones mediante maceración, para obtener los extractos hexánico, clorofórmico y etanólico, de este último extracto se obtuvo 9.66 g de un sólido amarillo verdoso (sólido C).

Partes de la planta (peso inicial en g.)	Peso del extracto (g.)					
	Hexánico	Acetato de etilo		Clorofórmico	Etanólico	
		Sólido	Aguas madres		Sólido	Aguas madres
Hojas-tallos (1280)	21.739	0.876 (A)	6.77	---	71.11 (B)	27.687
Flores (1470)	45.467	---	---	8.866	9.66 (C)	26.1

Tabla XXVII. Peso (g) de los diferentes extractos obtenidos.

A cada uno de los extractos se les determinó la toxicidad en *Artemia salina*, así como su actividad antimicrobiana y antiinflamatoria, los resultados se indican en las tablas XXVIII-XXX, respectivamente.

6.1.1. EXTRACTO CON ACETATO DE ETILO DE HOJAS-TALLOS (SÓLIDO A).

Hispidulina (111) y eupatilina (313).

Para la purificación del sólido obtenido a partir del extracto con acetato de etilo de hojas-tallo (sólido A), se procedió de la siguiente manera:

Se colocaron 547 mg del sólido impuro en un equipo de extracción Soxhlet, empleando *n*-hexano como disolvente durante 4 h. 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 las extracciones con éter etílico, benceno y acetona, se obtuvieron dos sustancias, las cuales fueron identificadas como hispidulina y eupatilina, al ser comparadas en CCF con muestras auténticas, sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas se indican en las tablas XXXI-XXXIV, pp 137-139.

A las sustancias presentes en estas extracciones se les realizaron pruebas antiinflamatorias, los resultados se dan a conocer en la tabla XXX, pp136.

6.1.2. EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS-TALLOS (SÓLIDO B).

Hispidulina (111) y eupatilina (313).

Para purificar el sólido B impuro obtenido de la extracción sólido-líquido con etanol de hojas-tallo, de igual manera se montó un sistema de extracción con un equipo Soxhlet, para lo cual se colocaron 2 g del sólido, la extracción se inició con *n*-hexano por 4 h, de

donde se obtuvieron 0.0017 g, prosiguiendo las extracciones con éter etílico (0.0296 g), benceno (0.0043 g) y acetona (0.1250 g), sucesivamente.

De la extracción con éter, benceno y acetona se determinó la presencia de dos sustancias, que dan prueba positiva en CCF al emplear como revelador químico FeCl_3 en etanol al 1% y que corresponden a la hispidulina y eupatilina, al ser comparadas en CCF con estándares.

A. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL SÓLIDO B.

Hispidulina (111) y eupatilina (313).

Se colocaron 0.1804 g del sólido B en un matraz balón de 100 ml al que se adicionaron 20 ml de ácido clorhídrico (20 % v/v) y 20 ml de una solución MeOH-H₂O (1:1). La reacción se dejó con agitación y calentamiento durante 24 h. Después de este lapso de tiempo, se separó por filtración a vacío 0.0363 g (5.44 %) de un sólido verde-amarillento soluble en acetona, metanol, DMF y DMSO. En CCF revelaron dos manchas que corresponden a la hispidulina y eupatilina, las cuales fueron comparadas en CCF con referencias. El residuo se trató con una solución saturada de NaHCO_3 (3 x 5 ml), seguido de tres lavados con agua (5 ml), finalmente se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró por medio del rotavapor.

B. REACCIÓN DE ACETILACIÓN DEL SÓLIDO B.

Flavonoides glicosilados.

Se colocaron 5.0785 g de sólido impuro con 7 ml de anhídrido acético y 2.5 ml de piridina a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se siguió por CCF y después

de 27 h se dio por concluida la reacción agregando 5 g de hielo. Para la recuperación del compuesto acetilado se realizaron extracciones con cloroformo (2 x 5 ml). Antes de proceder a los lavados subsecuentes, se separó por filtración a vacío un sólido amarillo (m= 0.5961 g, 11.74 %, pf.> 300°C, soluble en DMF). La fase clorofórmica se trató con una solución de HCl (3 x 5 ml) al 10%, posteriormente con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3 x 5 ml) y lavados con agua, finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro.

La mezcla del producto de reacción se concentró, obteniéndose 3.93 g de una mezcla compleja de derivados acetilados que no se logró resolver por las técnicas cromatográficas convencionales. Sin embargo, se supone que se trata de flavonoides glicosilados, ya son de alta polaridad y dan prueba positiva al emplear como revelador químico $FeCl_3$ al 1 % en etanol.

6.1.3. EXTRACTO ETANÓLICO DE FLORES (SÓLIDO C).

Hispidulina (111), eupatilina (313).

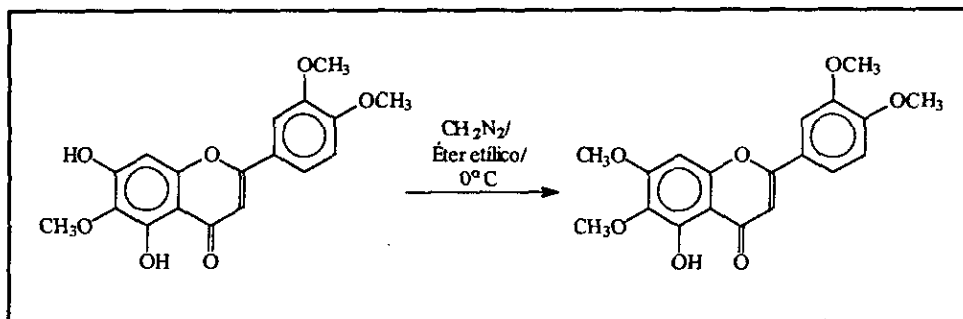
Para purificar el sólido C obtenido de la extracción sólido-líquido con etanol de flores, se montó de igual manera que en el caso del sólido A y B, un sistema de extracción con un equipo Soxhlet, para lo cual se empleó 1g del sólido, obteniendo sucesivamente el extracto hexánico (0.0116 g), éter etílico (0.0196 g), bencénico (0.0081 g), acetónico (0.0616 g) y metanólico (0.0797 g).

Al realizar las extracciones con éter, benceno y acetona, en CCF se detectó la presencia de dos sustancias y que corresponden a la hispidulina y eupatilina al ser comparadas con estándares.

A. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL SÓLIDO C.

Hispidulina (111), eupatilina (313), 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona(313a) y 3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (371).

Se tomaron 200 mg del sólido y se sometieron a una hidrólisis ácida por 42 h, como se muestra en el diagrama III. Concluida la reacción se separó por filtración a vacío un sólido amarillo al que se le realizó una reacción de metilación con CH_2N_2 en éter etílico a 0°C , obteniéndose 7.3 mg de un sólido amorfo de color amarillo, con pf. $183\text{-}186^\circ\text{C}$, soluble en AcOEt y CHCl_3 , la cual corresponde a la 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (esquema 7), cuyas propiedades espectroscópicas se indican en las tablas XXXI, XXXIII, XXIV, pp 137-139. Al derivado metilado obtenido se le realizaron pruebas antiinflamatorias, el resultado se indican en la tabla XXX, pp 136.



Esquema 7: Metilación de la eupatilina con diazometano.

Las aguas madres obtenidas de la filtración, se sometieron a una extracción liq.-liq. con CHCl_3 . La fase orgánica resultante se concentró y los productos mayoritarios se separaron mediante una cromatografía en columna a vacío, de donde se identificaron y caracterizaron las siguientes sustancias: hispidulina (Hex-AcOEt 8:2), eupatilina (Hex-AcOEt, 8:2) y 3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (Hex-AcOEt 8:2-7:3). Las dos primeras fueron identificadas en CCF al utilizar como referencia muestras auténticas. Las propiedades espectroscópicas de la última sustancia se indican en la pp 137-139.

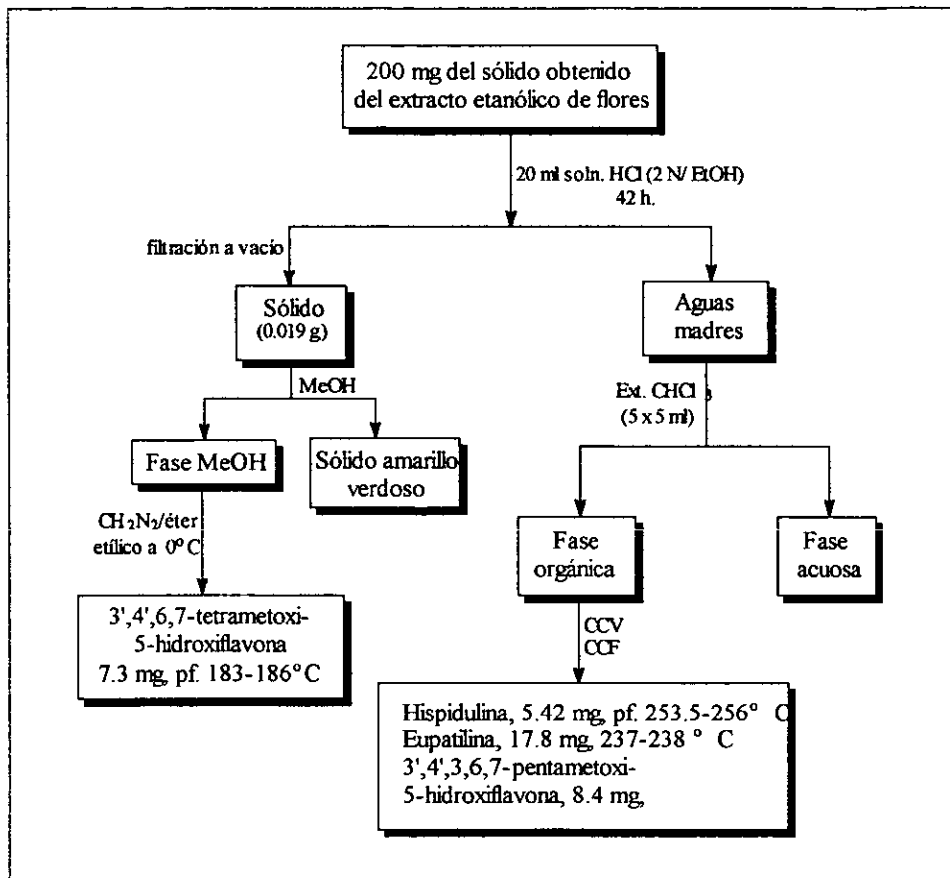


Diagrama III. Hidrólisis del sólido obtenido de flores (C).

B. REACCIÓN DE ACETILACIÓN DEL SÓLIDO C.

Flavonoides glicosilados.

Para llevar a cabo la reacción de acetilación del sólido C impuro, se hicieron reaccionar 0.1520 g con 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina a temperatura ambiente por 24 h, la reacción se detuvo agregando 3 g de hielo, la recuperación del derivado acetilado se realizó de manera convencional. De igual manera, se obtuvo una

mezcla compleja de productos, la cual fue difícil de caracterizar y purificar, por la cantidad obtenida.

C. REACCIÓN DE METILACIÓN DEL SÓLIDO C.

Flavonoides glicosilados.

Se tomaron 228.8 mg del sólido impuro obtenido de la extracción con etanol de flores, los cuales fueron disueltos en 5 ml de EtOH absoluto a temperatura ambiente, la solución resultante se enfrió (0-5°C), y posteriormente se agregó lentamente diazometano disuelto en éter etílico. Una vez terminada la reacción, se eliminó el exceso de éter etílico y se filtró a vacío un sólido amarillo (0.08 g, 34.96 %) de pf 193-195°C, parcialmente soluble en una mezcla de MeOH-H₂O y soluble en DMF. Así mismo, se obtuvo un sólido blanco (5.5 mg, 2.40 %) de aspecto algodonoso. Por otro lado, se obtuvieron de la misma reacción 24.2 mg (10.58 %) de un sólido blanco.

De estos sólidos obtenidos no fue posible purificar los constituyentes presentes, dada la complejidad de la mezcla de los derivados metilados glicosilados

6.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

6.2.1. BIOENSAYOS EN *Artemia salina*.

La metodología se indica en la pp 49.

6.2.2. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.

Para la realización de las pruebas microbiológicas, se siguió el método de Mitscher, descrito en la pp 50.

6.2.3. PRUEBAS ANTIINFLAMATORIAS.

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos de las partes aéreas se empleo la metodología de la pp 50.

El método para determinar la actividad antiinflamatoria de las sustancias puras, se llevó a cabo por via intraperitoneal y se describe a continuación⁽⁵⁾:

Se emplearon 3 ratones albino macho cuyo peso oscilo entre 22 a 25 g para cada muestra. Antes de aplicar cualquier sustancia, los animales se anestesiaron con ketamina con el fin de asegurar que la aplicación del agente de prueba como el TPA fuera lo más homogénea. Los ratones fueron pretratados via intraperitoneal con la sustancia de prueba 30 min. antes de la aplicación del agente inflamatorio (TPA). Transcurrido el periodo de pretratamiento, se aplicaron en la oreja derecha con una jeringa Hamilton, 10 µl de solución de TPA cuya concentración final fue de 2.5 µl/ 10 µl, adicionalmente en la oreja izquierda del animal recibió etanol (10µl). Los agentes de prueba se probaron a la dosis de 10 mg/Kg. La inflamación se desarrolló por espacio de 4 hr, y al finalizar dicho periodo, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se tomó de la porción central de cada oreja un pedazo de tejido de 9 mm de diámetro con la ayuda del sacabocado.

La diferencia del peso entre la oreja tratada con TPA y el peso de la oreja tratada con etanol se tomó como media de la respuesta antiinflamatoria.

⁽⁵⁾ Estas pruebas se realizaron en el Instituto de Química de la UNAM por la M. en C. Teresa O. Ramírez Apan.

7. RESULTADOS.

7. RESULTADOS.

7.1. ESTUDIO BIOLÓGICO.

Tabla XXVIII. Bioensayos de toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina*.

EXTRACTO	LC ₅₀	LSC	LIC
HOJAS-TALLO			
Hexánico	>1000	----	
Acetato de etilo (aguas madres)	59.88	82.89	42.49
Etanólico (aguas madres)	556.55	2444.7600	243.3069
FLORES			
Hexánico	243.46	656.58	118.18
Clorofórmico	>1000	----	
Etanólico (sólido)	>1000	----	
Etanólico (aguas madres)	>1000	----	

Tabla XXIX. Evaluación microbiológica de los extractos obtenidos (1 mg/ml) por el método de Mitscher.

EXTRACTO	MICROORGANISMO						
	1	2	3	4	5	6	7
HOJAS-TALLO							
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de etilo	-	-	-	-	-	-	-
Etanólico (aguas madres)	-	-	-	-	-	+	-
Etanólico (sólido)	-	-	-	-	-	-	-
Etanólico (extracción del sólido con acetona, mediante el Soxhlet)	-	-	-	+	-	-	-
FLOR							
Hexánico	-	-	-	-	-	-	-
Clorofórmico	-	-	-	-	-	-	-
Etanólico (aguas madres)	-	-	-	-	-	-	-
Etanólico (sólido)	-	-	-	-	-	-	-

- = no hay inhibición

± = ligero crecimiento

+ = inhibición

1. *Staphylococcus aureus*.
2. *Streptococcus mutans*.
3. *Escherichia coli*.
4. *Pseudomonas aeruginosa*.

5. *Candida albicans*.
6. *Sarcina lutea*.
7. *Mycobacterium smegmatis*.

Tabla XXX. Actividad antiinflamatoria de los extractos* y de las sustancias** de *Cirsium jorullense*.

EXTRACTO	% de inhibición	X (mg) ± ES
HOJAS-TALLO*		
Hexánico	17.61	12.63 ± 0.83
Acetato de etilo	69.60	4.66 ± 2.1
Etanólico	10.29	13.33 ± 0.44
FLORES*		
Hexánico	25.64	15.33 ± 0.29
Etanólico	13.86	12.80 ± 0.84
SUSTANCIAS**		
Hispidulina	25.20	----
Eupatilina	23.65	----
3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi- <i>flavona</i>	34.94	----
Indometacina	29.58	----

% de inhibición = $100 - (X \text{ tratado} / X \text{ control}) \times 100$;
promedio del tejido de 3 animales.

* Dosis 0.5 mg/oreja en el modelo del edema inducido con TPA en la oreja del ratón.

** Dosis 10 mg/Kg, por vía intraperitoneal

7.2. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS.

Tabla XXXI. Datos de espectroscopia de infrarrojo de las flavonas aisladas de *Cirsium jorullense*.

SUSTANCIA	IR v _{matr} (Suspensión) cm ⁻¹
Hispidulina (111)	3480, 3368, 1660, 1610, 1571, 1363, 1378, 1166, 1094, 822.
Eupatilina (313)	3183, 1655, 1620, 1580, 1510, 1425, 1336, 1264, 1149.
SUSTANCIA	IR v _{matr} (CHCl ₃) cm ⁻¹
3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi flavona (313a)	2939, 2842, 1656, 1614, 1591, 1515, 1496, 1460, 1330, 1268, 1174, 1126.
3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (371)	3597, 3531, 2935, 2856, 1768, 1637, 1593, 1510, 1462, 1432, 1365, 1327, 1132.

Espectrofotómetro Nicolet FT IR, modelo 5 Sx.

Tabla XXXII. Datos de espectrometría de masas de las flavonas aisladas de *Cirsium jorullense*.

SUSTANCIA	m/z abundancia relativa
Eupatilina (313)	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).
3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (371)	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).

Espectrofotómetro de masas Hewlett Packard 5985, 70 eV

Tabla XXXIII. Datos de RMN-¹H de las flavonas aisladas de *Cirsium jorullense*.

H	SUSTANCIAS			
	Hispidulina*	Eupatilina*	3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona**	3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi-flavona*
H-3	6.50 s	6.56 s	6.559 s	----
C ₃ -OH	13.00 s	12.99 s	12.76 s	12.61 s
H-8	6.54 s	6.76 s	6.603 s	6.51 s
C ₇ -OH	9.68 s.a	----	----	----
C ₄ -OH	9.68 s.a	----	----	----
C ₇ -OCH ₃	----	----	3.99 - 3.93 s	3.97 - 3.87 s
C ₆ -OCH ₃	3.92 s	.94 - 3.83 s		
C ₃ '-OCH ₃	----			
C ₄ '-OCH ₃	----			
C ₃ -OCH ₃	----			
H-2'	7.75 dd (6.75 y 1.95)		7.47 d (2.1)	7.34 d (2.1)
H-5'	6.96 dd (7.05 y 1.95)	7.06 d (8.7)	6.98 d (7.7)	6.99 d (8.4)
H-6'	7.75 dd (6.75 y 1.95)	7.60 dd (8.6 y 2.1)	7.53 dd (8.4)	7.73 dd (9 y 2.1)
H-3'	6.96 dd (7.05 y 1.95)	----	----	----

300 MHz, TMS

* CDCl₃ + DMSO.

** CDCl₃.

Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

Tabla XXXIV. Datos de RMN-¹³C de las flavonas aisladas de *Cirsium jorullense*.

C	SUSTANCIAS			
	Hispidulina	Eupatilina	3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona	3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi-flavona
C-2	163.85	163.11	164.01	158.80
C-3	102.34	104.13	104.55	138.85
C-4	182.12	181.90	182.63	178.92
C-5	152.51	156.88	158.81	152.81
C-6	130.95	108.95	120.12	132.36
C-7	156.38	163.11	158.81	158.78
C-8	93.73	93.93	90.64	90.35
C-9	152.51	156.88	152.47	155.857
C-10	104.47	103.20	106.25	106.65
C-1'	121.50	119.62	123.95	122.98
C-2'	127.53	119.61	109.10	111.39
C-3'	115.66	151.74	152.47	148.85
C-4'	160.66	152.59	153.18	151.46
C-5'	115.66	111.08	111.36	110.92
C-6'	127.53	123.05	123.95	122.15
C6-OCH ₃	60.84	59.69	60.84	60.88
C-3'-OCH ₃	----	55.62	56.34	60.21
C-4'-OCH ₃	----	55.45	56.21	56.33
C-7-OCH ₃	----	----	56.16	56.12
C-3-OCH ₃	----	----	----	56.03

Espectros de 75 MHz, TMS. Espectrofotómetro de RMN Varian FT8A y VXR-3005

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

8.1. ANÁLISIS QUÍMICO.

Purificación de los sólidos A, B y C obtenidos del extracto con AcOEt y EtOH.

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 un equipo Soxhlet, para eliminar aquellas sustancias que podrían considerarse como impurezas, y las cuales se fueron eliminando con disolventes de polaridad similar.

Por medio de CCF se pudo establecer la presencia de hispidulina y eupatilina en los extractos etéreos, bencénicos y acetónicos del tratamiento realizado a los sólidos A, B y C.

Reacción de acetilación de los sólidos impuros B y C.

En la reacción de acetilación del sólido B, se obtuvo un sólido amarillo que en CCF muestra una mezcla de sustancias que dan prueba positiva con FeCl_3 al 1% en etanol, lo cual indica que presenta como esqueleto base el de un flavonoide. Se solubiliza 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.

Algo similar ocurrió con el residuo de la reacción de acetilación del sólido C. Por las características que presentaron, todos estos compuestos obtenidos son mezclas de flavonoides glicosilados.

Reacción de hidrólisis ácida de los sólidos B y C.

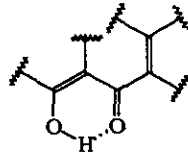
Debido a que la hipótesis estructural de las sustancias mayoritarias aisladas del extracto etanólico de las partes aéreas era la de un glicosiflavonoide, se procedió a realizar la reacción de hidrólisis ácida del sólido B. Así se obtendría el azúcar (fase acuosa) y la aglicona (fase orgánica), de ésta última se obtuvo un sólido verde olivo que revela en CCF con FeCl_3 al 1% en etanol.

De la reacción de hidrólisis ácida del sólido C, se obtuvo un sólido verde olivo, con Rf similar al producto de hidrólisis de B. Las aguas madres que fueron sometidas a una separación cromatográfica en columna la cual permitió determinar la presencia de hispidulina, eupatilina (3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona) y 3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi-flavona. Por otro lado, el sólido obtenido de la filtración (ver diagrama III, pp 130) fue tratado con CH_2N_2 obteniéndose como producto de reacción la 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona.

Eupatilina (3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona, 313).

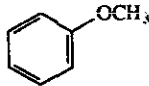
Del sólido obtenido del extracto etanólico de hojas-tallo, y del sólido obtenido de la extracción con etanol de flores que fueron sometidos a hidrólisis ácida, se obtuvo unos cristales amarillos, pf 237-238°C, el cual muestra en su espectro de masas por impacto electrónico un ion molecular de m/z 344, al que se le puede asociar una fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ($\Omega=11$), y que da prueba positiva con FeCl_3 al 1% en etanol.

En su espectro de IR (espectro 15) 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}),²⁶⁸ 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 B, lo cual explica dos grados de insaturación.



Fórmula parcial B

Adicionalmente, la formación del puente de hidrógeno fue corroborada al analizar su espectro de RMN-¹H (espectro 16), 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 metoxilo unidos a anillos aromáticos, fórmula parcial C, lo cual permite justificar 4 grados de insaturación más en la molécula.



