



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTI-
INFLAMATORIA DE *Neurolaena lobata* Y AISLAMIENTO
DE SUS METABOLITOS SECUNDARIOS POSIBLES
RESPONSABLES DE LA ACCION ANTIFLOGISTICA".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C A
P R E S E N T A
ADRIANA GONZALEZ ROBLES

ASESOR: DR. MARIANO MARTINEZ VAZQUEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. U.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de TESIS:

La tesis: "Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de Neuroleína
lobata y Aislamiento de sus metabolitos secundarios posibles
responsables de la acción antiflogística".

que presenta la pasante: Adriana González Robles
con número de cuenta: 9156036-0 para obtener el TITULO de:
Química.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 14 de marzo de 2001

PRESIDENTE	<u>M. en C. Rene Miranda Ruvalcaba</u>	
VOCAL	<u>Q. Victoria Hernández Palacios</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Mariano Martínez Vázquez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q. Ofelia Vega Vázquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Gabriel Arroyo Razo</u>	

GRACIAS

Hoy debemos dar gracias

Gracias a Quien nos permite disfrutar de un nuevo día

Gracias porque tenemos la alegría y la tristeza, el optimismo y el pesimismo

Porque podemos estar contentos o enojados

Por el poder de discernir y elegir

Porque en nosotros consiste y solo en nosotros encontrar los alicientes

Ser felices debe ser nuestras meta y luchar contra quienes se opongan

Para el ceño adusto una sonrisa

Quitar la careta y descubrir la verdadera cara de la gente

Enseñar a quien no sepa que la felicidad es gratis

Que no hay riqueza que valga si se es pobre de corazón

Que la pobreza vive mientras no nace el amor

Gracias por la Vida

Gracias a Ti como te llames Señor

Que de cualquier forma Eres el mismo.

VIVE TU TIEMPO

Date tiempo para trabajar, es el precio del triunfo

Date tiempo para pensar, es la fuente del poder

Date tiempo para jugar, es el secreto de la eterna juventud

Date tiempo para leer, es el fundamento de la sabiduría

Date tiempo para ser amigo, es el camino de la felicidad

Date tiempo para soñar, es atar tu carreta a una estrella

Date tiempo para amar y ser amado, es el privilegio de los dioses

Date tiempo para mirar alrededor, el día es corto para ser egoísta

Date tiempo para reír y regalar una sonrisa, es la música del alma

DEDICATORIAS

“La fe es la esencia de lo que somos,
y la prueba de lo que no se ve”.

*A Dios, que por su infinito amor me ha concedido
el don maravilloso de la vida.*

*Yo no soy demasiado sabio para negarte,
Señor; encuentro lógico tu existencia divina;
Me basta abrir los ojos para hallarte;
La creación entera me convida adorarte,
Y te adoro en la rosa y te adoro en la espina.
¿Qué son nuestras angustias
para querer por argüirte de cruel?
¿Sabemos por ventura si tú
con nuestras lagrimas fabricas las estrellas,
si los seres más altos, si las cosas más bellas
se amansan con el noble barro de la amargura?
Esperemos , suframos, no lancemos jamás
A lo invisible nuestra negación como un reto.
Amado Nervo.*

*A los seres que mas amo a Raúl González Ramírez y María Amelia Robles de
González, instrumentos del alfa y omega de mi ser. Son la fortaleza y cariño
que me alienta para seguir adelante gracias por sus enseñanzas y su amor.
Gracias papas, por haberme dado la vida; por su gran apoyo, comprensión y
ternura que siempre me han brindado en cada una de las etapas de mi vida,
por sus consejos, valores y principios que siempre me han forjado día a día,
por todo mil gracias.*

DEDICATORIA

A todos nos gusta pertenecer, saber que formamos parte de algo. Saber que somos amados y aceptados; entonces hagamos de nuestra familia un grupo de amigos en donde encontremos paz, comprensión y compañía, porque en la familia encontremos el amor verdadero y desinteresado. Compartamos no sólo las ventajas de pertenecer a una familia, sino las responsabilidades, para que formando un frente unido podamos juntos enfrentarnos a los problemas de una forma solidaria y generosa.

Que hermoso sería que toda la humanidad lograra algún día formar una Gran Familia.

Helen Hernández.

También doy gracias a mi abuelito David González López que a pesar de su dolorosa ausencia física, espiritualmente sigues conmigo, viviendo en mi corazón, gracias por tus enseñanzas y tu amor, a mi abuelito Bonifacio Robles por su amor y su comprensión, a mis abuelitas Irene Ramírez de González por sus sabios consejos que siempre me han dado y sobre todo su gran apoyo, amor y comprensión por su fortaleza y a mi abuelita Sofia Cruz por su apoyo.

A mis hermanos: Raúl, David, Ricardo, Mariana, Guadalupe y Jesús Antonio, a todos ellos porque siempre hemos luchado juntos por que cada uno siga adelante y sobre todo por su cariño, comprensión, ternura y su apoyo incondicional gracias, a Iván el esposo de mi hermana Mariana por su apoyo, además por ser los padres de los rayitos de luz que han iluminado nuestro hogar y nuestras vidas con sus miradas tiernas y hermosos ojos a Fátima Alejandra y a mi otra sobrinita Andrea Guadalupe.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento al Dr. Mariano Martínez Vázquez por la confianza que tuvo en la realización de este trabajo, por su apoyo constante e incondicional y por la oportunidad de compartir su experiencia. Gracias por haber sido mi profesor, maestro y amigo, impulsándome a mejorar y valorar el trabajo. Así mismo agradezco a Q. Graciela Flores Rosete por su gran apoyo incondicional y por su comprensión y su amistad que me ha brindado muchas gracias.

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 1-4 de Productos Naturales y en la Unidad de Pruebas de Actividad Biológica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Quiero agradecer a la M. en Ciencias Teresa Ramírez Apan por la cooperación prestada para la realización de este trabajo.

Al CID Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico, S.A de C.V. por las facilidades otorgadas.

AMISTAD

Si tienes un amigo, has merecido un don divino. La amistad leal, sincera, desinteresada, es la verdadera comunión de las almas. Es la más fuerte que el amor, porque éste suele ser celoso, egoísta y vulnerable. La verdadera amistad perdura y se fortalece a través del tiempo y la distancia. La amistad es bella, para el que tiene un amigo, no existe la soledad.

Y a mis amigos que siempre me han estado jalando las orejas y que los quiero mucho por que me han brindado su apoyo, comprensión y sobre todo por darme su amistad gracias Héctor Martín y familia, Norma Alicia, Isrrael, Leopoldo Vilchis.

A mis amigos Lili aunque está ausente físicamente, siempre guardaré un grato recuerdo de ella, por todo el apoyo que me brindo y a Memo aunque también está ausente, hizo que la estancia en el Instituto de Química fuera más alegre.

A mis siempre amigos David, Leonor, Pablo, Hans, Luis, Eradio, Luis Enrique, Nacho, Iupita, Roberto, Mónica, Leticia, Maribel, Rafael, Georgina y Sergio. gracias por su apoyo durante nuestra carrera y por la gran amistad que me han brindado espero que sigamos así por mucho tiempo, quiero compartir uno de nuestros logros que nos fijamos desde que iniciamos la carrera juntos.

A