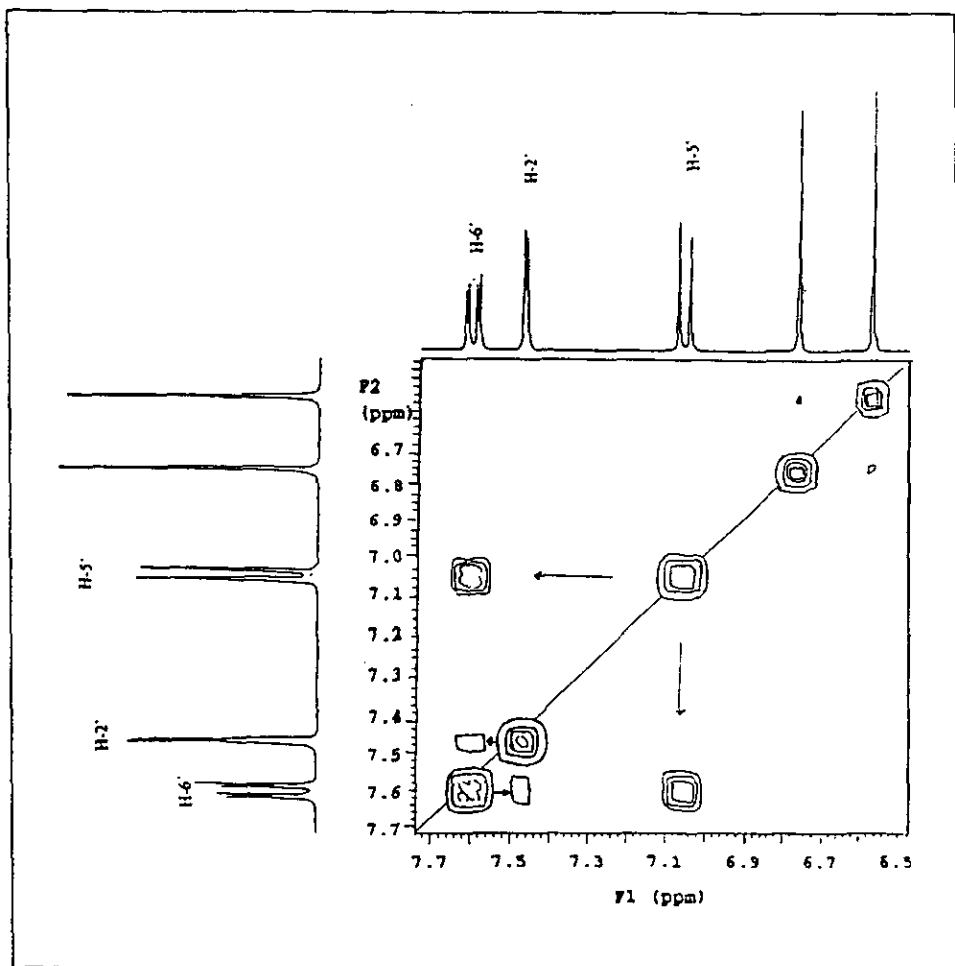
Fórmula parcial C

En δ 6.56 se observa una señal simple que corresponde a un hidrógeno vinílico, por lo que se propuso como esqueleto base el de una flavona, considerando además la simplicidad de señales observadas en el espectro para otro tipo de flavonoides, como se muestra en la tabla XXXV.²⁶⁹

FLAVANONA			FLAVONA			DIHIDROFLAVONOL			FLAVONOL		
H-2	δ 5.5-5.3	<i>dd</i>	—	—	—	H-2	δ 5.2	β ax	H-2	—	
H-3ec	δ 2.9-2.8	<i>dd</i>	H-3	δ 6.3	<i>S</i>	H-3	δ 4.2	α ax	H-3	—	
H-3ax	δ 3.1-3.0	<i>dd</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	

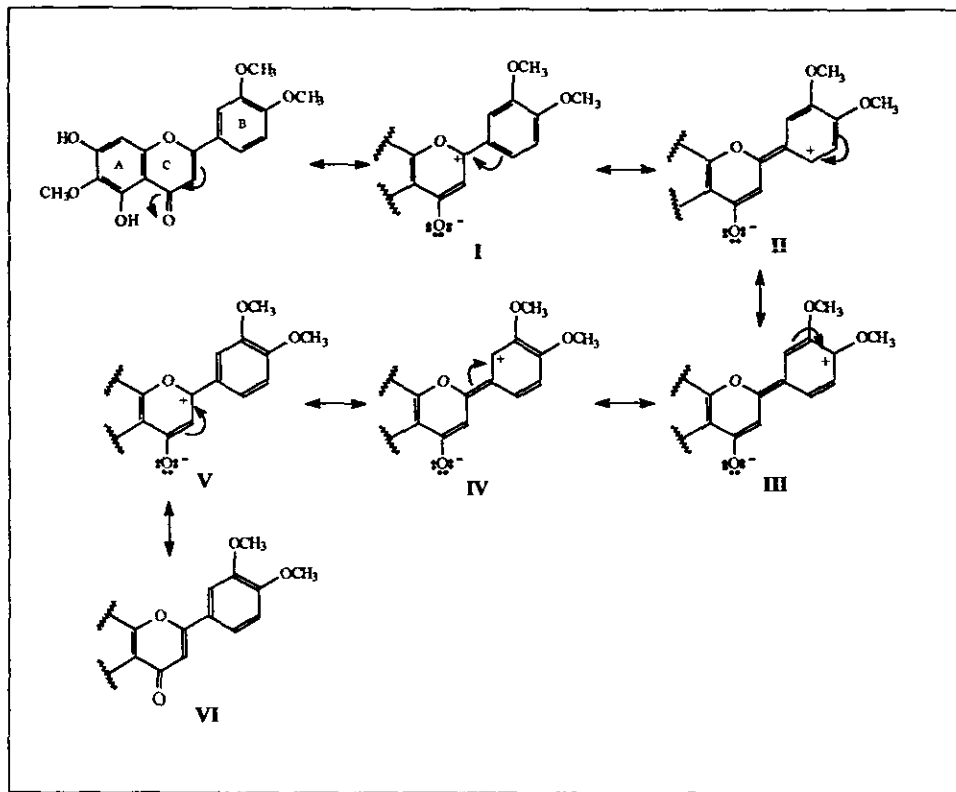
Tabla XXXV. Desplazamientos químicos para los H-2 y H-3 en los flavonoides.

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 metoxilos se pudo determinar por la constante de acoplamiento. Al H-6' se le asignó la señal en δ 7.60 (*dd*, $J= 8.6$ y 2.1 Hz), la cual se acopla con H-2' y H-5', de acuerdo con su espectro COSY (esquema 8). 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).



Esquema 8. Espectro COSY que muestra los acoplamientos de H-6' con H-2' y H-5'.

Los desplazamientos químicos asignados a H-2' y H-6' están de acuerdo con las formas resonantes que se muestran en el esquema 9, donde se observa en las formas resonantes II y IV una deficiencia electrónica para dichos hidrógenos, la diferencia en el 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.

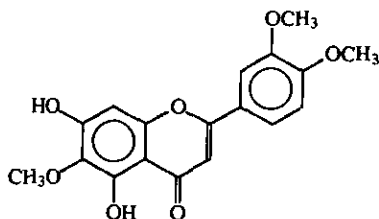


Esquema 9. Estructuras resonantes que están de acuerdo a los desplazamientos químicos.

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

El espectro de RMN-¹³C (espectro 17), muestra en desacoplamiento total 18 átomos de carbono. La asignación de los carbonos presentes se hizo considerando los desplazamientos químicos descritos en la literatura para la luteolina y cromona.^{270 y 271}

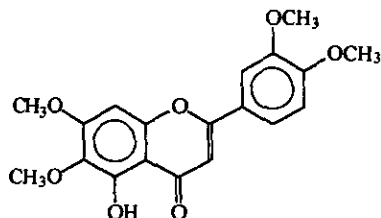
Con base en lo anterior, se llegó a la conclusión que la sustancia de *C. jorullense* era la eupatilina (3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona), previamente aislada de otras especies de la familia Compositae.



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

3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (313a).

El tratamiento de la 3',4',6-trimetoxi-5,7-dihidroxi-flavona con CH₂N₂ 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 19), se observa una señal simple adicional en el región de los metoxilos aromáticos; lo cual indica que se llevó a cabo la metilación del hidroxilo en C-7. El producto obtenido de la reacción era 3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (313a).



3',4',6,7-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona.

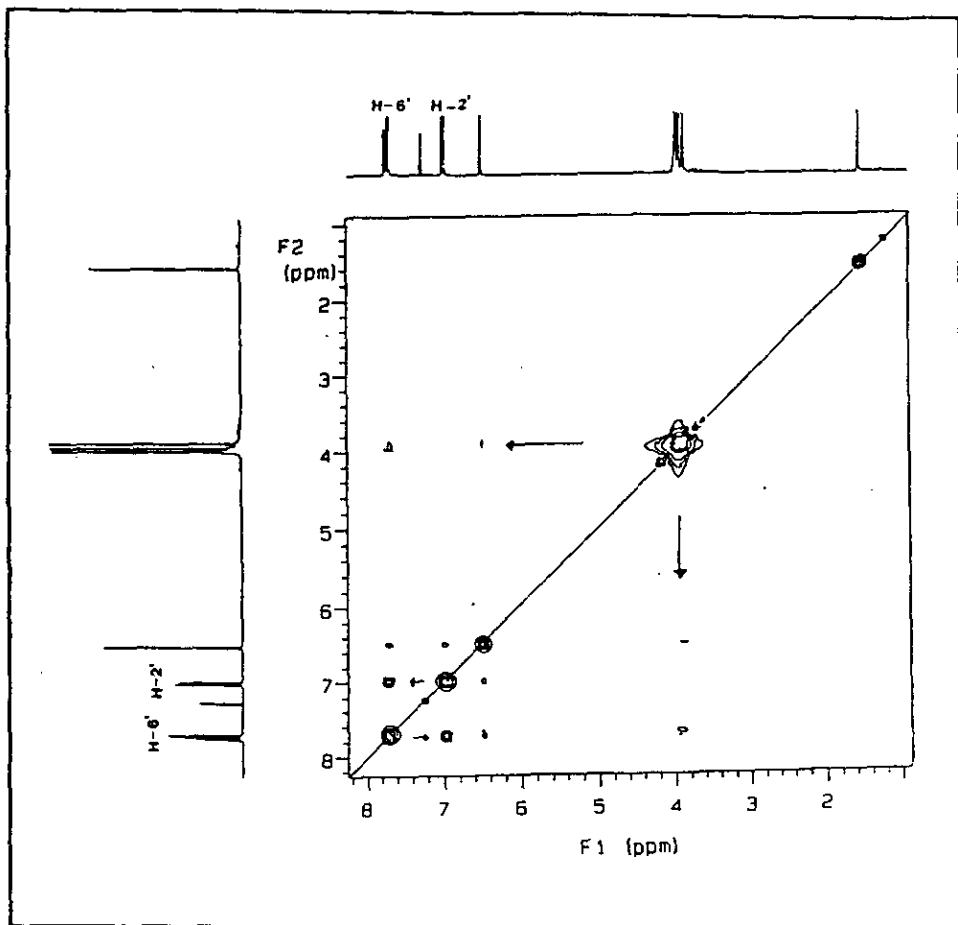
3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (371).

Del tratamiento del sólido descrito en el diagrama III (pp 30) 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 ion 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 $FeCl_3$ al 1% en etanol.

En su espectro de IR (espectro 21), se observan en 1768 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} la ν ($C=O$), a 3597 cm^{-1} se visualiza la ν ($O-H$) y en 1593 cm^{-1} la ν ($C=C$), 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 $FeCl_3$ en la CCF indica claramente que se trata de un flavonoide.

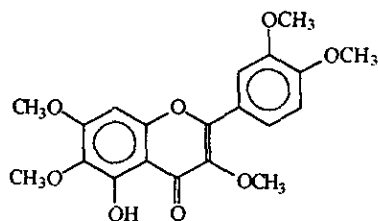
En su espectro de RMN- 1H (espectro 22) se observan las señales características para dicho esqueleto. En δ 12.61 se visualiza la señal (s) del C_3-OH , y entre δ 3.87-3.97 se observan cinco señales simples, que por su desplazamiento químico corresponden a metilos que forman parte de un fenil-metil-éter. En la región de los aromáticos se observa un patrón de sustitución para el anillo B, el cual se encuentra trisustituido, en δ 6.99 se observa una señal doble ($J=8.4\text{ Hz}$) que corresponde al H-5', en δ 7.73 aparece una señal doble de doble (dd) que corresponde al H-6' con $J_{orto}=9\text{ Hz}$ y $J_{meta}=2.1\text{ Hz}$, y finalmente la señal doble en δ 7.69 ($J=1.8\text{ Hz}$) corresponde al H-2' del anillo B, dichos acoplamientos pueden ser corroborados en su espectro COSY el cual se ilustra en el esquema 10.

En su espectro de masas 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 RMN- 1H (espectro 22), ya que no se observa ninguna señal para este hidrógeno vinílico.



Esquema 10. Espectro COSY que muestra los acoplamientos del H-2' y H-6'.

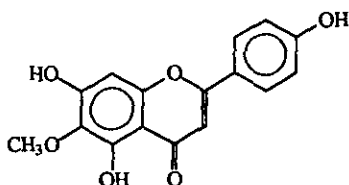
Por lo anterior, la sustancia aislada es 3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona (371).



3',4',3,6,7-pentametoxi-5-hidroxi flavona.

Hispidulina (6-metoxi-4',5,7-trihidroxi-flavona, 111).

La discusión de la sustancia se encuentra en la pp 69.



Hispidulina.

8.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

De las pruebas de citotoxicidad se encontró que las aguas madres del extracto con acetato de etilo de hojas-tallo presentaron una toxicidad marcada ($IC_{50} = 59.88$ ppm), mientras que de las aguas madres del extracto etanólico de hojas-tallo y el extracto hexánico de flores tuvieron una menor toxicidad para *Artemia salina* ($LC_{50} = 556.55$ y 243.46 ppm respectivamente), tal como se indica en la tabla XXX. Se considera que estas variaciones de los resultados están influenciadas por el tipo de constituyente y la concentración en la que se encuentran en cada uno de los extractos.

Con respecto a las pruebas antiinflamatorias de los extractos evaluados (tabla XXXII), el sólido C obtenido del extracto de acetato de etilo fue el que tuvo un mayor porcentaje de inhibición en el edema de la oreja de la rata (69.60%); sin embargo, al evaluar algunas sustancias presentes en el sólido tales como la eupatilina e hispidulina, éstas muestran un bajo porcentaje de inhibición (23.65 y 25.20% respectivamente), cabe mencionar que estas sustancias fueron evaluadas por un método distinto con el que fue evaluado el extracto, debido a problemas de solubilidad de las mismas, lo cual pudo

repercutir con los resultados. Por otro en la literatura se informa que la eupatilina presenta actividad antiinflamatoria al inhibir la 5-lipooxigenasa.²⁴⁷ De aquí que no se puede considerar que las sustancias evaluadas no presenten efecto antiinflamatorio. Así mismo, esta actividad pudo estar influenciado por la presencia de otras sustancias, tales como los flavonoides glicosilados, presentes en los extractos y que no fue posible de purificar.

En las evaluaciones microbiológicas se encontró que únicamente de la extracción con acetona realizada al sólido del extracto etanólico de hojas-tallo tuvo actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que de las aguas madres del extracto etanólico de flores tuvo actividad frente a *Sarcina lutea*. Ambos extractos, a pesar de ser obtenidos con etanol, presentaron actividad frente a diferentes microorganismos, lo cual se debe a que las sustancias de uno y otro extracto son diferentes, ya que del primero se identificó a la hispidulina y eupatilina, mientras que del segundo a pesar de no ser estudiado químicamente se supone que los constituyentes químicos son similares al sólido del extracto etanólico en el que se encontró flavonas glicosiladas; cabe mencionar que en la literatura se ha encontrado que los flavonoides libres y glicosilados poseen diferentes actividades biológicas entre ellas la microbiológica, en el que las flavonas libres presentan un amplio espectro²⁷³⁻²⁷⁵, mientras que cuando esta glicosilado tienen un menor espectro^{276, 277}, por lo que se considera que las flavonas son los constituyentes responsables de la actividad antimicrobiana.

V. CONCLUSIONES GENERALES.

V. CONCLUSIONES GENERALES.

En el presente trabajo se logró la purificación y caracterización estructural de 5 sustancias, contenidas en las partes aéreas de *Aloysia triphylla*, las cuales fueron: β -sitosterol (177), ácido oleanólico (144), ácido ursólico (154), hispidulina (116) y β -D-glucósido del β -sitosterol (176). Adicionalmente, se obtuvieron dos productos de la extracción selectiva de la hidrólisis con HCl (5 %) a partir del material vegetal: 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído (178) y 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona (179).

De las evaluaciones biológicas, se encontró que el extracto clorofórmico de flores fue el más letal frente a *Artemia salina*, mientras que del fraccionamiento del extracto clorofórmico de hojas-tallo, las fracciones que contenían a la mezcla de ácido ursólico y oleanólico, fueron las más tóxicas para este crustáceo. Por otro lado, de las evaluaciones antimicrobianas se observó que los aceites esenciales de hojas-tallo tuvieron actividad inhibitoria frente a *M. smegmatis*, mientras que la mayoría de los extractos hexánicos presentaron una ligera actividad frente a dicho microorganismo. Al evaluar la mezcla de ácidos, estos tuvieron una ligera actividad frente a *M. smegmatis* y *Candida albicans*. Los resultados de los ensayos antiinflamatorios de los extractos solo mostraron un ligero porcentaje de inhibición.

De *Cirsium jorullense*, se identificaron dos flavonas: eupatilina (313), hispidulina (111), y cuatro flavonas como productos de reacción de hidrólisis en medio ácido y de metilación: eupatilina (313), hispidulina (111), 6,7,3',4'-tetrametoxi-5-hidroxi-flavona (313a), 3,6,7,3',4'-pentametoxi-5-hidroxi-flavona (371).

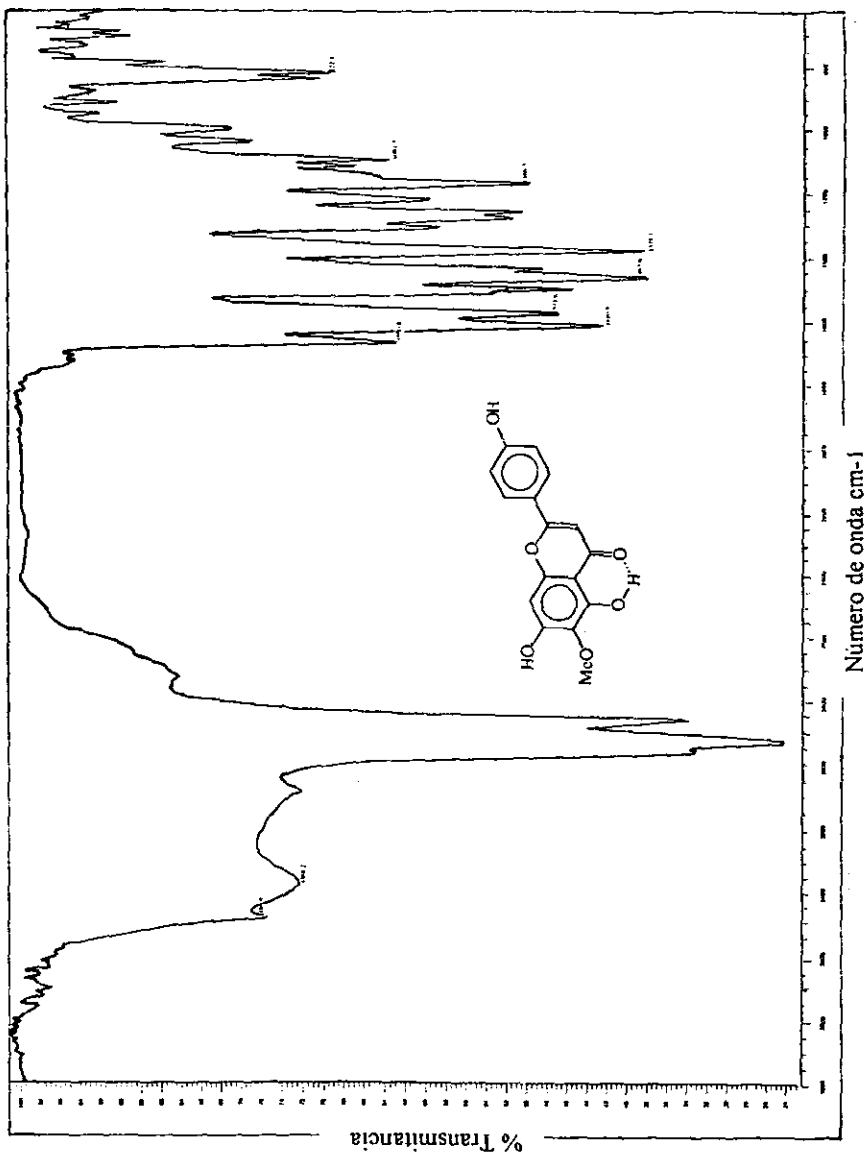
Las aguas madres del extracto de acetato de etilo mostraron toxicidad para *Artemia salina*. Por otro lado, en relación a las pruebas antiinflamatorias, el extracto que presentó un alto porcentaje de inhibición del edema fue el de acetato de etilo de hojas-tallo. Sin embargo, al evaluar algunas de las sustancias presentes en este extracto, estas no mostraron

una actividad antiinflamatoria notoria, por otra parte, únicamente los extractos etanólicos de hojas-tallo presentaron actividad inhibitoria frente a *Sarcina lutea* y *Pseudomonas aeruginosa*.

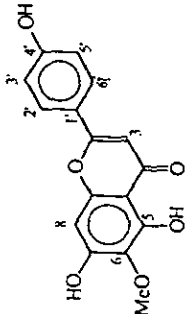
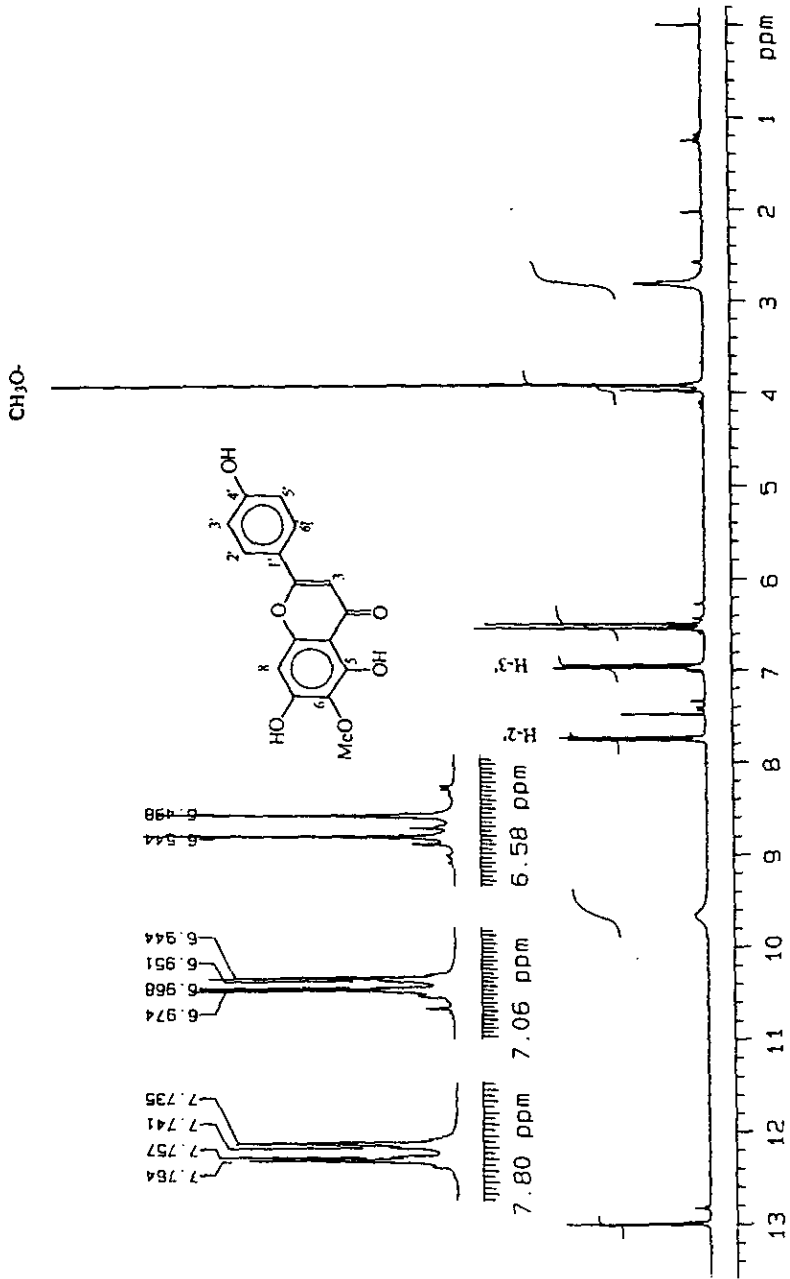
De esta manera, los resultados del presente estudio se pueden incorporar a los ya informados en la literatura, contribuyendo así al conocimiento químico y biológico de estas dos especies vegetales, ya que los triterpenos pentacíclicos (ácido oleanólico y ursólico) y los esteroides (β -sitosterol y β -D-glucósido del β -sitosterol) no habían sido informados como constituyentes químicos del género *Aloysia* (*Lippia*). Cabe mencionar que en la literatura se ha informado la presencia de las mismas en diversas familias (Compositae, Labiatae, Rosaceae, Myrtaceae, entre otras). Además, de que es la primera vez que se hace un estudio químico y biológico de *Cirsium jorullense*. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no correlacionan directamente con el uso popular de las plantas objetos de estudio, debido a la ausencia de alguna actividad biológica notable en los bioensayos realizados. Cabe mencionar, que existen diversas posibilidades de evaluar las propiedades biológicas de las plantas de aquí que tengan que ensayarse otros métodos que permitan establecer una correlación.

VI. ESPECTROS.

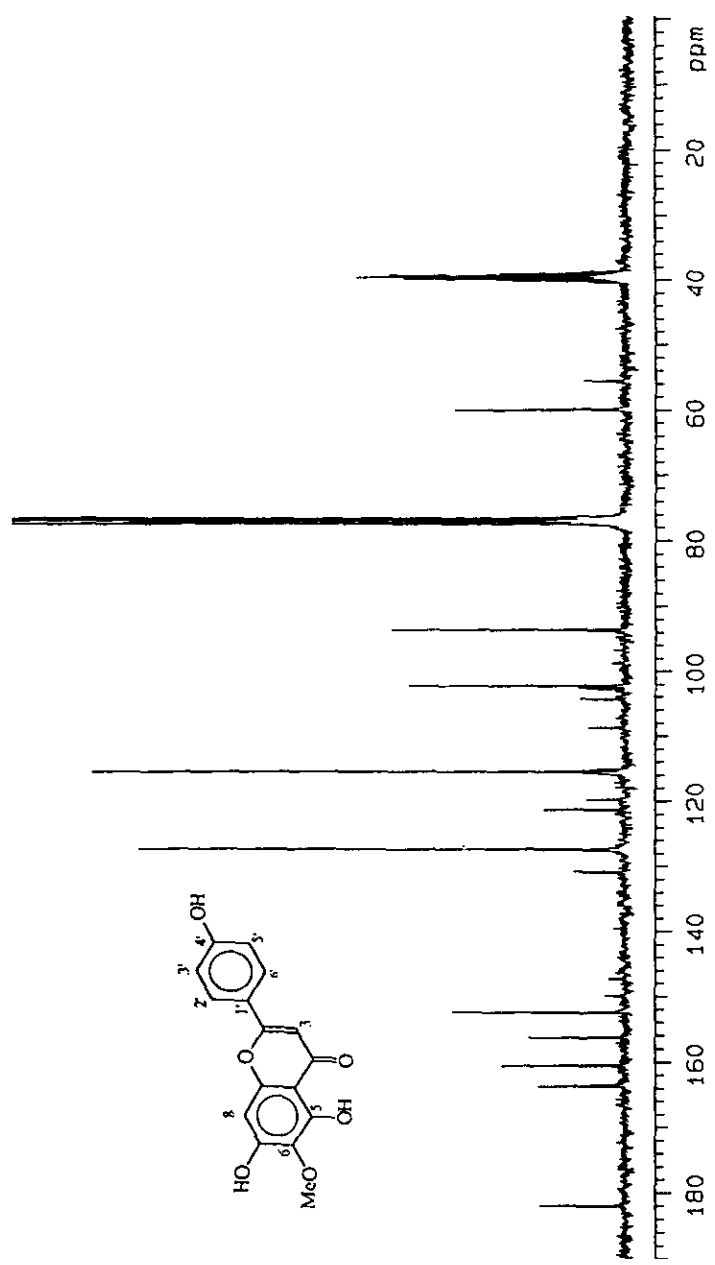
ESPECTRO I. IR (SUSPENSIÓN) DE LA HISPIDULINA (II).



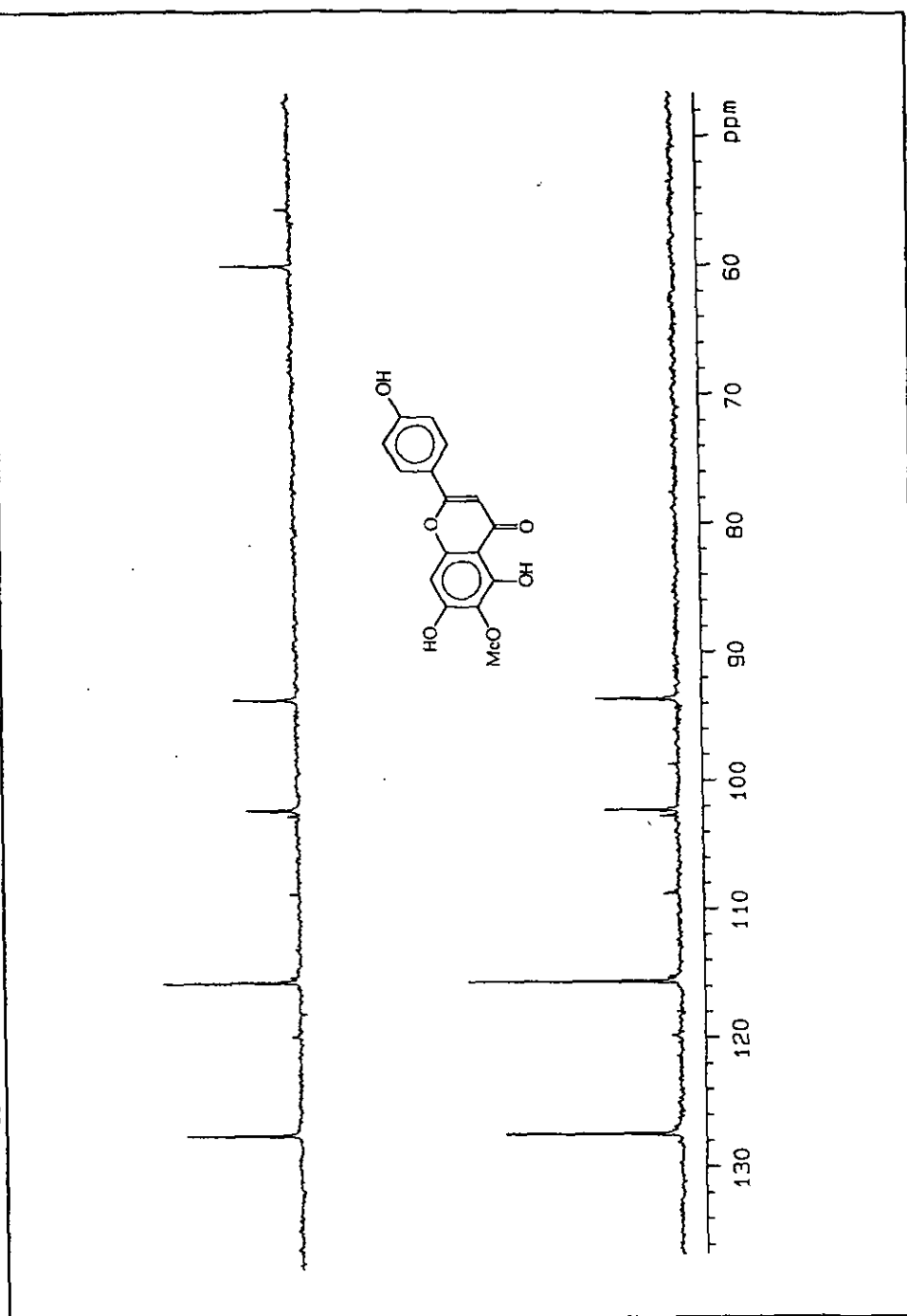
ESPECTRO 2. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) DE LA HISPIDULINA (111).



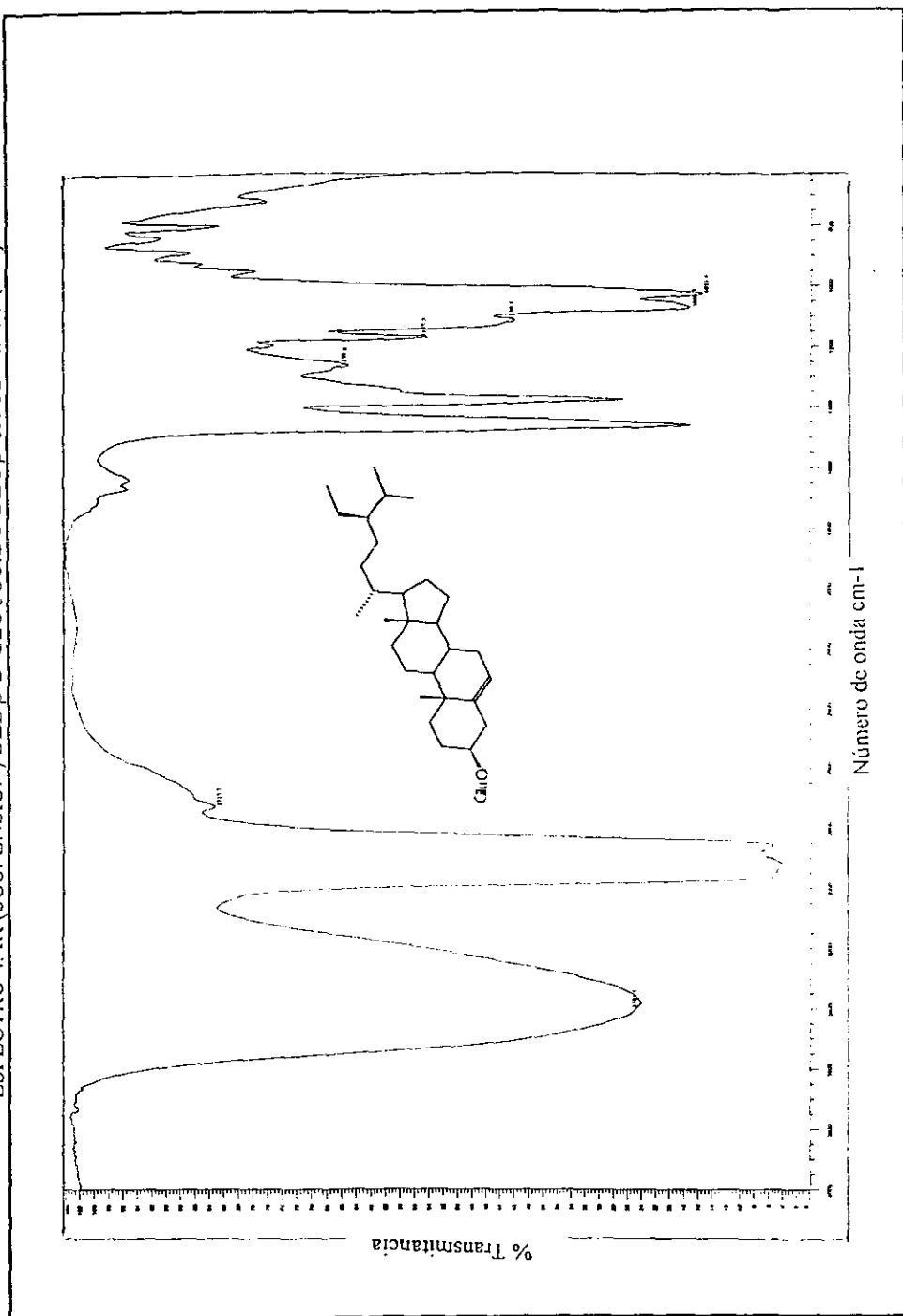
ESPECTRO 3. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) DE LA HISPIDULINA (III).



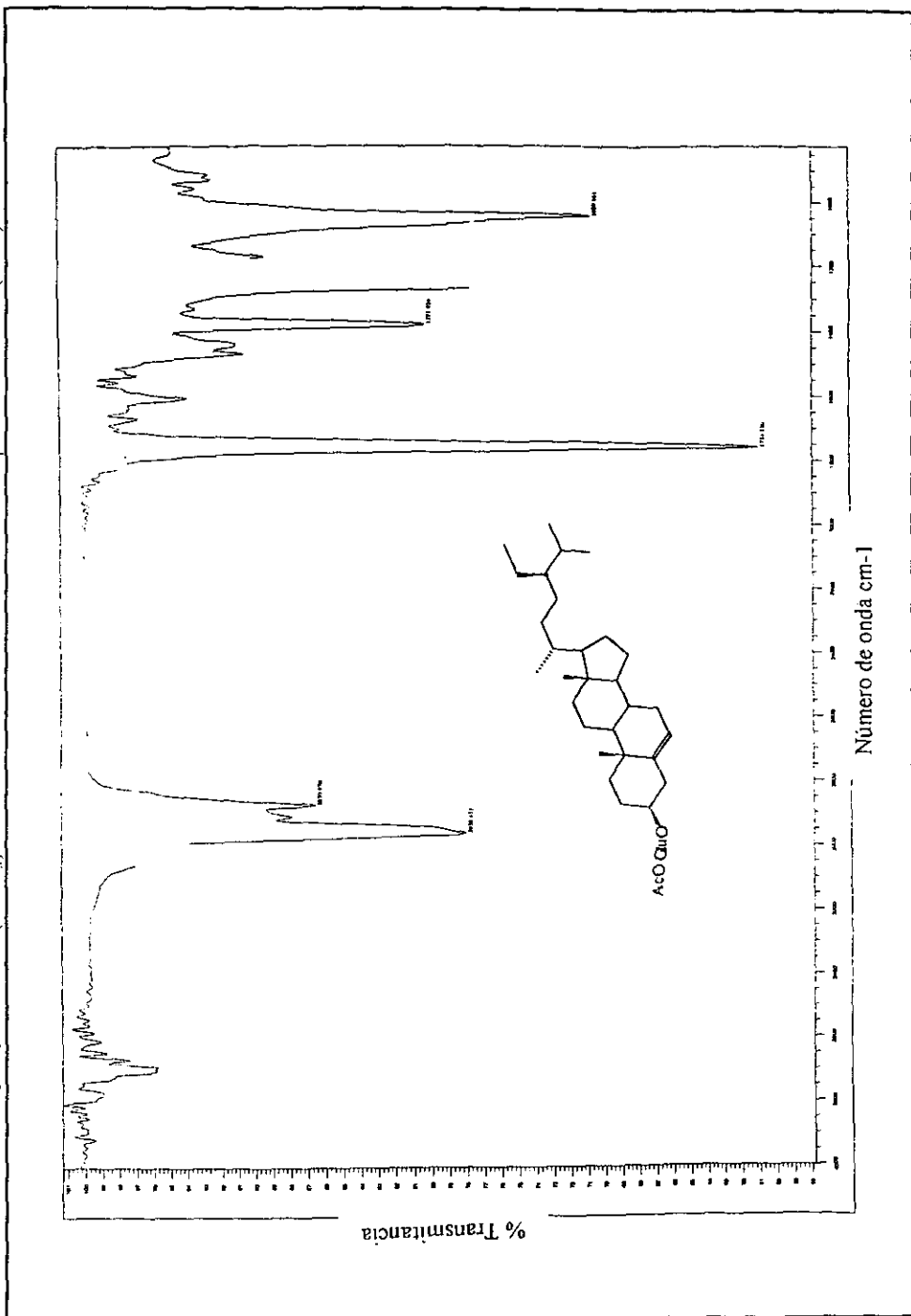
ESPECTRO 3a. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, DMSO, TMS) APT DE LA HISPIDULJNA (11).



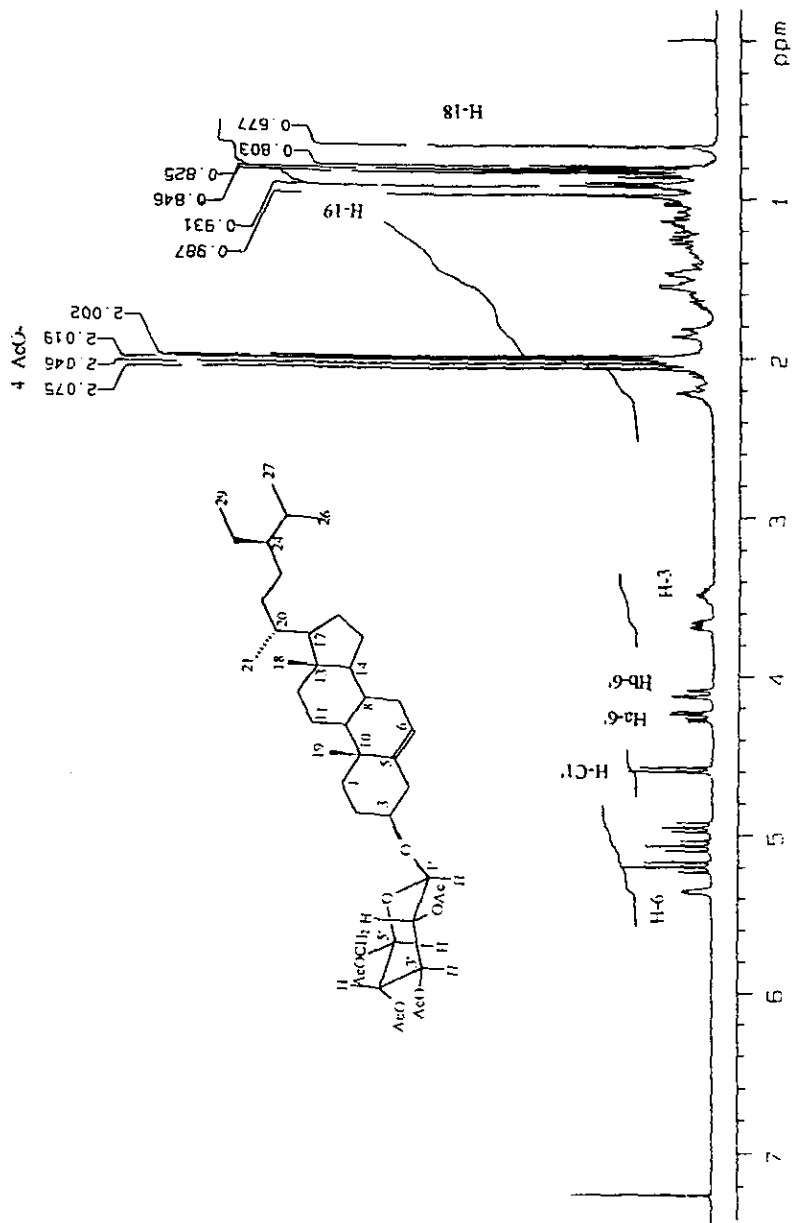
ESPECTRO 4. IR (SUSPENSIÓN) DEL β -D-GLUCÓSIDO DEL β -SITOSTEROL (176).



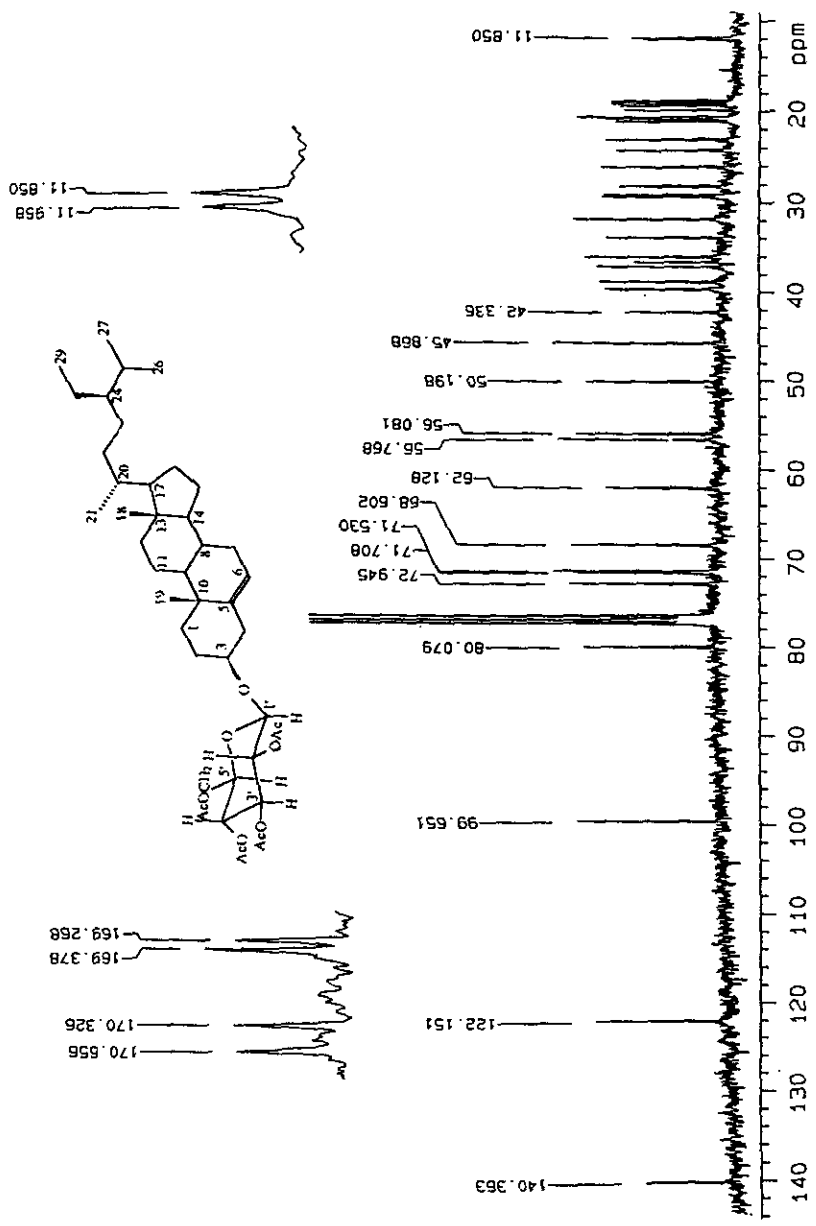
ESPECTRO 5. IR (CHCl₃) DEL PER ACETIL-GLUCÓSIDO DEL β-SITOSTEROL (176a)



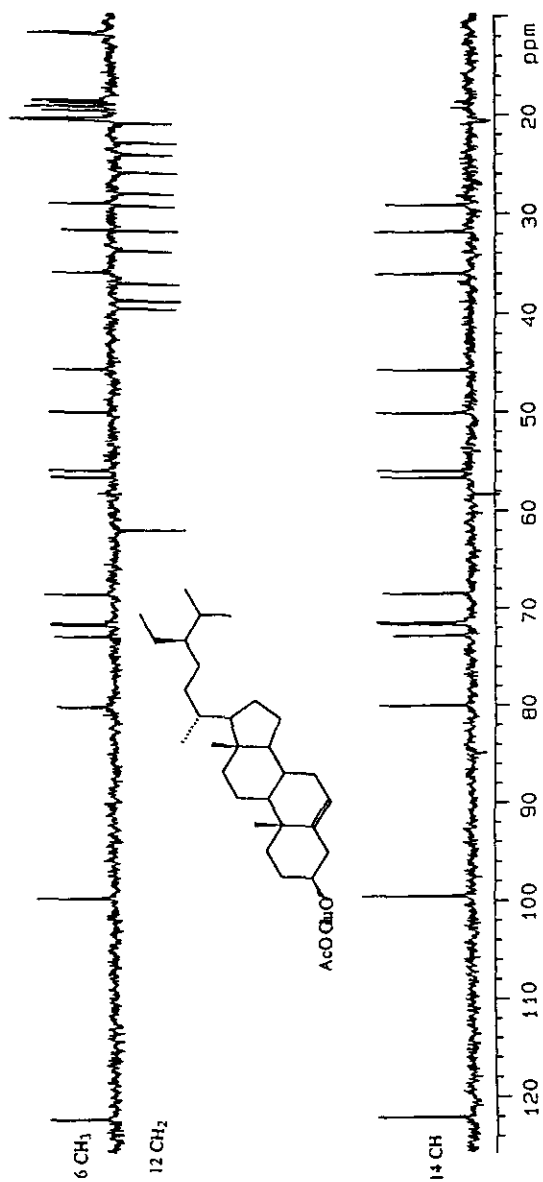
ESPECTRO 6. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DEL *PER* ACETIL-GLUCÓSIDO DEL β-SITOSTEROL (176a).



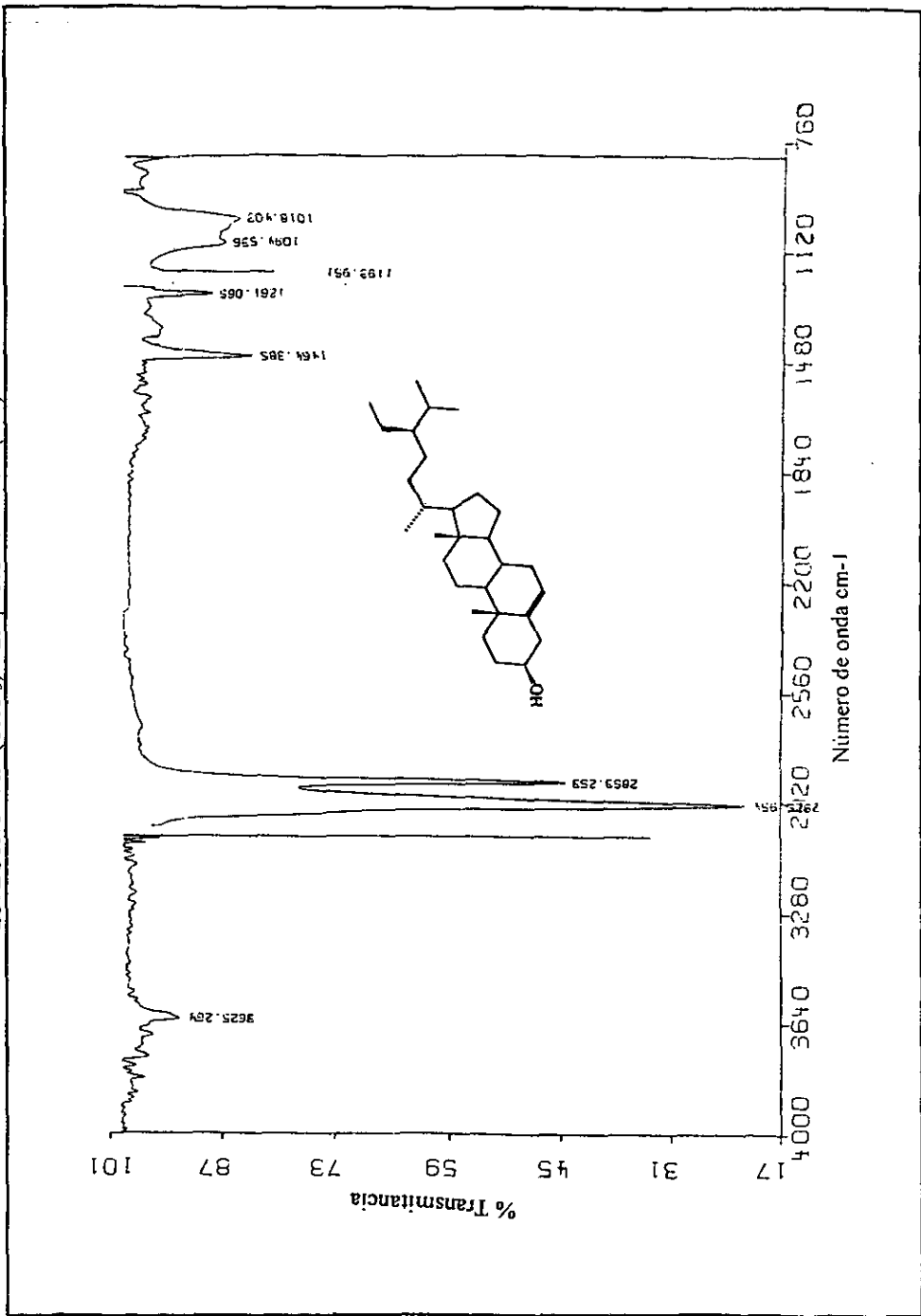
ESPECTRO 7. RMN. ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DEL PER ACETIL-GLUCÓSIDO DEL β-SITOSTEROL (176a).



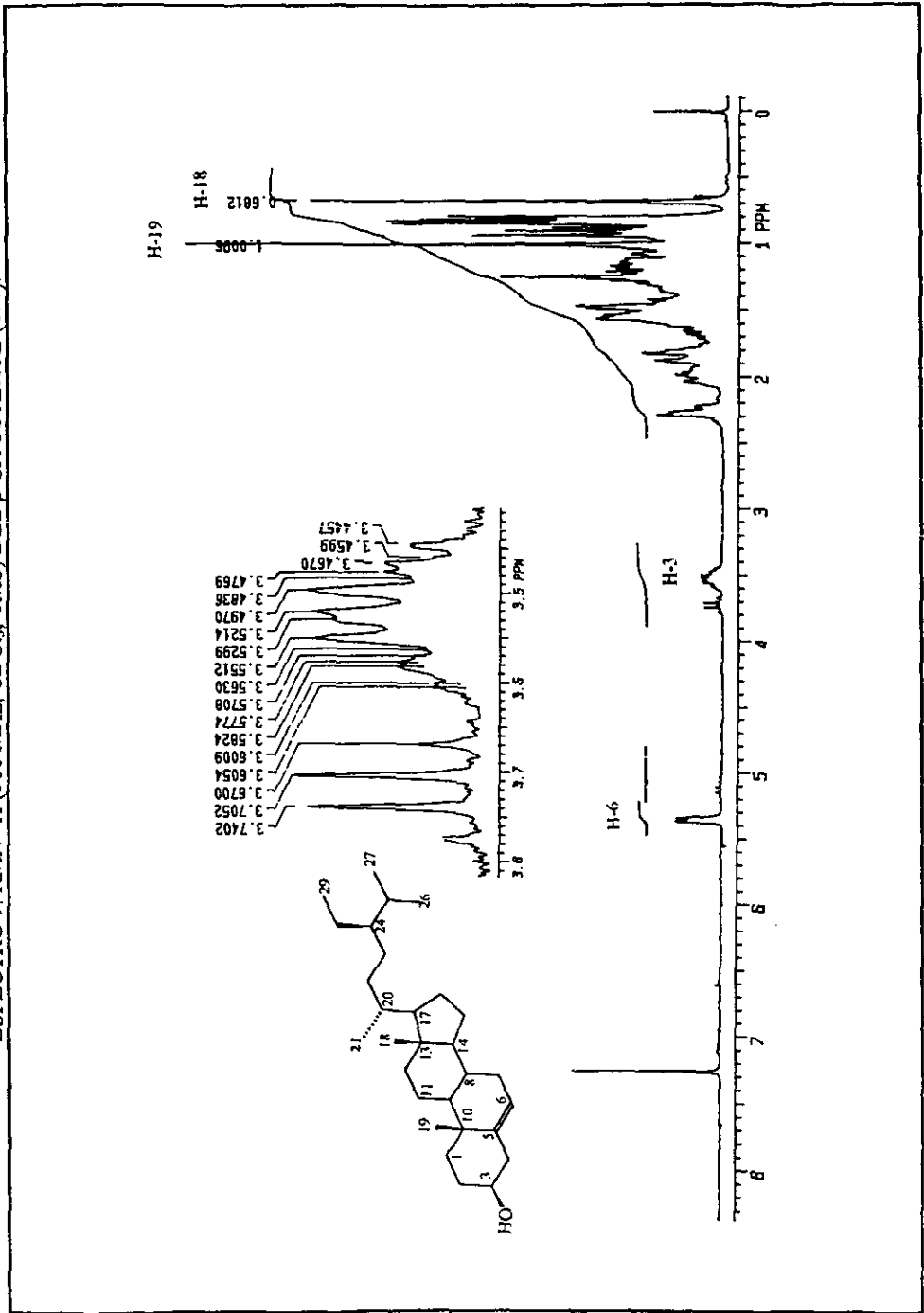
ESPECTRO 7a. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) APT, *17β*-ACETIL-GLUCÓSIDO DEL β-SITOSTEROL (176a).



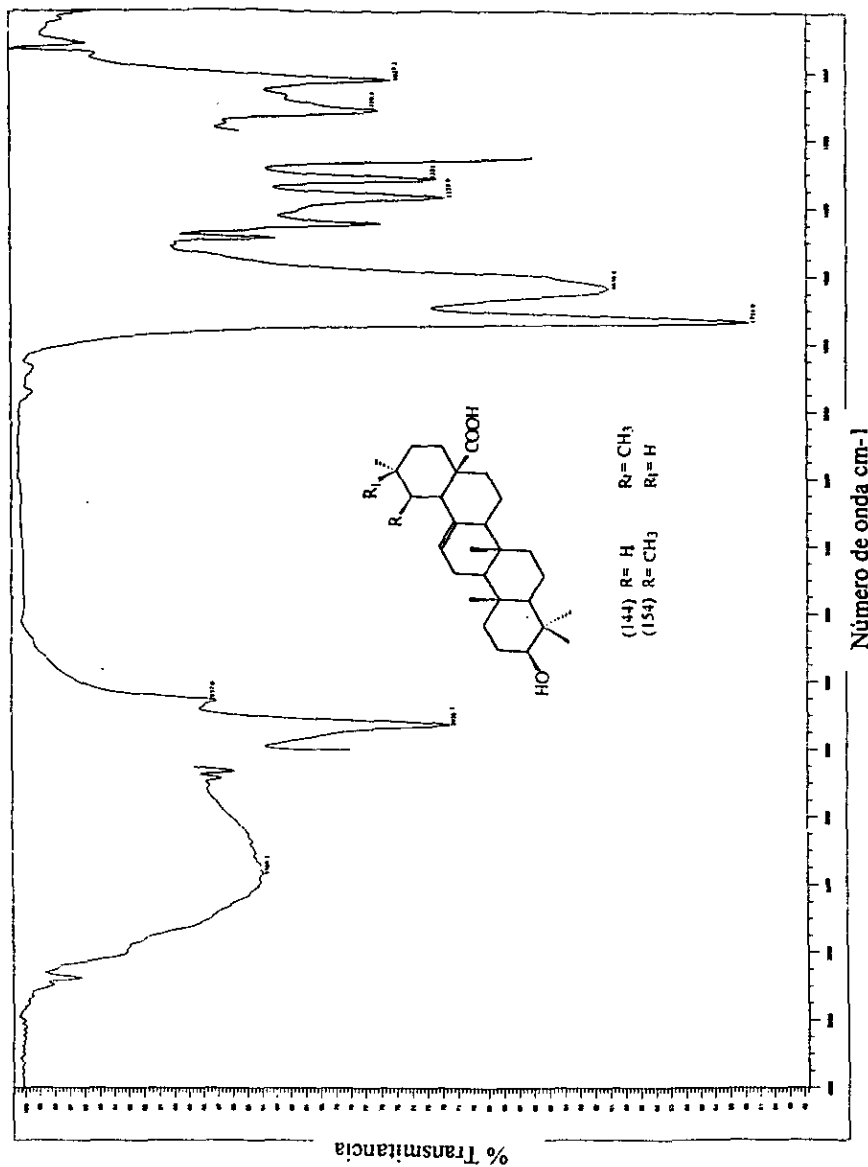
ESPECTRO 8. IR (CHCl₃) DEL β-SITOSTEROL (177).



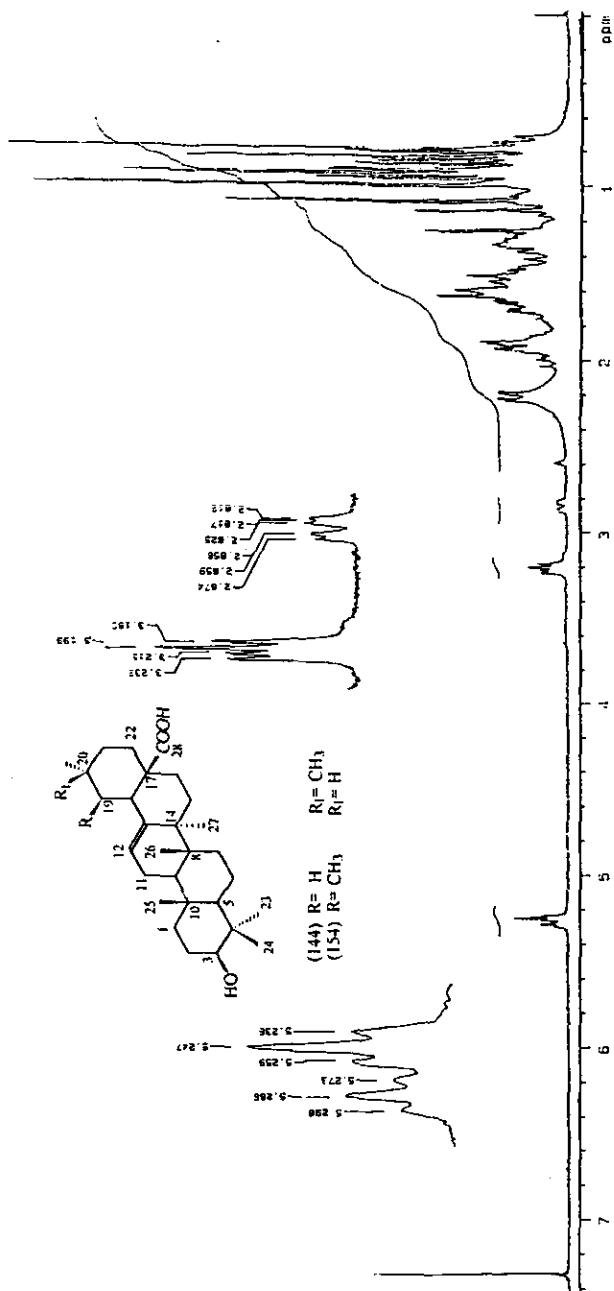
ESPECTRO 9. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DEL β-SITOSTEROL (177).



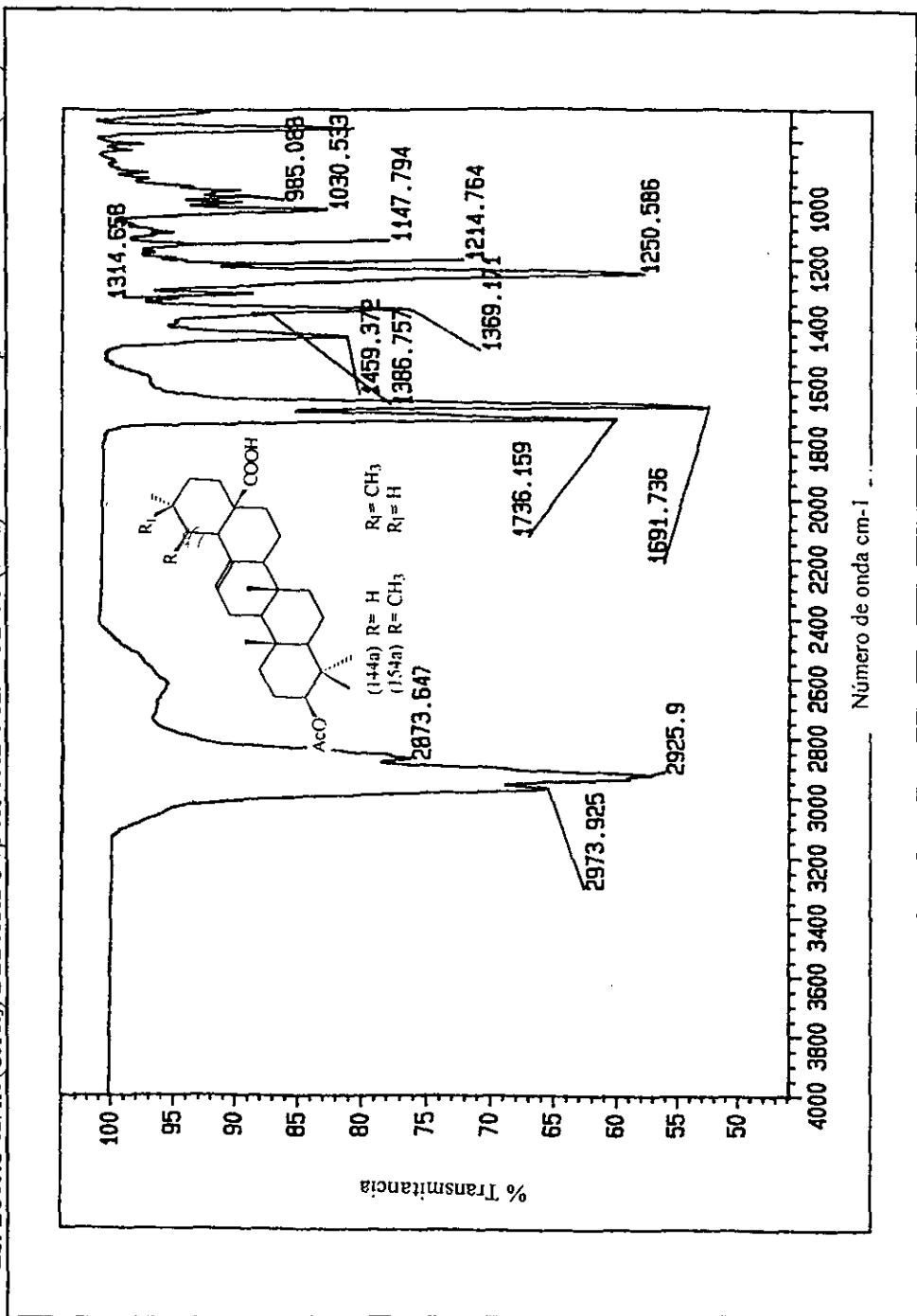
ESPECTRO IR. IR (CHCl₃) DEL ÁCIDO OLEANÓLICO (144) Y EL ÁCIDO URSÓLICO (154).



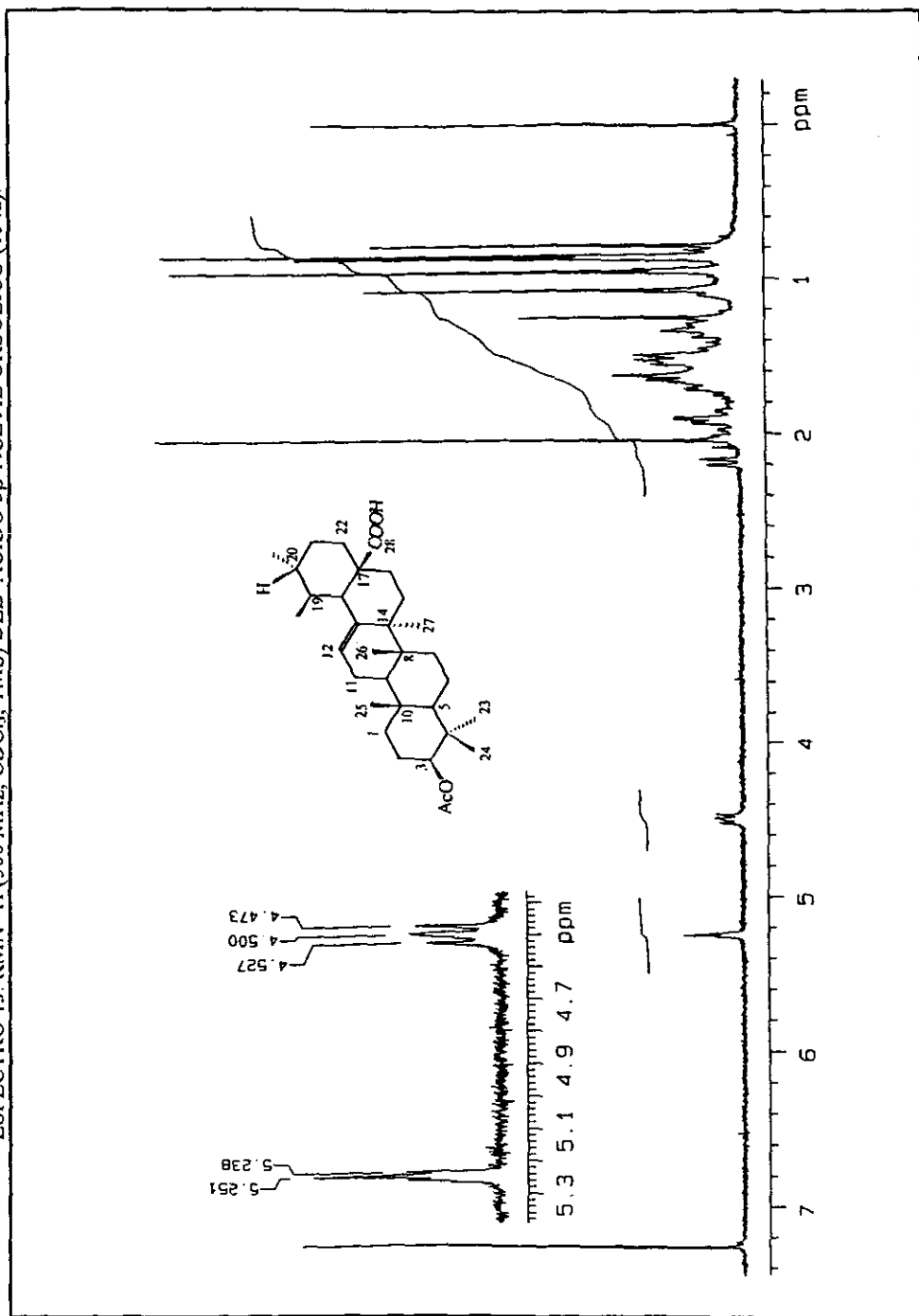
ESPECTRO 11. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DEL ÁCIDO OLEANÓLICO (144) Y EL ÁCIDO URSÓLICO (154).



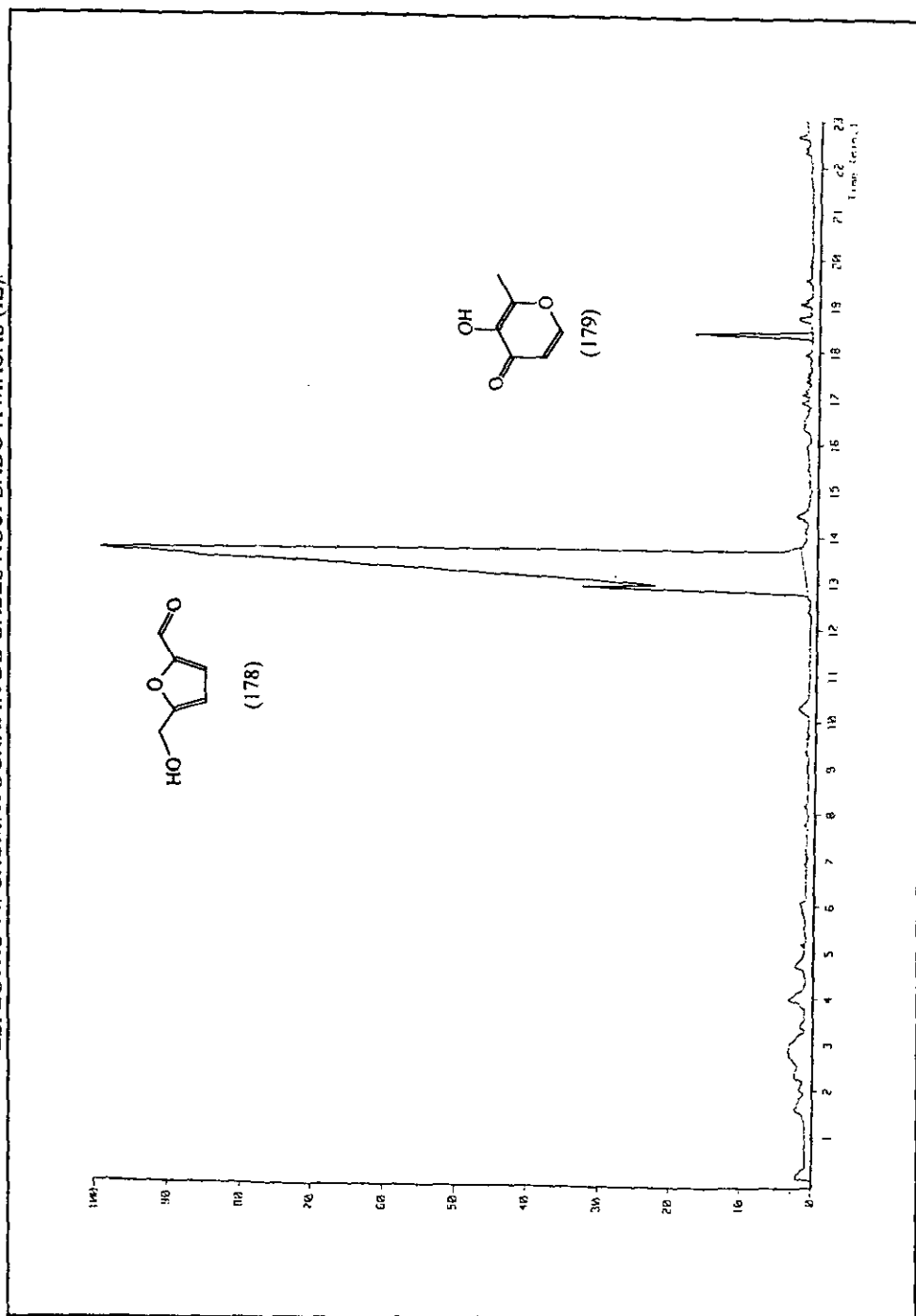
ESPECTRO 12. IR (CHCl₃) DEL ÁCIDO 3 β -ACETIL OLEANÓLICO (144a) Y EL ÁCIDO 3 β -ACETIL URSÓLICO (154a).



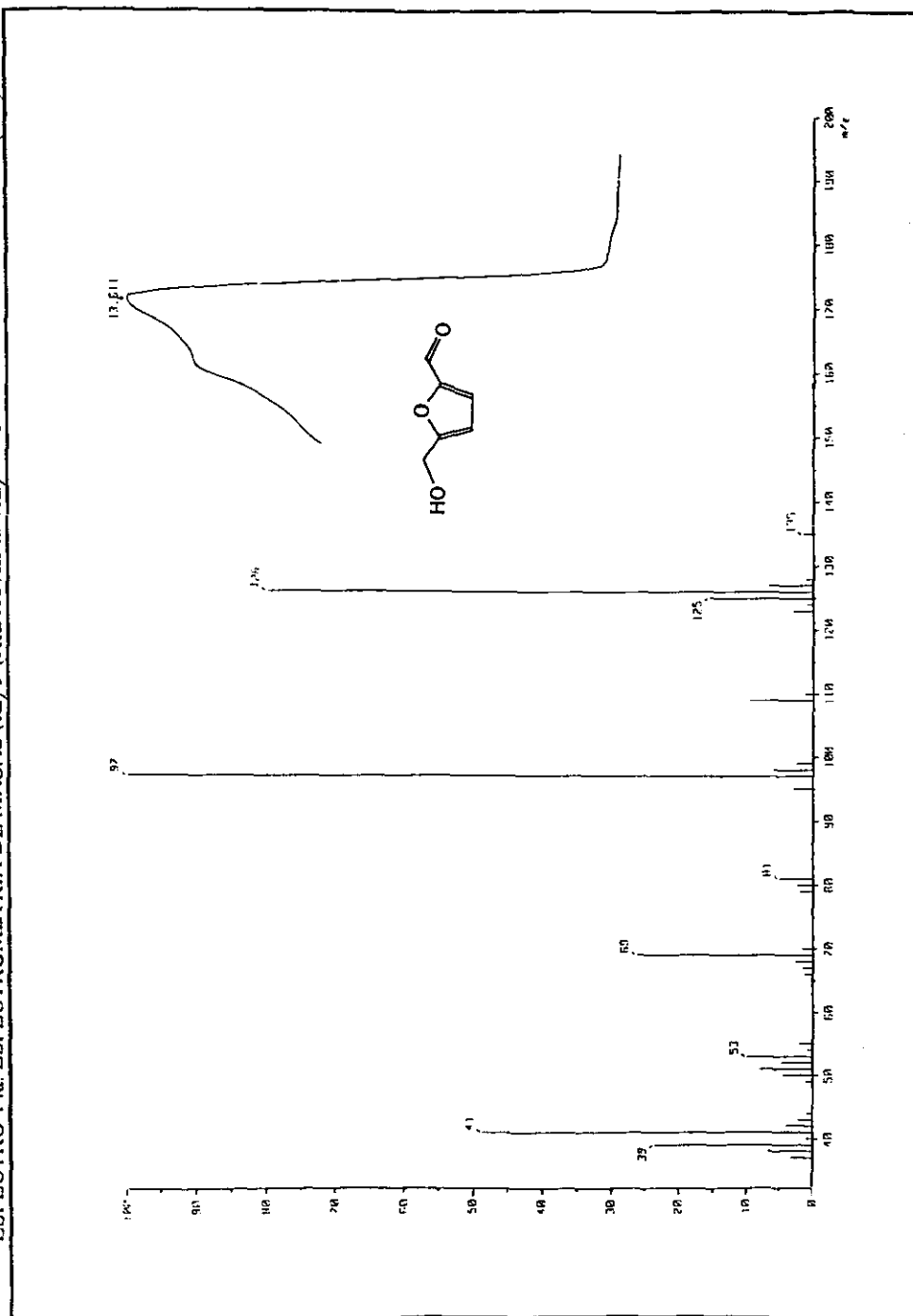
ESPECTRO 13. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DEL ÁCIDO 3β-ACETIL URSÓLICO (154a).



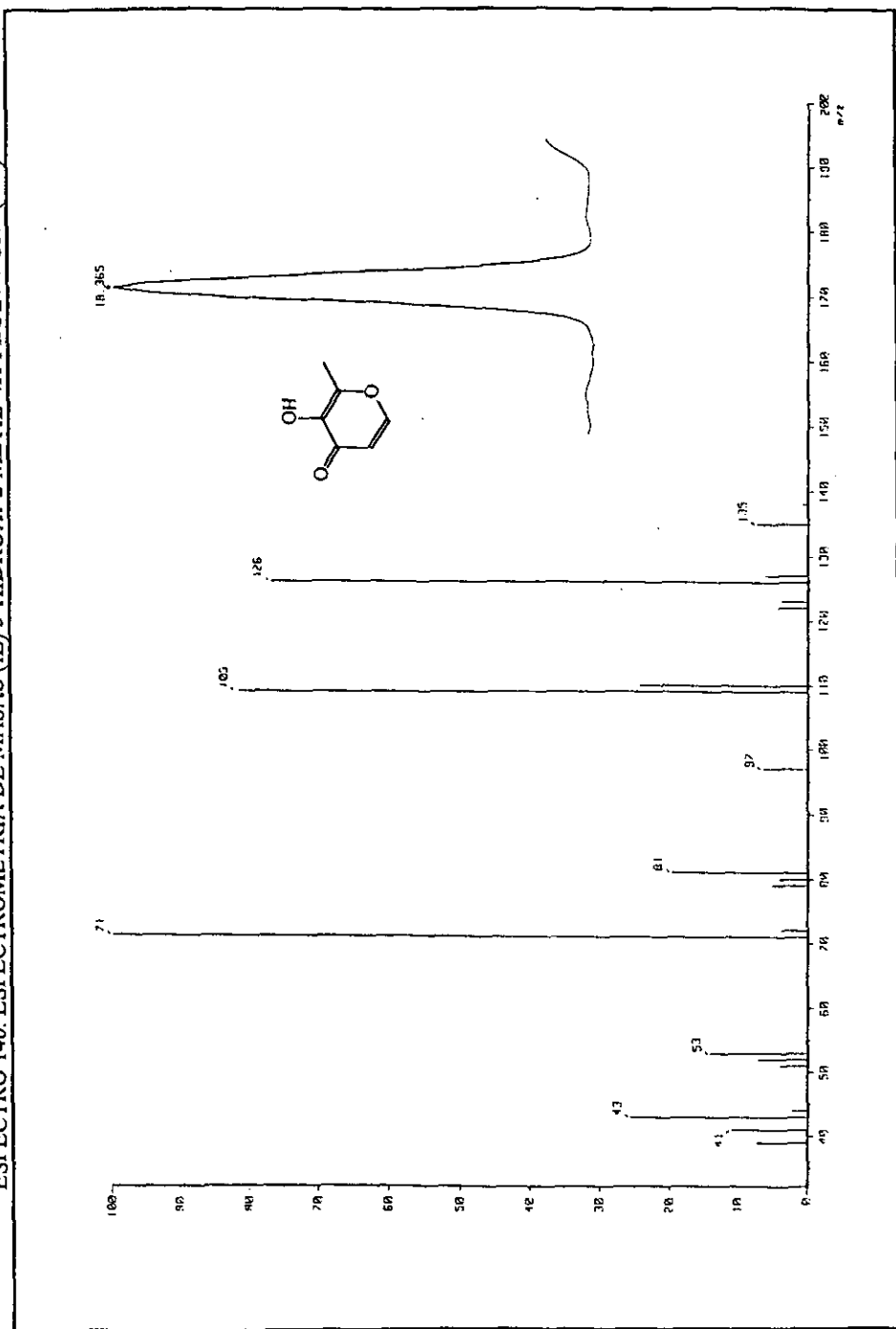
ESPECTRO 14. CROMATOGRFIA DE GASES ACOPLADO A MASAS (IE).



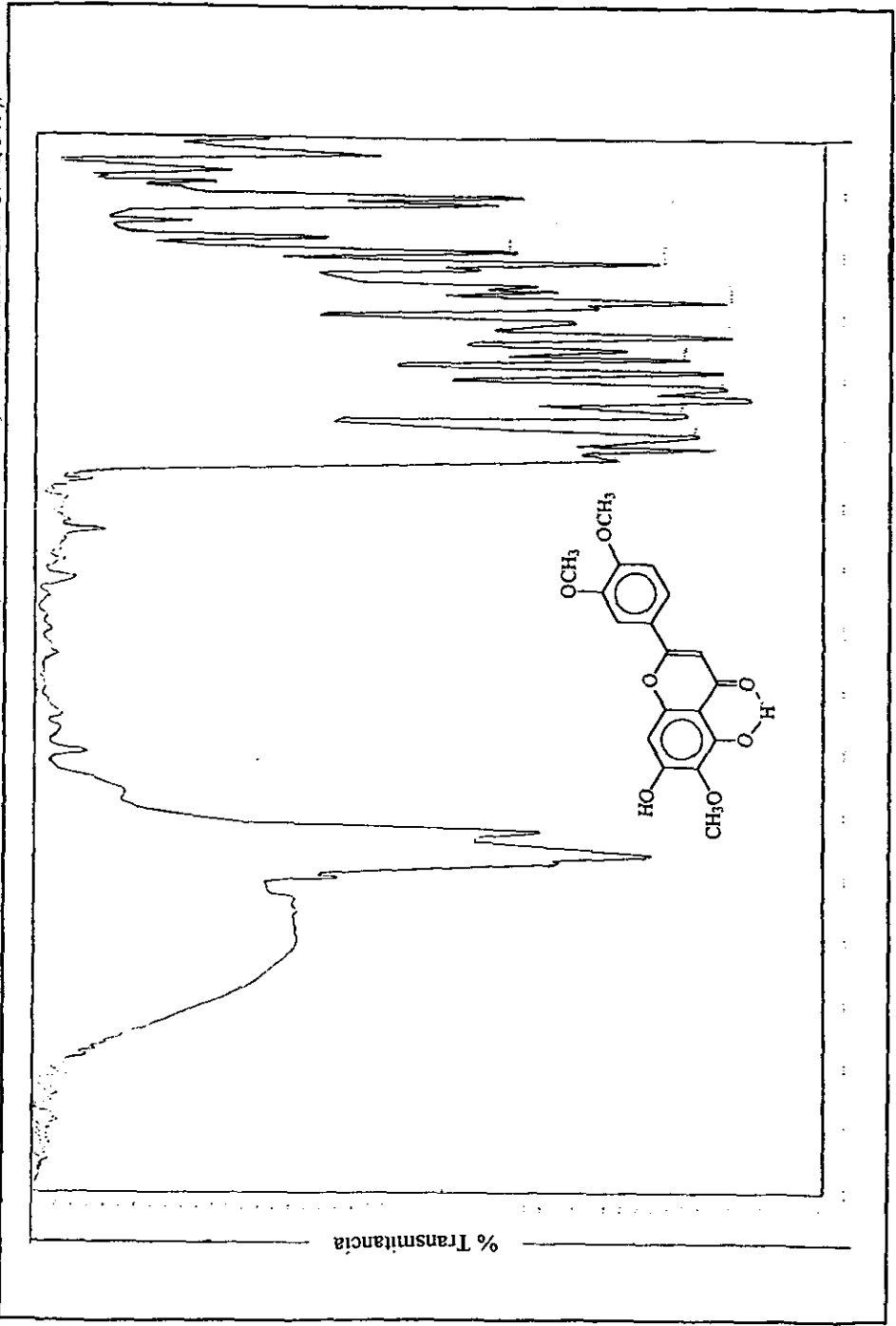
ESPECTRO 14a. ESPECTROMETRIA DE MASAS (IE) 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURANOCARBOXALDEHIDO (178).



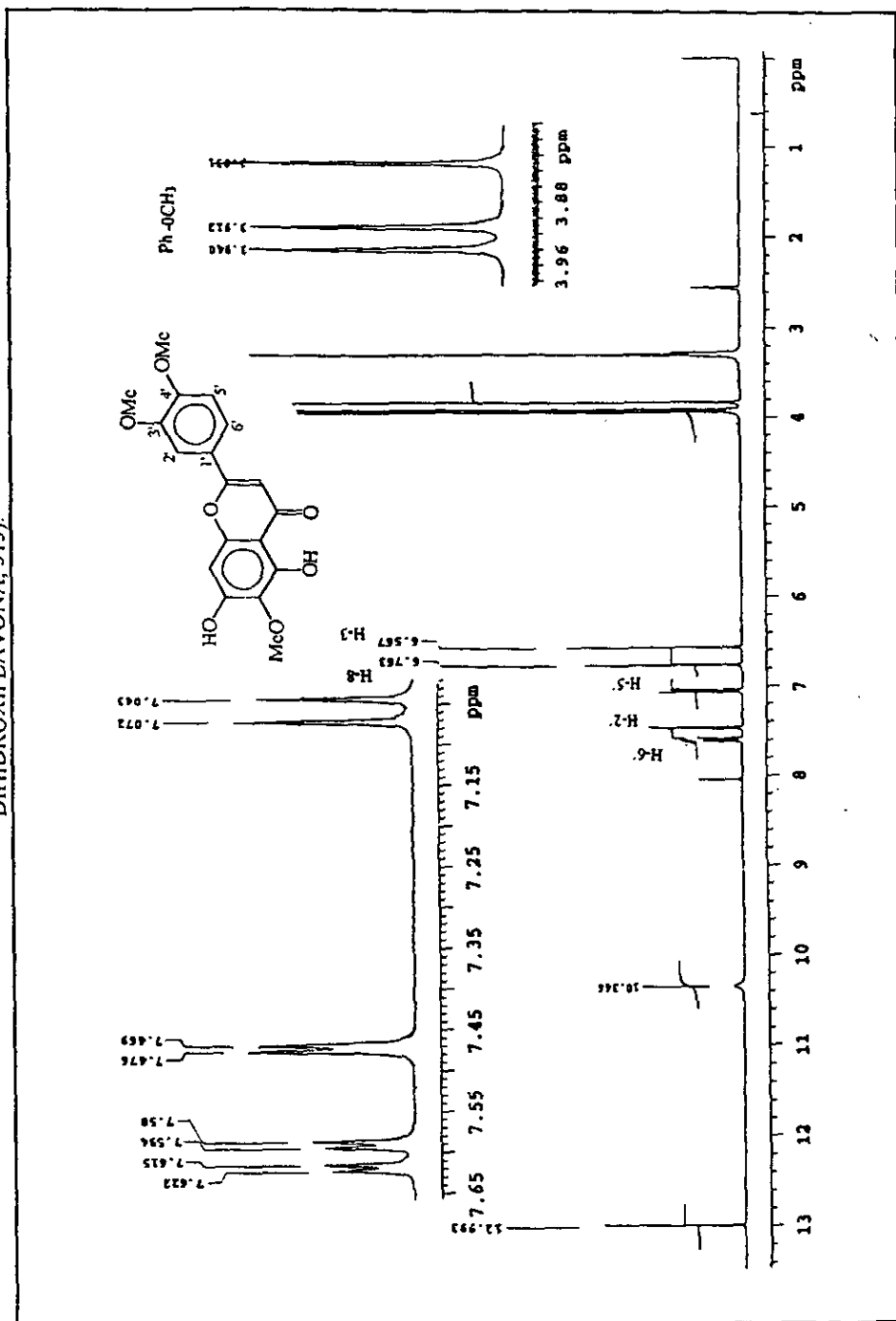
ESPECTRO 14b. ESPECTROMETRIA DE MASAS (IE) 3-HIDROXI-2-METIL-4H-PIRAN-4-ONA(179).



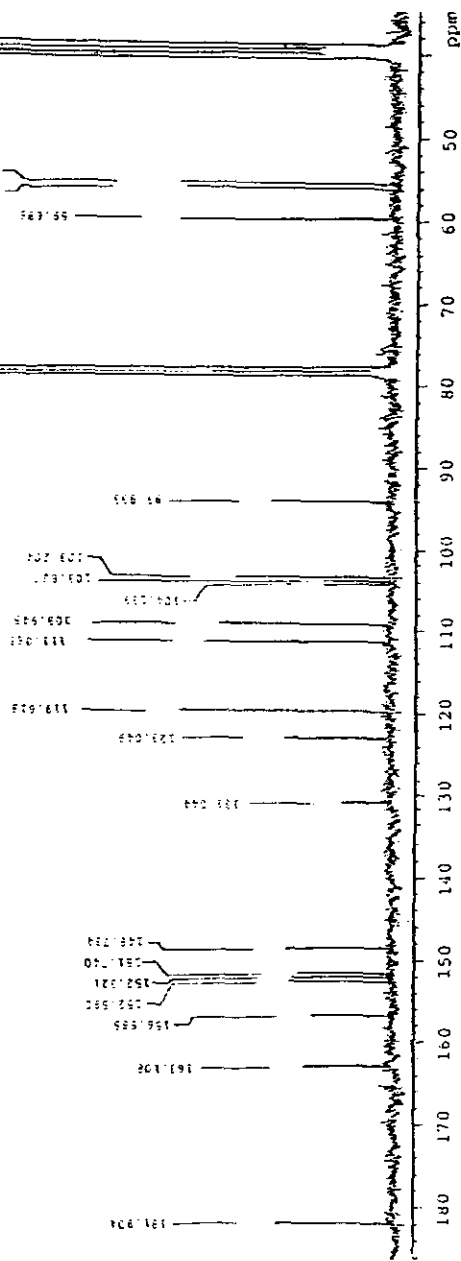
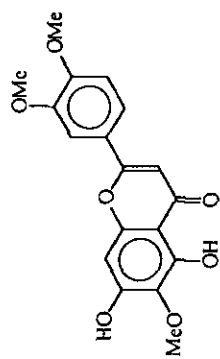
ESPECTRO IR (SUSPENSIÓN) DE LA EUPATILINA (6,3',4'-TRIMETOXI-5,7-DIHIIDROXIFLAVONA, 313).



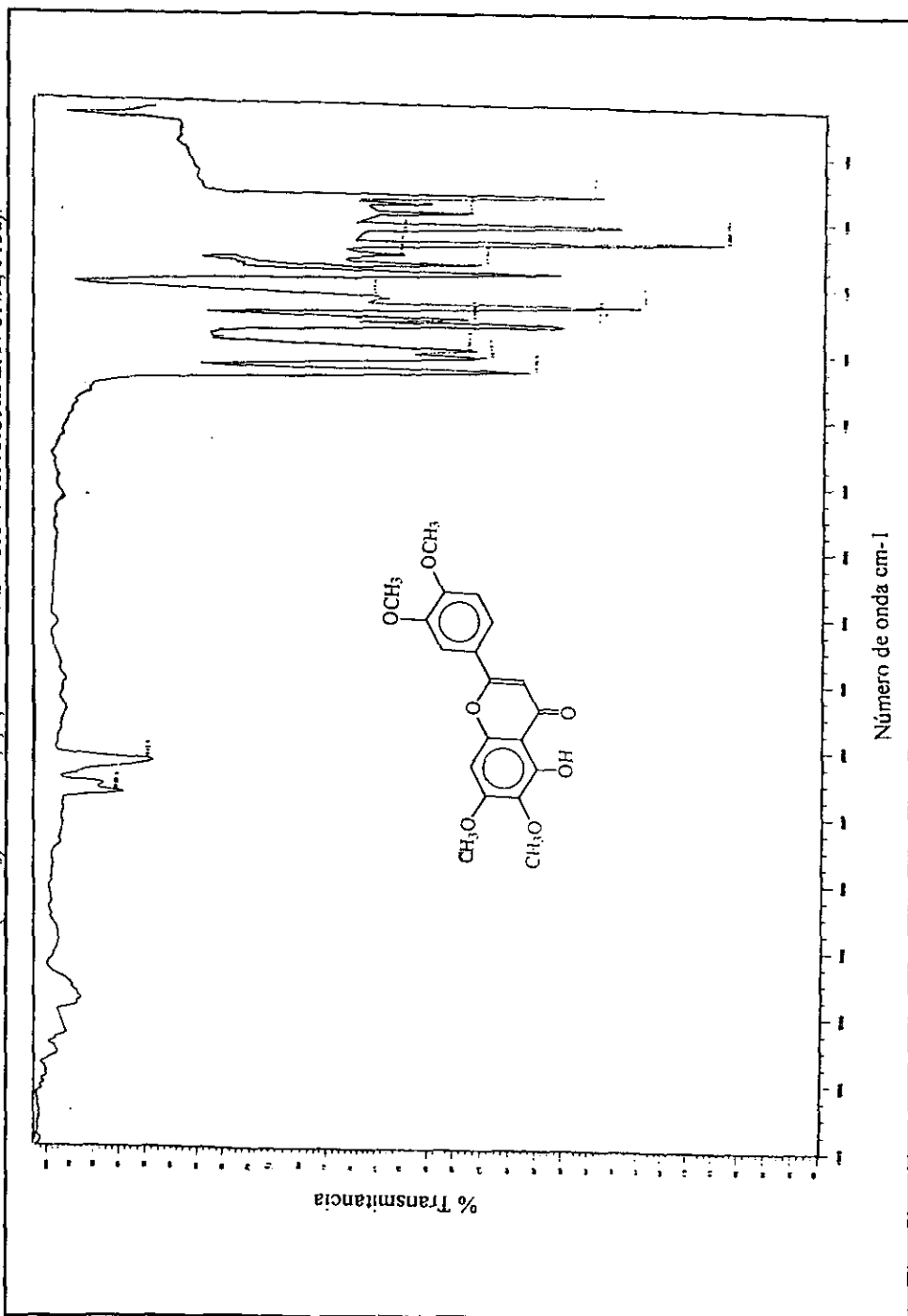
ESPECTRO 16. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) DE LA EUPATILINA (6,3',4'-TRIMETOXI-5,7-DIHIDROXIFLAVONA, 313).



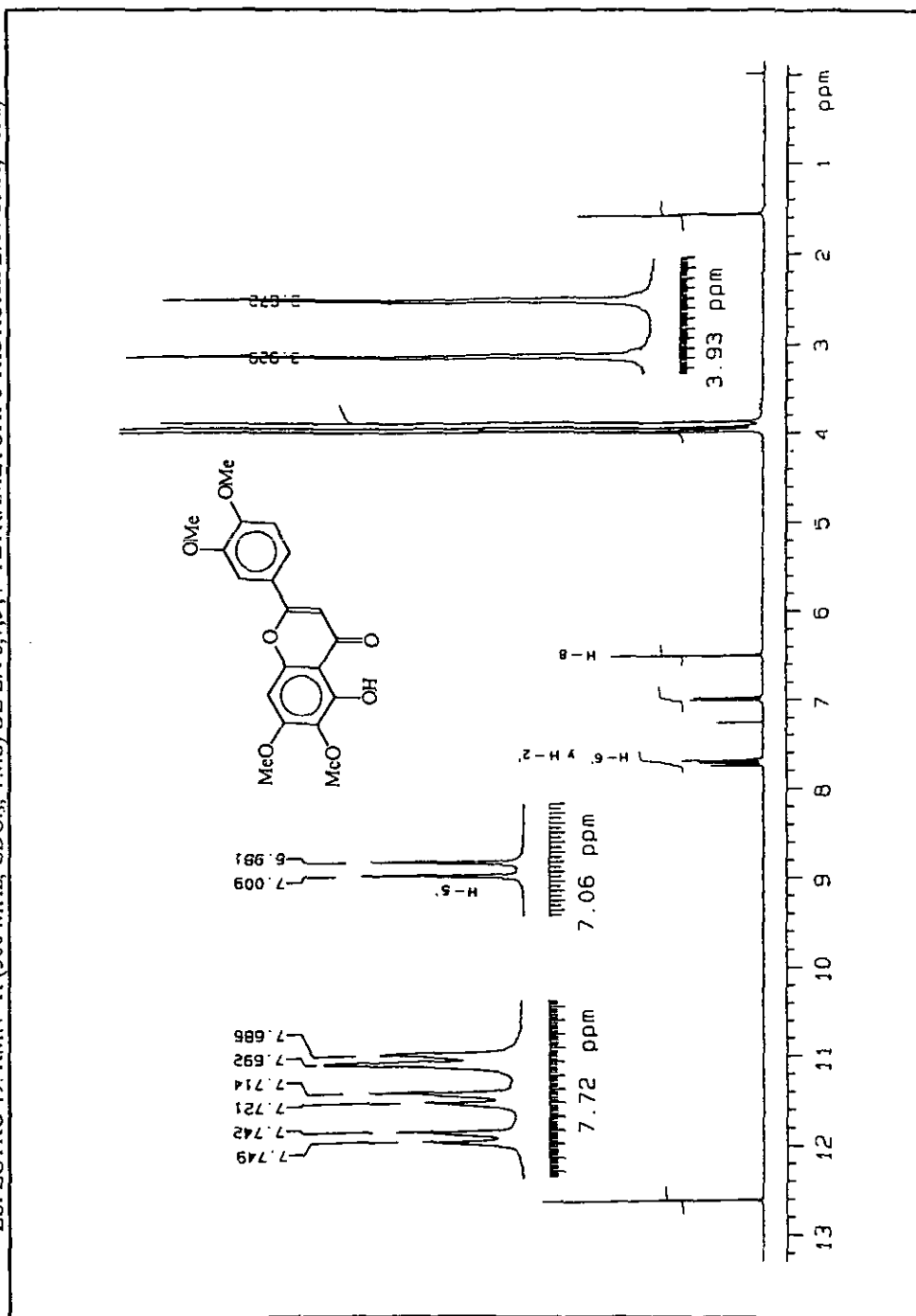
ESPECTRO 17. RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 + DMSO , TMS) DE LA EUPATILINA (6,3',4'-TRIMETOXI-5,7-DIHIDROXIFLAVONA, 313).



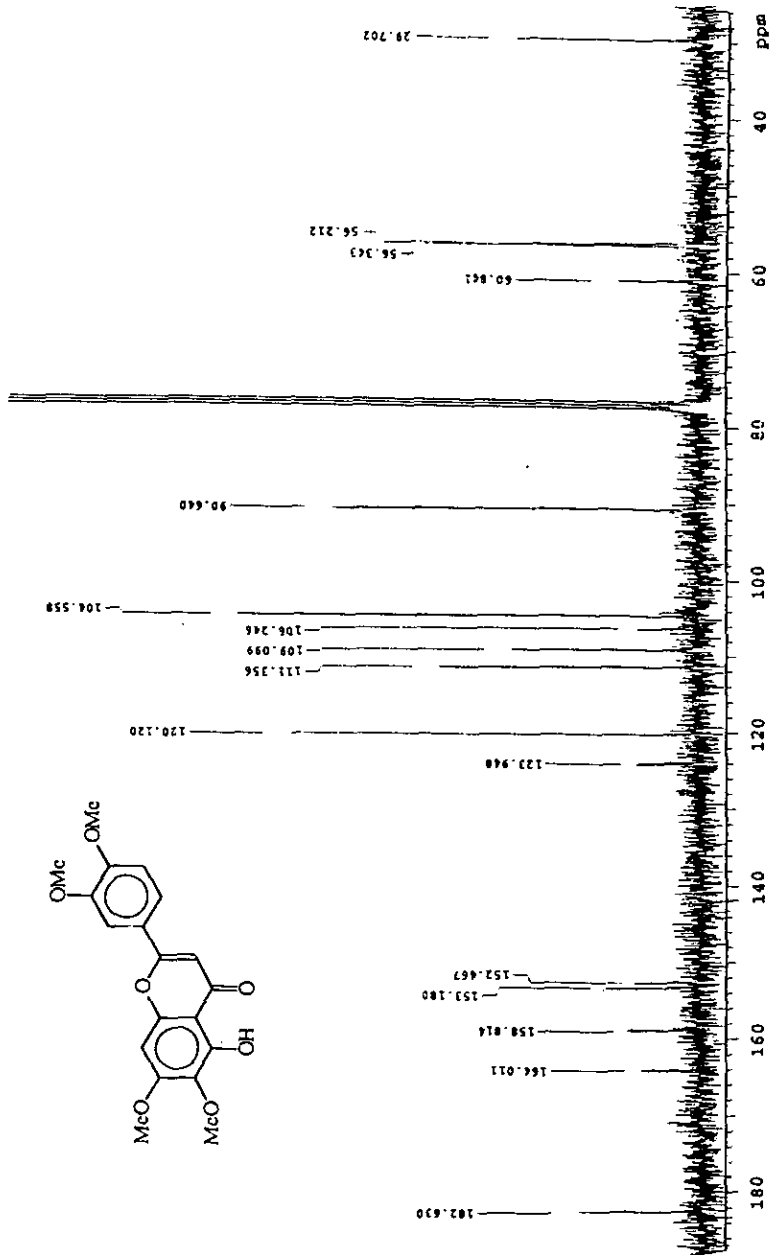
ESPECTRO IR. IR (CHCl₃) DE LA 6,7,3',4'-TETRAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 313a).



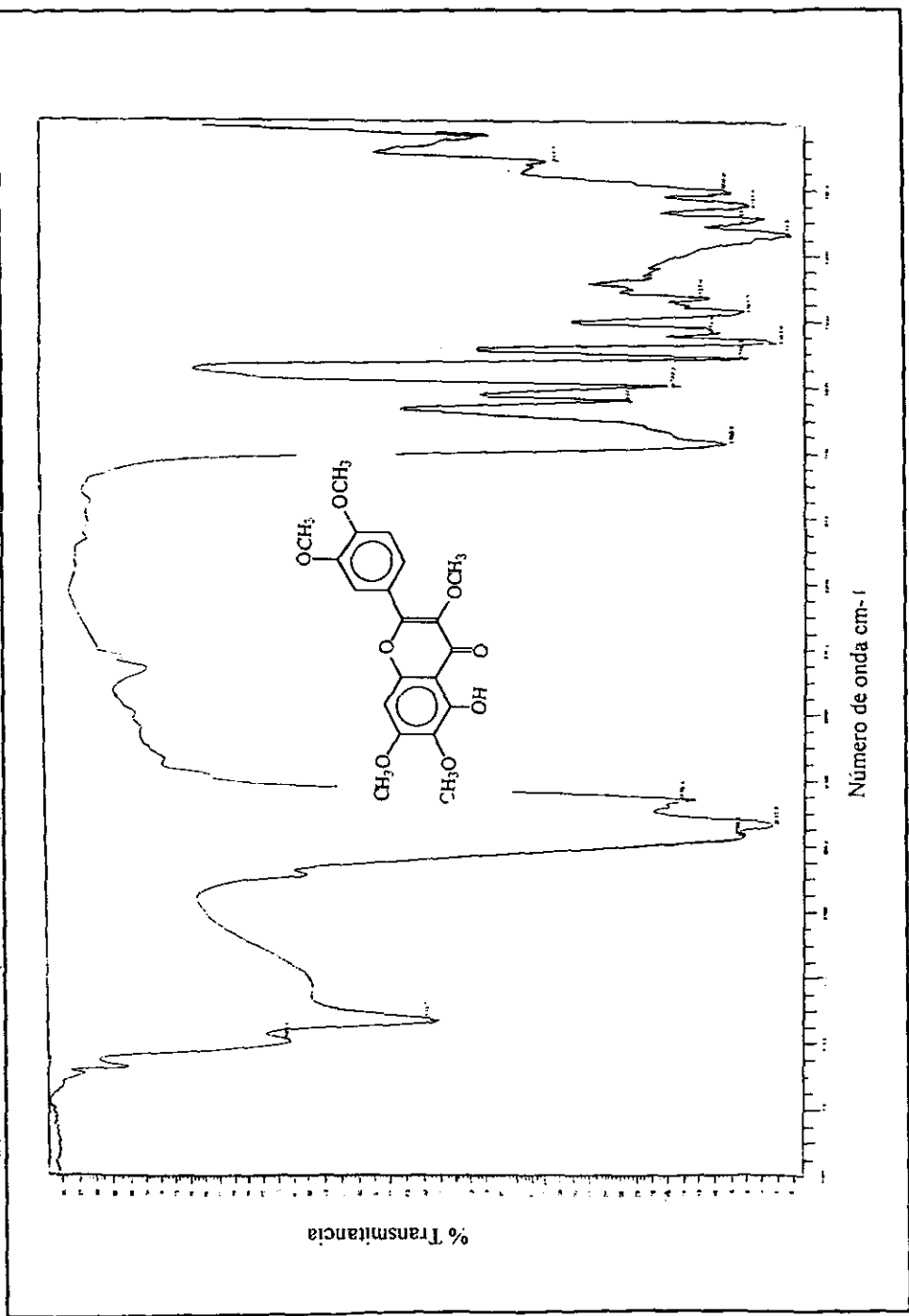
ESPECTRO 19. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 6,7,3',4'-TETRAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 313a)



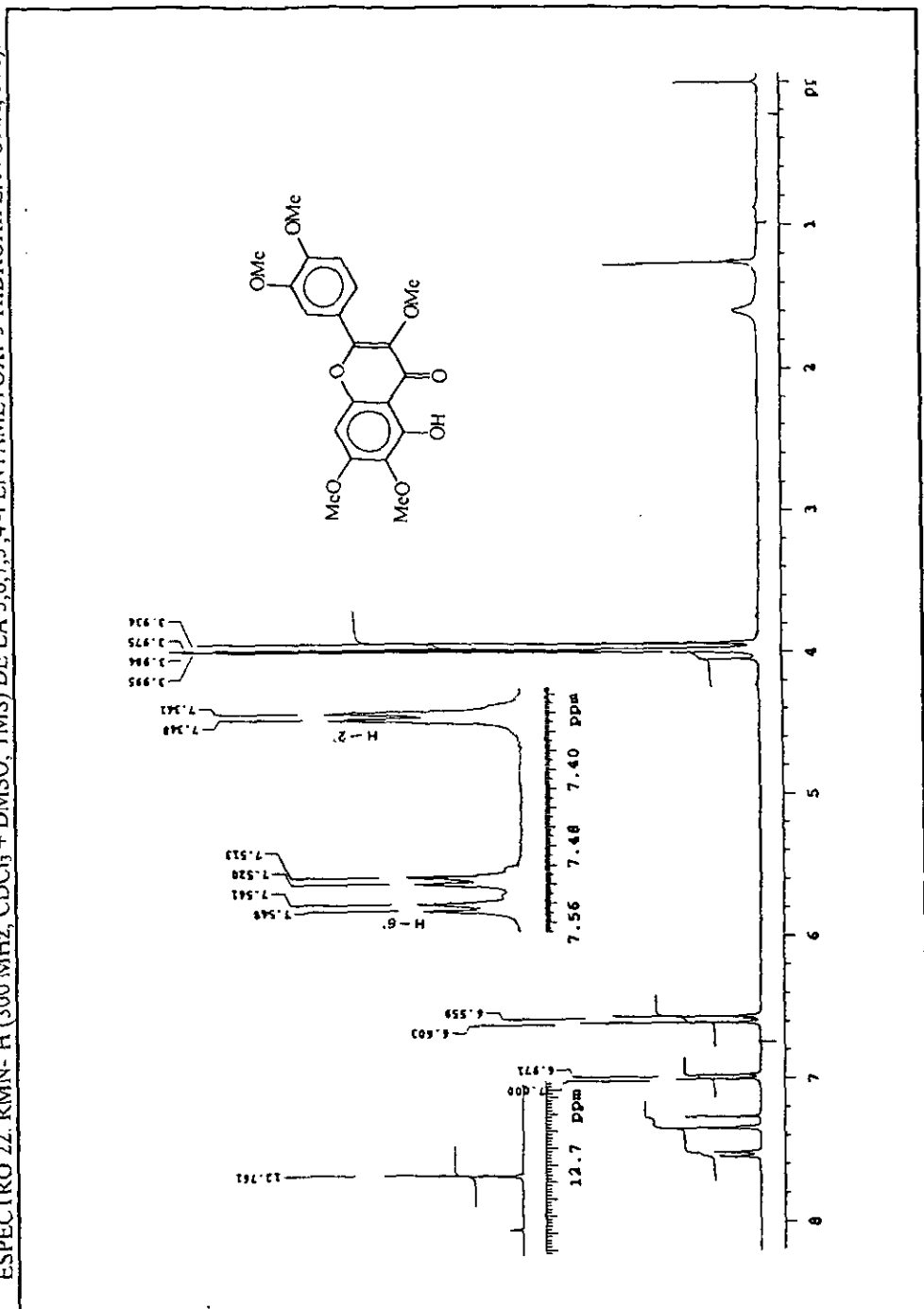
ESPECTRO 20. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) DE LA 6,7,3',4'-TETRAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 313a).



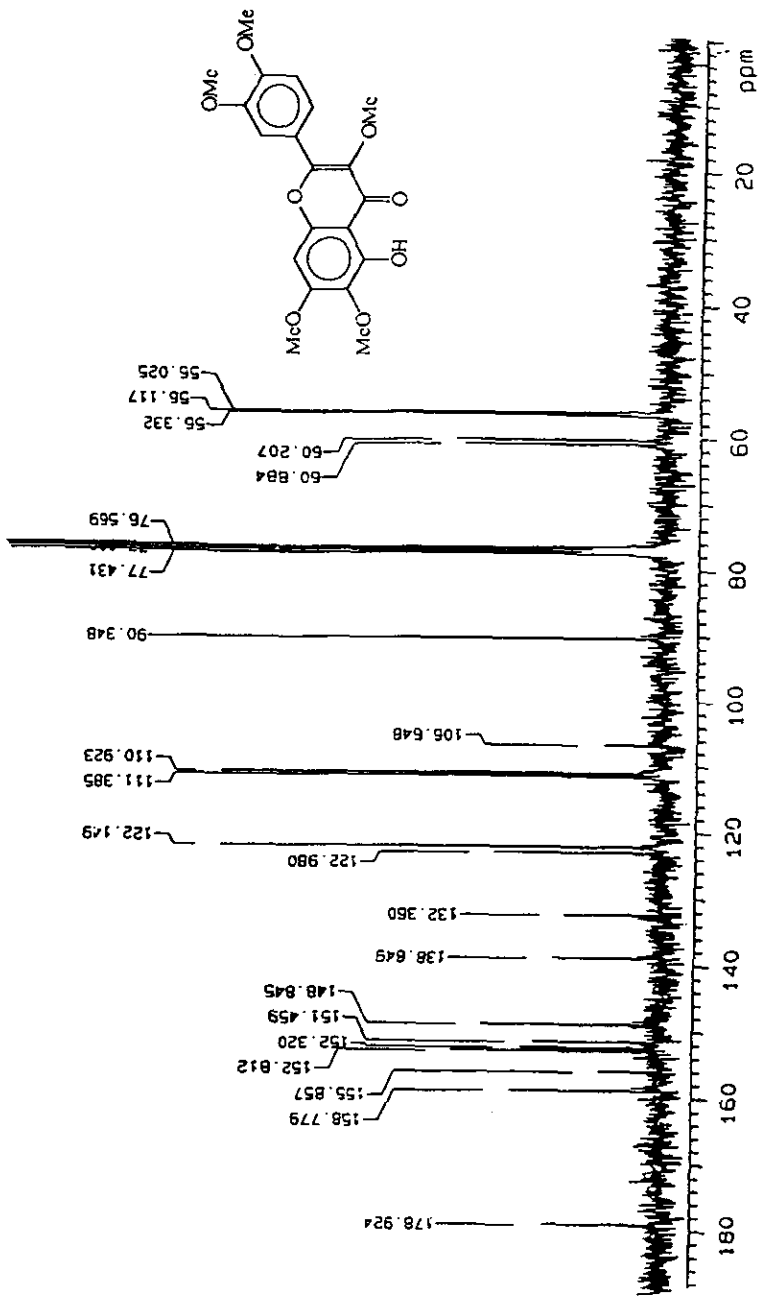
ESPECTRO 21. IR (SUSPENSIÓN) DE LA 3,6,7,3',4'-PENTAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 371).



ESPECTRO 22. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) DE LA 3,6,7,3',4'-PENTAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 371).



ESPECTRO 23. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃ + DMSO, TMS) DE LA 3,6,7,3',4'-PENTAMETOXI-5-HIDROXIFLAVONA, 371).



VII. BIBLIOGRAFÍA.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Samuelsson, G.; Bioassay-guided isolation of pharmacologically active compounds. *Revista Latinoamericana de Quimica*. **22**, 41-45 (1991).
2. Hamburger, M. and Hostettmann, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874 (1991).
3. Hostettmann, K., Marston, A. and Wolfender, J. L.; Strategy in the search for new biologically active plant constituents. *Phytochemistry of plant used in tradicional medicine*, Ed. Oxford University Press, Estados Unidos, 1-45 (1995).
4. Cordell, G.; Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* **40**, 1585-1612 (1995).
5. Mahato, B. S., Nandy, K. A. and Roy, G.; Triterpenoids. *Phytochemistry* **31**, 2199-2249 (1992).
6. Lozoya, X., Rivera-Arce, E. and Domínguez, F.; Phytopharmaceuticals and the medicine of the new century. *Symposium 3, IMSS-Farmasa Schawebe, The Phytopharmaceuticals of the next century*, México, 19-32 (1999).
7. Cronquist, A.; *An integrated system of classification of flowering plants*. Ed. Columbia University, Press, USA, 1-20, 851-855, 911-912, 920-924, 1020-1028 (1981).
8. Cronquist, A.; *The evolution and classification of flowering plants*, 2^a ed. Ed. The New York Botanical Garden, USA, 261-267, 413-417, 425-427, 446-448.
9. López-Palacios, S.; *Flora de Venezuela*, Ed. Universidad de los Andes, Venezuela, 9-11, 180, 184, 416-417 (1977).
10. Evans, W. CH.; *Farmacognosia*. Ed. Interamericana-McGraw Hill, México, 229-223, 239-241 (1989).
11. Rovesti, P.; Study of the ethereal oils extracted from the principal wild aromatic plants of the Colony of Eritrea. *Ann. Chim. Applicata* **17**, 553-570 (1927). *Chemical Abstracts* **22**, 1434 (1928).
12. Rabaté, J.; Essence of *Lippia adoensis* Hoscht. *J. Pharm. Chim.* **28**, 437-442 (1938). *Chemical Abstracts* **33**, 8919 (1939).

13. Rabaté, J.; The essential oils of *Lippia adoensis* Hoscht. *Rev. Botan. Appl. Agr. Trop.* **18**, 350-354 (1938). *Chemical Abstracts* **32**, 8701 (1938).
14. Palfray, L. Sabetay, S. and Petit, P.; An essential oil of *Lippia adoensis* Hochst. *Chimie & Industrie* **43**, 367-370 (1940). *Chemical Abstracts* **34**, 4231 (1940).
15. Fester, G. A., Martinuzzi, E. A. and Ricciardi, A. I.; Volatile oils from Argentine Verbenaceae. *Anales Asoc. Quim. Argentina* **42**, 43-58 (1954). *Chemical Abstracts* **49**, 3479 (1955).
16. Caveiro, A. A., Alencar, W. J., Matos, A. J., Andrade, S. H. C., and Machado, L. M. I.; Essential oil from brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. *Journal of Natural Products* **44**, 598-601 (1981).
17. Naves, R. Y.; Etudes sur les matières végétales volatiles. LVI sur de nouvelles cétones, les tagéténones, isolées de l'huile essentielle de *Lippia asperifolia* Rich. *Helvetica Chimica Acta* **31**, 29-32 (1948).
18. Fernandes, C. A., Cardoso do Vales, J. and Maia e Vale, M. A.; *Lippia asperifolia* of Angola: studies of the leaves and fertile branches. *Bol. Escola Farm. Univ. Coimbra* **19**, 277-297 (1959). *Chemical Abstracts* **55**, 20329 (1961).
19. Cosgrove, D. J., Islip, H. T. and Major, F.; Oil of *Lippia carviadora* feom Kenya. *Colonial Plant and Animal Products* **1**, 56-62 (1950). *Chemical Abstracts* **44**, 11033 (1950).
20. Islip, H. T. and Matthews, W. S.; *Lippia carviadora* from somaliland protecturate. *Colonial Plant and Animal Products* **2**, 96-101 (1951). *Chemical Abstracts* **48**, 6073 (1954).
21. Souto-Bachiller, F. A., Echeverría, M. De J., Cárdenas-González, O. E., Acuña-Rodríguez, M. F., Meléndez P. A. and Romero-Ramsey, L.; Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry* **44**, 1077-1986 (1977).
22. Compadre, M. C., Pezzúto, M. J., Kinghorn, A. D., and Kamath, K.; Hernandulcin: An intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. *Science* **227**, 417-419 (1985).
23. Kaneda, N., IK-Soo Lee, Gupta, P. M., Soejarto, D. D., and Douglas Kinghorn; D. A.(+)-4 β -dihydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. *Journal of Natural Products* **55**, 1136-1141 (1992).
24. García, A. N.; Essential oil from *Lippia helleri*. *Puerto Rico Agr. Expt. Sta., Ann. Rept.* **1939**, 28-29 (1941). *Chemical Abstracts* **36**, 5613 (1942).

25. Festrer, A. G., Martinuzzi, A. E. and Ricciardi, I. A.; Some volatile essential oil San Luis and Cordoba. *Rev. Facultad Quim. Ind. y Agric.* **19**, 54-74 (1950). *Chemical Abstracts* **45**, 7306 (1951).
26. Fernández, C. J.; *Lippia integrifolia*. *Rev. Asoc. Bioquim. Argentina* **18**, 225-230 (1953). *Chemical Abstracts* **48**, 3638 (1954).
27. Catalán, C. A., Iglesias, D. I., Retamar, J. A., Hurraspe, J. B., Dartayet, G. H., and Gros, E. G.; A sesquiterpene diketone from *Lippia integrifolia*. *Phytochemistry* **22**, 1507-1508 (1983).
28. Dartayet, H. G., Catalán, A. C., Retamar, A. J., and Gross, G. E.; sesquiterpenoids from *Lippia integrifolia*- Africanone, a tricyclic sesquiterpene ketone. *Phytochemistry* **23**, 688-689 (1983).
29. Catalán, C. A., De Fenik, J. S. I., Dartayet H. G., and Gros, G. E.; Integrifolian-1,5-diona and a revised structure for 'africanone', biogenetically related sesquiterpene ketones from *Lippia integrifolia*. *Phytochemistry* **30**, 1323-1326 (1991).
30. Catalán, C. A., De Fenik, I. J., De Arriazu, P. J. and Kukke, W. C.; 4-5-seco-african-4,5-diona from *Lippia integrifolia*. *Phytochemistry* **31**, 4025-4026 (1992).
31. Catalán, C. A., De Lampasona, E. P., De Fenik, J. S. I.; Structure and conformation of a humulenedione from *Lippia integrifolia*. *Journal of Natural Products* **56**, 381-385 (1993).
32. Catalán, C. A., De Lampasona, E. P., De Fenik, J. S. I.; Minor constituents of *Lippia integrifolia*. *Journal of Natural Products* **57**, 206-210 (1994).
33. Catalán, C. A., De Lampasona, E. P.; Trace constituents of *Lippia integrifolia*. *Journal of Natural Products* **58**, 1713-1717 (1995).
34. Festrer, A. G., Martinuzzi, A. E. and Ricciardi, I. A.; Volatile oils IV. *Rev. Fac. Ing. Quim.* **20**, 47-60 (1951). *Chemical Abstracts* **48**, 6655 (1954).
35. García, A. N.; Essential oils from Puerto Rico. *Am. Perfumer* **45**, 27-29 (1943). *Chemical Abstracts* **37**, 1225 (1943).
36. Lamaty, G., Menut, C., Bessiere, J. M., Ovamba, J. A., and Silou, T.; 2-metil-6-metilene-7-octen-4-one, a constituent of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry* **29**, 521-522 (1990).
37. Valentin, A., Pélissier, Y., Benoit, F., Marion, Ch., Kone, D., Mallie, M., Bastide, J-M., and Bessiere, J-M.; Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry* **40**, 1439-1442 (1995).

38. Festrer, A. G., Martinuzzi, A. E. and Ricciardi, I. A.; Some voaltuile essential from San Luis y Cordoba. IV. *Anales Soc. Cient. Argentina* **144**, 457-471 (1947). *Chemical Abstracts* **42**, 4309 (1948).
39. Taoubi, K., Fauvel, M. T., Gleye, J., Moulis, C., and Fouraste, I.; Phenylpropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*. *Planta Medica* **63**, 192 (1997).
40. Rimpler, H. and Saverbier, H.; Iridoid glucósides as taxonomie markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. *Biochemical Systematic and Ecology* **34**, 307-310 (1986).
41. Rastrelli, L., Caceres, A., Moralkes, C., De Simone, F. and Aquino, R.; Iridoids from *Lippia graveolens*. *Phytochemistry* **49**, 1829-1832 (1998).
42. Barva, K. A., Chakrabarti, P., and Sanyal, P. K.; Nodifloretin A new flavone from *Lippia nodiflora*. *Journal Indian Chemical Society* **46**, 271-272 (1969).
43. Tomás-Barberán, A. F., Harborne, B. J., and Self, R.; Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. Canencens*. *Phytochemistry* **26**, 2281-2284 (1987).
44. Linares, E., Flores, P. B., y Bye, R.; *Selección de Plantas Medicinales de México*, Ed. Limusa Noriega Editores, México, 96 (1996).
45. De Pasquale, Costa de Pasquate, R.; Pharmacognostic studies on *Lippia triphylla*. *Atti-Conv. Naz. Olii Essenz. Sui Deriv. Agum.* **1976**, 8-9, 76-81 (1981) *Chemical Abstracts* **88**, 11722 (1982).
46. Nakamura, T., Okuyama, E., Tsukada, A., Yamazoky, M., Sarake, M., Nishibe, S., Deyama, T., Moriya, A., Maruno, M., and Nishimura, N.; Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **45**, 499-504 (1997).
47. Pérez, G. S., Zavala, S., M. A., Vargas, S., Pérez, G. C. R, and Pérez G. R. M.; Antidiarrheocal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*. *Phytotherapy research* **12**, 845-846 (1998).
48. Skaltsa, H., and Shamma, G.; Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica* **54**, 465 (1988).
49. Carnat, A., Carnat, A-P., Chavignon, O., Heitz, A., Wilde, R, and Lamaison, J-L; Luteolin 7-diglucoronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Medica* **61**, 490 (1995).
50. Martinez, M.; *Las Plantas medicinales de México*, Ed. Botas V., 6ª ed. México, 66 y 68 (1992).

51. Duke, A. J.; *Handbook of medicinal herbs*, Ed. CRC Press, 6ª ed. New York, 33 (1988).
52. Pereyra, L.; An investigation of the essential oil of *Lippia hastulata* (Grisebach) Hieronymus. *Univ. Nacl. Tucumán Museo Historia Natural* **8**, 3-13 (1926). *Chemical Abstracts* **22**, 138 (1928).
53. Timothy, M. C. and John M. H.; Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068-2101 (1994).
54. Giunta, L. J.; *Patología*. Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill, 3ª ed., México, 25-42 (1991).
55. Janoff, A.; Neutrophil proteases in inflammation. *Annual Review of Medicine* **23**, 177 (1972).
56. Weissmann, G.; Activation of neutrophils and the lesions of rheumatoid arthritis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **100**, 322-333 (1982).
57. Borregaard, N. and Troels, H.; Energy metabolism of human neutrophils during phagocytosis. *Journal Clinical Investigation* **70**, 550-557 (1982).
58. Hamilton, A. J.; Stimulation of macrophage prostaglandin and neutral protease production by phorbol esters as a model for the induction of vascular changes associated with tumor promotion. *Cancer research* **40**, 2273-2280 (1980).
59. Leibovich, J. S. and Ross, R.; The role of the macrofage in wound repair, *American Journal of Pathology* **78**, 71-91 (1975).
60. Rang, H. P. y Dale, M. M. *Farmacología*, Ed. Churchill Livingstone, España 261-298 (1992).
61. Franklin, S. W. *Tratamiento endodóncico*, Ed. Harcourt, 5ª ed, España, 186-199 (1997).
62. Dias Da S. and Irwin, H. L.; Complement as a mediator of inflammation. *Journal Experimental Medical* **125**, 921-946 (1967).
63. Colvin, B. R. and Dvorak, F. H.; Role of the clotting system in cell-mediated hypersensitivity. *The Journal of Immunology* **114**, 377-387 (1975).
64. Geczy, L. C. and Meyer, A. P.; Leukocyte procoagulant activity in man: An in vitro correlate of delayet-type hypersensitivity, *The Journal of Immunology* **128**, 331-335 (1982).
65. Nakanishi, S.; Substance P precursor and kininogen: Their structures, gene organizations, and regulation. *Physiological Reviews* **67**, 1117-1142 (1987).

66. Bhoola, D. K., Figueroa, D. C. and Worthy, K.; Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews* **44**, 3-80 (1992).
67. Reite, B. O.; Comparative physiology of histamine. *Physiological Reviews* **52**, 778-811 (1972).
68. Goodman, G. A y Gillman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Vol. II, Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana, 9ª ed, México, 1996.
69. Samuelsson, B., Dahlén, S-E., Lingren, J. A., Rouzer, C. A. and Serhan, Ch. N.; messengers in signal transduction. *FASEB* **5**, 2068-2077 (1991).
70. Habenicht, J. R., Salbach, P., Goerig, M., Zeh, W., Janssen-Timmen, U., Blattner, C., King, C. W. and Glomset, A. J.; The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Nature* **345**, 634-636 (1990).
71. Irvine, R. F.; How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?. *Biochemical Journal* **205**, 3-16 (1982).
72. Smith, W. L.; Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *American Physiological Society* **263**, F181-F191 (1992).
73. Samuelsson, B., Goldyne, M., Granström, E., Hamberg, M., Hammarström, S., and Malmsten, C.; Prostaglandins and thromboxanes. *Annual Review of Biochemistry* **47**, 997-1029 (1978).
74. Lewis, G. P. and Piper, P. J.; Inhibition of related of prostaglandins as an explanation of some of the actions of anti-inflammatory corticosteroids. *Nature* **254**, 308-311 (1975).
75. Borgeat, P., Hamberg, M., and Samuelsson, B.; Transformation of arachidonic acid and Homo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **251**, 7816-7820 (1976).
76. Young, J. M., Spires, D. A., Bedord, Ch. J., Wagner, B., Ballaron, S. J. and De Young, L. M.; The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *The Journal of Investigative Dermatology* **82**, 367-371 (1984).
77. McMillan, R. M. and Walker, E. R.; Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends in Pharmacological Science* **13**, 323-330 (1992).
78. Borgeat, P. and Samuelsson, B.; Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 2643-2646 (1979).
79. Hammarström, S.; Leukotrienes. *Annual Review of Biochemistry* **52**, 355-377 (1983).

80. Samuelsson, B.; Leukotrienes: Mediator of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568-575 (1983).
81. Samuelsson, B., Hammarström, S., Murphy, R. C. and Borgeat, P.; Leukotrienes and slow reacting substance of anaphylaxis (SRS-A). *Allergy* **35**, 375-381 (1980).
82. Yamamoto, S.; Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1128**, 117-131 (1992).
83. Gallin, I. J., Goldstein, M. I. and Snyderman, R.; *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Ed. Raven Press, New York, 131-167, 877-895 (1988).
84. Isibasi, A.; Perspectives in immunoregulation, Symposium 3, IMSS-Farmasa Schwabe, *The phytopharmaceuticals of the next century*, México 129-141 (1999).
85. O'Banion, K. M., Winn, D. V. and Young, A. D.; DNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4888-4892 (1992).
86. Hodes, J. R., Ahmann, B. G., Hathcock, S. K., Dickler, B. H. and Singer, A.; Cellular and genetic control of antibody responses in vitro. *The Journal of Immunology* **121**, 1501-1509 (1978).
87. Unanue, R. E., Beller, I. D., Lu, Y. Ch. and Allen, M. P.; Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism, *The Journal of Immunology* **132**, 1-5 (1984).
88. Wolff, E. M. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 5 ed, Vol. 5. Therapeutic discovery, Ed. John Wiley & Sons 281-376 (1997).
89. Singer, M. F. and Borman, A.; Anti-inflammatory activities of several 9 α -halo derivatives of adrenal steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 23-26 (1956).
90. Brattsand, R., Thalen, A. Roempke, K., Källström, L. and Gruvstad, E.; Influence of 16 α , 17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. *Journal of Steroid Biochemistry* **16**, 779-786 (1982).
91. Barnes, J. P. and Adcock, I.; Anti-inflammatory actions of steroid: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences* **141**, 436-441 (1993).
92. Muller, M. and Renkawitz, R.; The glucocorticoid receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* **1088**, 171-182 (1991).
93. McMillan, M. R., Brinckerhoff, E. C. and Harris, D. E.; Phospholipases in synovial cells: Arachidonate-specific inhibition by dexamethasone. *Arthritis and Rheumatism* **23**, 719 (1980).

94. Hirata, F., Schiffmann, E. Venkatasubramanian, K., Salomon, D. and Axelrod, J.; A phospholipase A₂ inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. USA* **77**, 2533-2536 (1980).
95. Tam, S., Hong, L. S. and Levine, L.; Relationships, among the steroids of anti-inflammatory properties and inhibition of prostaglandin production and arachidonic acid releaser by transformed mouse fibroblasts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **203**, 162-168 (1977).
96. Blackwell, J. G., Carnuccio, R., Di Rosa, M., Flower, J. R., Parente, L. and Persico, P.; Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature* **287**, 147-149 (1980).
97. Schalkwijk, C., Vervoordeldonk, M., Pfeilschifter, J., Märki, F. and Van den Bosch, H.; Cytokine and forskolin-induced synthesis of group II phospholipase A₂ and prostaglandin E₂ in rat mesangial cells is prevented by dexamethason. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**, 46-52 (1991).
98. Flower, J. R. and Blackwell, J. G.; Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A₂ inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* **278**, 456-459 (1979).
99. Schleimer, P. R.; The mechanisms of antiinflammatory steroid action in allergic diseases. *Annual Review Medicine* **25**, 381-412 (1985).
100. Tsurufuji, S., Sugio, K., Takemasa, F. and Yoshizawa, S.; Blockade by antiglucocorticoids, Actinomycin D of dexamethasone against bradykinin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **212**, 225-231 (1980).
101. Dimitriu, A.; Suppression of macrophage arming by corticosteroids. *Cellular Immunology* **21**, 79-87 (1976).
102. Pennington, E. J., Matthews, J. W., Marino, T. J. and Colten, R. H.; Cyclophosphamide and cortisone acetate inhibit complement biosynthesis by guinea pig broncho alveolar macrophages. *The Journal of Immunology* **123**, 1318-1321 (1979).
103. Balow, E. J. and Rosenthal, S. A.; Glucocorticoid suppression of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of Experimental Medicine* **137**, 1031-1039 (1973).
104. Werb, Z.; Biochemical actions of glucocorticoids on macrophages in culture. *The Journal of Experimental Medicine* **147**, 1695-1709 (1978).
105. Thompson, J. and Van Furth, R.; The effect of glucocorticosteroids on the proliferation and kinetics of promonocytes of the bone marrow. *The Journal of Experimental Medicine* **137**, 10-21 (1973).

106. Safayhi, H. and Sailer, R. E.; Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Medica* **63**, 487-493 (1997).
107. Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y., and Niwa, Y.; Mechanism of anti-inflammatory action of Glycyhizin: Effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Medica* **57**, 119-121 (1991).
108. Wasternack, C., Atzorn, R., Blume, B., Leopold, J. and Parthier, B.; Ursolic acid inhibits synthesis of jasmonate-induced proteins in barley leaves. *Phytochemistry* **35**, 49-54 (1994).
109. Winter, Ch., Risley, E. and Nuss, G.; Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Biol. Med.* **111**, 544-547 (1962).
110. Gupta, M. B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K. and Bhargava, K. P.; Anti-inflammatory and antipyretic activities of β -sitosterol. *Planta Medica* **39**, 157-163 (1980).
111. Yesilada, E. and Sezik, E.; Screening of some Turkish medicinal plants used in the treatment of rheumatoid arthritis and inflammatory diseases for their anti-inflammatory activities. *Planta Medica* **56**, 659 (1990).
112. Yasukawa, K., Takido, M., Matsumoto, T., Takeuchi, M. and Nakagana, S.; Sterol and triterpene derivates from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* **48**, 72-76 (1991).
113. Martínez-Vázquez, M., Ramírez A. T. O., Lazcano, M. E. and Bye, R.; Anti-inflammatory active compounds from the n-hexane extract of *Euphorbia hirta*. *Revista de la Sociedad Química de México* **43**, 103-105 (1999)
114. Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaki, K. and Tamura, T.; Triterpene alcohol from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**, 1255-1260 (1996).
115. Liu, J.; Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 57-68 (1995).
116. Recio, M. C., Giner, R. M., Mañez, S., Gueho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K., and Ríos, J. L.; Investigation on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomela*. *Planta Medica* **61**, 9-12 (1995).
117. Singh, G. M., Surjett singh, Bari, S., Gupta, B. D., and Barnerjee, S. K.; Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rat and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **44**, 456-458 (1992).

118. Tsuruga, T., Chun, Yui-To, Ebizuka, Y. and Sankawa, U.; Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: Inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **39**, 3276-3278 (1991).
119. Najid, A., Simon, A., Cook, J., Chable-rabinovitch, H., Delage, C., Chulia, A. J. and Rigaud, M.; Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages platelets and differentiated HL60 leucemic cells. *FEBS* **299**, 213-217 (1992).
120. Hui Wang, B. and Polya, M. G.; Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry* **41**,55-63 (1996).
121. Bode, W., Meyer, E. and Powers, C. J.; Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray cristal structures, mechanism, substrate specificity and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* **28**, 1951-1963 (1989).
122. Janoff, A.; Elastase in tissue injury. *Annual Review of Medicine* **36**, 207-216 (1985).
123. Safayhi, H. Rall, B., Sailer, E. R., and Ammon, P. H.; Inhibition by Boswellic acids of human leucocyte elastase, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **281**, 460-463 (1997).
124. Kapil, A., and Sharma, S.; Anti-complement activity of oleanolic acid: an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **46**, 922-923 (1994).
125. Ying, Qi-Long, Rinethart, R. A., Simon, R. S. and Cheronis, C. J.; Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid. *Biochememical Journal* **277**, 521-526 (1991).
126. Nakajima, K. Powers, J. J., Ashe, M., B. and Zimmerman, M.; Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and Human leucocyte elastase. *The Journal of Biological Chemistry* **254**, 4027-4032 (1979).
127. Recio, M. C., Giner, R. M., Mañez, S. and Ríos, J. L.; Structural requerements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica* **61**, 182-185 (1995).
128. Hirota, M., Mori, T., Yoshida, M. and Irike, R.; Suppression of tumor promoter-induced inflammation of mouse ear by ursolic acid and 4,4-dimethylcholestane derivates. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1073-1075 (1990).
129. Inove, H., Mori, T., Shibata, S. and Koshihara, Y.; Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. *British Journal Pharmacology* **96**, 204-210 (1989).

130. Inoue, H., Inoue, K., Takeuchi, T., Nagata, N., and Shibata, S.; Inhibition of rat acute inflammatory paw oedema by dihemiphthalate of glycyrrhetic acid derivatives: Comparison with glycyrrhetic acid. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **45**, 1067-1071 (1993).
131. Pant, P. and Rastogi, R. P.; Triterpenoids. *Phytochemistry* **18**, 1095-1108 (1992).
132. Inque, N., Mori, T., Shibata, S., and Koshihara, Y.; Inhibitory effect of Glycyrrhetic acid derivatives on arachidonic acid-induced mouse ear oedema. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **40**, 272-277 (1988).
133. Inque, H., Kurosu, S., Takeuchi, T., Mori, T., and Shibata, S.; Glycyrrhetic acid derivatives: anti-nociceptive activity of deoxyglycyrrhetol dihemiphthalate and the related compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **42**, 199-200 (1990).
134. Vaden, D. and Vlietinck, A.; Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plants; *Methods in plant biochemistry*. vol. 6 Assay for bioactivity, Academic Press, 47-69 (1991).
135. Nadir, T. M., Abdualbaqi, J. D., Al-Sarraj, M. S., and Hussein, A. W.; The effect of different methods of extraction on the antimicrobial activity of medicinal plants, *Fitoterapia* **57**, 359-363 (1986).
136. Hamburger, O. M. and Cordell, A. G.; A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products* **50**, 19-22 (1987).
137. Rios, L. J., Recio, M. C. and Villar, A.; Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* **23**, 127-149 (1988).
138. Marymont, H. J. and Wentz, M. B.; Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtiterator system. *The American Journal of Clinical Pathology* **45**, 548-550 (1966).
139. Sokomba, E., Wambee, Ch., Chowdhury, K. B., Iriah J., Ogbeide, N. O. and Orkor, D.; Preliminary phytochemical, pharmacological and antibacterial studies of the alkaloidal extracts of the leaves of *Syncliaia scabrida* miers. *Journal of Ethnopharmacology* **18**, 173-185 (1986).
140. Bauer, W. A., Kirby, M. M., Sherris, C. J. and Turck, M.; Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* **45**, 493-496 (1966).
141. Begue, J. M. and Kline, M. R.; The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures. *Journal of Chromatography* **64**, 182-184 (1972).

142. Lund, M. B. and Lyon, D. G.; Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. *Journal of Chromatography* **110**, 193-196 (1975).
143. Betina, V.; Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography* **78**, 41-51 (1973).
144. Homans, L. A. and Fuchs, A.; Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **51**, 327-329 (1970).
145. Ieven, M., Vanden Berghe, A. D., Mertens, F., Vlietinck, A. and Lammens, E.; Screening of higher plants for biological activities I. Antimicrobial activity. *Planta Medica* **36**, 311-321 (1979).
146. Ikram, M. and Inamul H.; Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part I. *Fitoterapia* **51**, 231-235 (1980).
147. Ikram, M. and Inamul H.; Screening of medicinal plants for antimicrobial activity. Part II. *Fitoterapia* **51**, 281-284 (1980).
148. Ross, A. S., Megalla, E. S., Bishay, W. D. and Awad, H. A., Studies for determining antibiotic substances in some Egyptian plants, Part I. Screening for antimicrobial activity. *Fitoterapia* **51**, 303-308 (1980).
149. Gutking, O. G., Martino, V., Graña, N., Coussio, D. J. and De Torres, A. R.; Screening of south American plants for biological activities. I. Antibacterial and antifungal activity. *Fitoterapia* **52**, 213-218 (1981).
150. Martello, R. and Farnsworth, N. R.; Observations on the sensitivity of several common alkaloid precipitating reagents. *Lloydia* **25**, 176-185 (1962).
151. Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D. and McLaughlin, J.; Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34 (1982).
152. Barahona, M., Cano, M. and Sánchez-Fortún, S.; Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*. *Revista de Toxicología* **11**, 92-95 (1994).
153. Lester, A., Mitscher, Ruey-Ping, Mohindar S. Bathala, Wu-nan Wu and Jack L. B.; Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. *Lloydia* **35**, 157166 (1972).
154. Batterham, T. J. and Highet, J.; Nuclear Magnetic Resonance spectra of flavonoids. *Australian Journal Chemistry* **17**, 428-439 (1964).

155. Gao, F., Wang, H., Mabry, T. J. and Kinghorn, D.; Dihydroflavonol sweeteners and other constituents from *Hymenoxys turneri*. *Phytochemistry* **29**, 2865-2869 (1990).
156. Fernández, I., García, B., Grancha, F. J. and Pedro, J. R.; Sesquiterpene lactones and coumarins from *Centurea collina*. *Phytochemistry* **28**, 2405-2407 (1989).
157. González, C. I., Macias, F. A., Massanet, G. M. and Rodriguez, L. F.; Flavonoids from *Centaurea clementei*. *Journal of Natural Products* **48**, 819-822 (1985).
158. Mues, R., Timmermann, B. N., Ohno, N. and Mabry, J. T.; 6-methoxyflavonoids from *Brickellia californica*. *Phytochemistry* **18**, 1379-1383 (1979).
159. Liu, Yong-Long and Mabry, T. J.; Flavonoids from *Artemisia frigida*. *Phytochemistry* **20**, 1389-1395 (1981).
160. Hurabielle, M., Eberle, J. and Paris, M.; Etude des flavonoïdes d'*Artemisia campestris* sous-espèce glutinosa. *Planta medica* **46**, 124-128 (1982).
161. Ferraro, G., Martino, V., Barrajo, G. and Coussio, J. D.; 5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-methoxyflavone from *Eupatorium subhasatum*. *Phytochemistry* **26**, 3092-3093 (1987).
162. Herz, W. and Sumi, Y.; Constituents of *Ambrosia hispida* Pursh. *Journal of Organic Chemistry* **29**, 3438-3439 (1969).
163. Carman, N. J., Watson, T., Bierner, M. W., Averett, J., Sanderson, S., Seaman, F. C. and Mabry, T. J.; 6-methoxyapigenin from thirty-four species of Compositae. *Phytochemistry* **11**, 3271-3272 (1972).
164. Rubinstein, L., Goad, L. J. and Claghe, A. D. H.; The 220 MHz spectra of phytosterols. *Phytochemistry* **15**, 195-200 (1976).
165. Agrawal, P. K.; NMR spectroscopy in the structure elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3007-3330 (1992).
166. Thompson, M. J. and Dutky, S. R.; NMR spectra of C-24 isomeric sterols. *Phytochemistry* **11**, 1781-1790 (1972).
167. Ogunkoya, L.; Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. *Phytochemistry* **20**, 121-126 (1981).
168. Shannon, J. S.; Studies in mass spectrometry. *Australian Journal Chemistry* **16**, 683-689 (1963).
169. Bdziejewicz, N., Wilson, J. and Djerassi, C.; Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XII. Pentacyclic triterpenes. *Journal of American Chemical Society*. **85**, 3688-3699 (1963).

170. Karlinner, A. and Djerassi, C.; Terpenoids LVII. Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. *Journal of the Chemical Society* **31**, 1945-1956 (1966).
171. Torch, B., Harrison, T., Djerassi; Terpenoids LXII. Demonstration of ring conformational changes in triterpenes of the β -amirin class isolated from *Stryphnodendron criaceum*. *Journal of the Chemical Society* **28**, 2300-2334 (1963).
172. Cheung, H. T. and Yan, T. C.; Constituents of dipterocarpaceae resins. *Australian Journal of Chemistry* **25**, 2003-2012 (1972).
173. Heinstein, Ma. P. F. and McLaughlin, J. L.; Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *Journal of Natural Products* **52**, 1132-1135 (1989).
174. Fang, X. P. and McLaughlin, J.L.; Ursolic acid, a cytotoxic component of the berries of *Ilex verticillata*. *Fitoterapia* **61**, 176-177 (1990).
175. Ríos, J. L., Recio, M. C. and Villar, A.; Antimicrobial activities of *Helichrysum stoechas*. *Planta Medica* **56**, 646 (1990).
176. Kitagawa, I., Sugawara, T. and Yosioka, I.; Saponin and sapogenol. XV) Antifungal glycosides from the Sea cucumber *Stichopus japonicus* Selenka. (2) Structures of holotoxin A and holotoxin B. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **24**, 275-284 (1976).
177. Favel, A., Steinmetz, M. D., Regli, P., Vidal-Ollivier, E., Elias, R. and Balansard, G.; *In vitro* antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta medica* **60**, 50-51 (1994).
178. Harborne, J. B. *The flavonoids, Advances in Research since 1986*, Ed. Chapman & Hall, Great Britain (1994).
179. Zaletova, N. I. Shchaulinskii, A. N., Tolkachev, O. N., Vichkanova, S. A., Fateeva, T. V., Krutisova, M. N., Yartseva, I. V. And Klyvev, N. A.; Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. *Khim. Farm. Zh.* **20**, 568-571 (1986). *Chemicals Abstracts* **106**, 18867e (1987).
180. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C. and Baerheim Syendsen, A.; Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 Literature review. Aspect of the test methods. *Planta medica*, 395-398 (1987).
181. Bremer, K. *Asteraceae. Cladistics & Classification*. Ed. Timber Press, USA, 13-35, 61-70, 112-143 (1994).
182. Zumlefer, W. B.; *Guide Flowering Plant Families*. Ed. Champel Hill & London, U. S. A., 203-209 (1994).

183. Christensen, L. P. and Lam, J.; Acetylenes and related compounds in Cynareae. *Phytochemistry* **29**, 2753-2785 (1990).
184. Christensen, L. P.; Aplotaxene derivatives from *Cirsium helenoides*. *Phytochemistry* **31**, 2039-2041 (1992).
185. Yano, K. A new acetylenic alcohol from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry* **19**, 1864-1866 (1980).
186. Takaishi, Y., Okuyama, T., Masuda, A., Nakano, K., Murakami, K. and Tomimatsu; Acetylenes from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry* **29**, 3849-3852 (1990).
187. Takaishi, Y., Okuyama, T., Nakano, K., Murakami, K. and Tomimatsu, T.; Absolute configuration of a triolacetylene from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry* **30**, 2321-2324 (1991).
188. Binger, R. G., Benson, M., Haddon, W. F. and French C. R.; Aplotaxene derivatives from *Cirsium arvense*. *Phytochemistry* **31**, 1033-1034 (1992).
189. Takano, S. and Kawaminami, S.; Eight aliphatic aldehydes from *Cirsium dipsacolepis* and their stereoselective synthesis. *Phytochemistry* **26**, 435-438 (1987).
190. Bohlmann, F. and Abraham, W-R.; Aplotaxene epoxide from *Cirsium hypoleucum*. *Phytochemistry* **20**, 855-856 (1981).
191. Yano, K., Shiraishi, N. and Furukawa, T.; Ontogenetic variations in C17 hydrocarbon composition in root oil of *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry* **22**, 1030-1031 (1983).
192. Yano, K.; Hydrocarbons from *Cirsium japonicum*. *Phytochemistry* **16**, 263-264 (1977).
193. Takaishi, Y., Okuyama, T., Nakano, K., Murakami, K., Tomimatsu, T. and Yamahara, J.; Polyolefinic compounds from *Cirsium nipponicum* roots. *Phytochemistry* **30**, 1539-1542 (1991).
194. Takano, S. and Kawaminami, S.; Cyperenyl acetate and cyperenal from *Cirsium dipsacolepis*. *Phytochemistry* **27**, 1197-1199 (1988).
195. Piatak, D. M. and Eichmeier, L. S.; Plant investigation, II hexane extract of *Cirsium arvense*. *Trans Ill State Acad Sci* **64**, 300-304 (1971). *Chemical Abstracts* **77**, 16569t (1972).
196. Dutta, C. P. and Ray, L. P.; Taraxasterol and its derivatives from *Cirsium arvense*. *Phytochemistry* **11**, 2267-2269 (1972).
197. Palade, M., Neacsu, M. and Comon, F.; Lipidic fraction from *Cirsium arvense* var *setosum*. *Farmacia* **22**, 233-240 (1974). *Chemical Abstracts* **81**, 166396f (1974).

198. Rosaluv, F. A., Serketou, S. V., Ismailov, N. M., and Nouruzov, E. N.; Chemical investigation of *Cirsium echinus*. *Izq. Akad. Nauk Az. SSR. Ser. Biol. Nauk*, 14-16 (1989). *Chemical Abstracts* 116, 55515r (1992).
199. Kitam, G., Yuchens, F. and You You; Chemical constituents of *Cirsium segatum*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 17, 547-548 (1992). *Chemical Abstracts* 118, 19241f (1993).
200. Khafagy, S. M., Halim, A. F. and Gohar, A. A.; Chemical study of *Cirsium syriacum*. *Fitoterapia* 52, 21-23 (1981).
201. Krzysztofik, B. and Ludwiczak, R.; Triterpenes and sterols from *Cirsium oleraceum*. *Rocz. Chem.* 45, 355-364 (1971). *Chemical Abstracts* 75, 72522t (1971).
202. Domínguez, X. A., González A., Zamudio, M. A. and Garza, A.; Taraxaterol from *Stevia berlandieri* and *Cirsium texacum*. *Phytochemistry* 13, 2001 (1974).
203. Negi, R. K., Fakhir, T. M. and Rajagopalan, T. R.; A pyrrolizidine alkaloid from *Cirsium wallichii* DC. *Indian Journal of Chemistry* 28B, 524-525 (1989).
204. Shelyuta, V. L., Glyzin, V. I. and Ban'kouskii, A. I.; Flavonoid from *Cirsium arvense*. *Khim. Prir. Soedin* 6, 365-366 (1970). *Chemical Abstracts* 73, 106309e (1970).
205. Shelyuto, V. L., Glyzin, V. I. and Bubon, N. T.; Flavonol glucuronides from *Cirsium arvense*. *Khim. Prir. Soedin* 240-241 (1972). *Chemical Abstracts* 77, 58854n (1972).
206. Morita, N., Shimizu, M. and Arisawa, M.; Two new flavone glycosides from *Cirsium lineare*. *Phytochemistry* 12, 421-423 (1973).
207. Wallace, J. W.; Tricin-5-O-glucoside and other flavonoids of *Cirsium arvense*. *Phytochemistry* 13, 2320-2321 (1974).
208. Lin, Chun-Nan, Chang, Cheng-Hsiung, Wu, Tian-Shung; Components of Fomusan *Cirsium* species. Part IV. Component of *Cirsium arisanense*. *J. Chin. Chem. Soc.* 22, 53-55 (1975). *Chemical Abstracts* 83, 40200k (1975).
209. Naoyoshi, L. and Chun-Nan; Studies of the component of formosa *Cirsium* species part IV. Component of *Cirsium arisanense kitamura* and *Cirsium ferum kitamura*. *Tai-wan Yao Hsueh Tsai Chih* 28, 40-42 (1977). *Chemical Abstracts* 88, 34562s (1978).
210. Wallace, J. W. and Bohm, B. A.; Cirsimaritin-4'-O-rutinoside, a new flavone glycoside from *Cirsium brevistylum*. *Phytochemistry* 10, 452-454 (1971).
211. Wu, T., Shung, K., Chang, S. and Jen, S.; Constituents of formosan folk medicine. VIII flavonoids of the leaves of *Cirsium albencens*, *C. Japonicum* var. *Australe*. *Tai-wan Yao Hsueh Tsai Chi-Tai-wan Yao Hsueh Tsai Chih* 32, 88-90 (1981). *Chemical Abstracts* 96, 31651z (1982).

212. Gardner, R. C.; Acacetin-7-O-rutinoside and pectolinarin from *Cirsium coloradense*. *Phytochemistry* **12**, 223 (1973).
213. Ogurtsuva, L. N. and Syvzeva, Z. F.; Flavonoids of *Cirsium heterophyllum*. *Khim. Prir. Soedin* **10**, 90 (1974). *Chemical Abstracts* **81**, 60808b (1974).
214. Tashichiro, N. and Naokata, M.; Medicinal resources XIV. Flavonoids of *Cirsium*. 2 components of the leaves of *Cirsium kagamontanum*, *C. inundatum* and *C. Matsumurae*. *Yakumaku zasshi* **80**, 1296-1290 (1960). *Chemical Abstracts* **55**, 3005i (1961).
215. Tashichiro, N. and Naokata, M. Medicinal resources. XIII: Flavonoids of *Cirsium microspicatum*, *C. otaeae*, *C. yoshizawaw*, *C. japonicum* and *C. purpuratum*. *Yakugaku zasshi* **79**, 1338-1340 (1959). *Chemical Abstracts* **54**, 3855a (1960).
216. Cheol, P. J., Ho, L. J. and Chot, S. J.; A flavone diglycoside from *Cirsium japonicum* var. *Ussuriense*. *Phytochemistry* **39**, 261-262 (1995).
217. Lin, Chung-Nan; Components of formosan *Cirsium* species III. Flavonoids of *Cirsium kawakamii* and *Cirsium wallichii*. *J. Chin. Chem. Soc.* **22**, 275-277 (1975). *Chemical Abstracts* **84**, 28055e (1976).
218. McGowan, S. and Wallace, J. W.; Flavonoids and phenolic acids from *Cirsium lanceolatum*. *Phytochemistry* **11**, 1503-1504 (1972).
219. Tashichiro, N. and Naokata, M.; Medicinal resources XXI. Flavonoids of *Cirsium* plants in Japan. 3. Components of the leaves of *Cirsium martimum*. *Yakugaku zasshi* **83**, 615-618 (1963). *Chemical Abstracts* **59**, 15374d, 59 (1963).
220. Do, J. Ch., Jung, K. Y. and Son, K.; Isolation of pectolinarin from the aerial parts of *Cirsium japonicum*. *Saengyak Harkhoechi* **25**, 73-75 (1994). *Chemical Abstracts* **121**, 104074k (1994).
221. Shelyuto, V. L.; Glyzin, V. I., Ban'Kouskii, A. I., Bubon, N. T.; Flavonoids of *Cirsium oleraceum* flowers. *Khim. Prir. Soedin* **7**, 372-373 (1971). *Chemical Abstracts* **75**, 115878h (1971).
222. Shelyuto, V. L.; Glyzin, V. I., Ban'Kouskii, A. I., and Bubon, N. T.; Flavonoids of *Cirsium oleraceum* flowers. *Khim. Prir. Soedin* **7**, 373-374 (1971). *Chemical Abstracts* **75**, 115858b (1971).
223. Shelyuto, V. L.; Glyzin, V. I., Yurchenku, G. N., and Smirnova, L. P. Flavonoids of *Cirsium oleraceum* flowers. *Khim. Prir. Soedin* **400** (1978). *Chemical Abstracts* **89**, 126161j (1978).

224. Hürhammer, W. L. and Kirchner, W.; Flavones od Compositae and papilionactaeae. I. Occurrence of pectolinarin and linarin in the plant kingdom. *Arch. Pharm.* **293**, 1053-1062 (1960). *Chemical Abstracts* **55**, 9580d (1961).
225. Iwashina, T., Kamenosono, K. and Ueno, T.; Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from *Cirsium oligophyllum*. *Phytochemistry* **51**, 1109-1111 (1999).
226. Shelyuto, V. L.; Glyzin, V. I. and Bubon, N. T.; Flavonoids of *Cirsium palustre*. *Khim. Prir. Soedin*, 240-241 (1972). *Chemical Abstracts* **77**, 58855p (1972).
227. Fish, Y., Hye, S. and Chang I. M.; Separation and identification of cirsimarín from *Cirsium pendulum*. *Saengyak Harhoe Chi* **9**, 145-147 (1978). *Chemical Abstracts* **91**, 189826s (1979).
228. Hwan, B. L., Jong, H. K., Ok, P. Z. and You, S.; Flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharmacol Res.* **17**, 273-277 (1994). *Chemical Abstracts* **122**, 27693c (1995).
229. Rendyuk, T. A., Krivut, B. A. and Glyzin, V. I.; Spectrophotometric method for determining acacetin in the leaves of *Cirsium setosum*. *Farmatsiya* **27**, 68 (1978). *Chemical Abstracts* **88**, 197715h (1978).
230. Rendyuk, T. D., Glyzin, V. I. and Scheter, A. I.; Phytochemical study of *Cirsium setosum*. *Acta Pharm. Jugost* **27**, 135-138 (1977). *Chemical Abstracts* **88**, 117796x (1978).
231. Yung, Ch. L. and Young, H. P.; Chemical Studies on *Cirsium* species (V). Chemical constituents of the roots of *Cirsium xanthocanthum*. *Saengyak, Hakhoe Chi* **15**, 74-77 (1984). *Chemical Abstracts* **102**, 12242t (1985).
232. Sawaguchi, K. N., Shimamura, T. and Ohsawa, K.; A new antimicrobial and antioxidative component of extract from the rhizomes of *Cirsium brevicaule* var *irumtiense* kitam. *Bokin Bobay* **22**, 271-275 (1994). *Chemical Abstracts* **121**, 251185a (1994).
233. Yue-mao, S. and Quan-zhang, M.; New furans from *Cirsium chorolepis*. *Planta Medica* **56**, 472-474 (1990).
234. Ishida, H., Umino, T., Tsuji, K. and Kosuge, T.; Studies on antihemorrhagic substances in herbs classified as hemostatics in chinese medicine. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **35**, 861-864 (1987).
235. Argueta, V. A., Cano A., L. y Rodarte, M. E.; *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I*, Ed. Instituto Nacional Indigenista, México, 328, 333-335 (1994).
236. Aguilar, A. y Camacho, J. R.; *Información Etnobotánica*. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México, 42-43 (1994).

237. Pathak, D., Pathak, K. and Singla, A. K.; Flavonoids as medicinal agents. Recent advances. *Fitoterapia* LXII, 371-389 (1991).
238. Alcaraz, M. J. and Jiménez, M. J.; Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia* LIX, 25-38 (1988).
239. Reddy, G. B. S., Udupa, A. L., Shirwaikar, A., Srinivasa-Aithal, K. and Srinivasan, K. K.; Comparison of the anti-inflammatory activity of certain methoxyflavonoids. *Fitoterapia* LXI, 460-461 (1990).
240. Alcaraz, M. J. and Ferrándiz, M. L.; Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 21, 209-229 (1987).
241. Martínez-Vázquez, M., Ramírez, A. T., Lastra, A. L. and Bye, R.; A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 64, 134-137 (1998).
242. Yasukawa, K., Takido, M., Takeuchi, M. and Nagakagawa, S.; Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 37, 1071-1073 (1989).
243. Middleton, E., Drzewinecki, G. and Krishoarao, D.; Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *The Journal of Immunology* 127, 546-550 (1981).
244. Berton, G., Shneider, C. and Romeo, D.; inhibition by quercetin of activation of polymorphonuclear leucocyte functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 595, 47-55 (1980).
245. Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S.; Studies on *Scutellariae radix*, XIII. Effects of various flavonoids on arachidonate metabolites in leukocytes. *Planta Medica* 132-136 (1985).
246. Yoshimoto, T., Furukawa, M., Yamamoto, S., Horie, T. and Watanabe-Kohno, S.; Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116, 612-618 (1983).
247. Furukawa, M., Yoshimoto, T., Ochi, K. and Yamamoto, S.; Studies on arachidonate 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 795, 458-465 (1984).
248. Williams, A., Harborne, J.B., Geiger, F., Robin, J. and Houit, S.; The flavonoids of *Tanacetum patithenium* and *T. Vulgaris* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* 51, 147-423 (1999).

249. Fushiya, S., Kishi, Y., Hattori, K., Batkhuu, J., Takano, F., Singab, A, N, B and Okuyama, T.; Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. *Planta Medica* **65**, 404-407 (1999).
250. Goel, R. K., Maiti, R. N. and Tavares, I, A.; Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. *Fitoterapia* **LXVII**, 548-552 (1996).
251. Palanichamy, S. and Nagarajan, S.; Anti-inflammatory activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-O-sophoroside. *Fitoterapia* **LXI**, 44-47 (1990).
252. Padey, V. B., Dwivedi, S. P. D., Rao, Y. V. and Goel, R. K.; Flavonoids of *Rhamnus procumbens* and pharmacological actions of kaempferol-4'-O-methyl ether. *Fitoterapia* **LXI**, 243-244 (1990).
253. Fewtrell, C. M. S. and Gomperts, B. D.; Effect of flavone inhibitors of transport ATPases on histamine secretion from rat mast cells. *Nature* **265**, 635-636 (1977).
254. Blackburn, W. D., Heck, L. W. and Wallace, R. W.; The bioflavonoid quercetin inhibits neutrophil degranulation, superoxide production, and the phosphorylation of specific neutrophil proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **144**, 1229-1236 (1987).
255. Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W. and Marks, F.; Inhibition of the calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse Brain cytosol by quercetin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **117**, 444-447 (1983).
256. Lanni, C. and Becker, E. L.; Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by *p*-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5,8,11,14-eicosatetrayenoic acid and quercetin. *Int. Archs, Allergy Appl. Immun.* **76**, 214-217 (1985).
257. Fewtrell, C. M. S. and Gomperts, B. D.; Quercetin: a novel inhibitor of Ca²⁺ influx and exocytosis in rat peritoneal mast cells. *Biochemica et Biophysica Acta* **469**, 52-60 (1977).
258. Foreman, J. C.; Mast cells and the actions of flavonoids. *Journal Allergy Clinical Immunology* **73**, 769-774 (1984).
259. Recio, M. C., Giner, R. M., Manez, S., Talens, A., Cubells, L., Gucho, J., Julien, H. R., Hostettmann, K. and Rios, J. L.; Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum monticola* depending on single or repeated local TPA administration. *Planta Medica* **61**, 502-504 (1995).
260. Noreen, Y., Ringbom, T., Perera, P., Danielson, H. and Bohlin, L.; Development of a radiochemical cyclooxygenase-1 and -2 in vitro assay for identification of natural products as inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products* **61**, 2-7 (1998).

261. Arens, H., Vibrich, B., Fischer, H., Parnham, M. J. and Römer, A.; Novel antiinflammatory flavonoids from *Podophyllum versipelle* cell culture. *Planta Medica* **46**:468-473 (1986).
262. De la Puerta, R., Forder, R. A. and Hout, J. R. S.; Inhibition of leukocyte eicosanoid generation and radical scavenging activity by Gnaphalin, a lipophilic flavonol isolated from *Helichrysum picardii*. *Planta Medica* **65**, 507-511 (1999).
263. Corvazier, E. and Maclouf, J.; Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolims of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochimica et biophysica Acta* **835**, 315-321 (1985).
264. Yamada, H., Hagai, T., Takemoto, N., Edoh, H., Kiyohara, H., Kawamura, H. and Otsuka, Y.; Plantagoside, a novel α -mannosidase inhibitor isolated from the seeds of plantago asiatica suppresses immune response. *Biochemical and Biophysical Research Communicatios* **165**, 1292-1298 (1989).
265. Noreen, Y., Serrano, G., Perera, P. and Bohlin, L.; Flavan-3-ols, isolated from some medicinal plants inhibition COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. *Planta Medica* **64**, 520-524 (1998).
266. Noreen, Y., El-Seedi., Perera, P. and Bohlin, L.; Two isoflavones from *Ceiba pentandra* and their effect on cyclooxygenase-catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of Natural Products* **61**, 8-12 (1998).
267. Ogudaini, A., Farah, M., Perera, P., Samuelson, G. and Bohlin, L.; Isolation of two new antiinflammatory biflavonoids from *Sardophyte piriei*. *Journal of Natural Products* **59**, 587-590 (1996).
268. Nakanishi, K.; *Natural Products Chemistry I*. Academic Press, New York, 12-35 (1974).
269. Markham, K. R. *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, London (1982).
270. Ternal, B. and Markham, K. R.; Carbon-13 NMR studies of flavonoids-I, flavones and flavonols. *Tetrahedron* **32**, 565-569 (1976).
271. Voelter, W. and Breitmaier, F.; *Carbon-13 NMR spectroscopy*, 3rd ed., Ed. VCH Publishers, New York, 450-453 (1990).
272. Harborne, J. C.; *Phytochemical Methods*, 2nd ed. Ed. Champan-Hall, New York (1991).
273. Hufford, Ch. D. and Lasswell, L.; Antimicrobial activities of constituents of *Uvaria chamae*. *Lloydia* **41**, 156-160 (1978).

274. Zheng, W. E., Tan, R. X. and Liu, Z. L.; Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Medica* **62**, 160-162 (1996).
275. Rwangabo, P. C.; Umuhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. *Journal of Natural Products* **51**, 966-968 (1988).
276. Waage, S. K. and Hedin, P.; Quercetin-3-O-galactosyl-(1→6) glucoside, a compound from narrow leaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry* **24**, 243-245 (1985).
277. Aljancic, I., Vajs, V., Menkovic', N., Koradzic', I., Juranic', N., Milosauljevc', S. and Macura, S.; Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifidic*: antimicrobial activity. *Journal of Natural Products* **62**, 909-911 (1999).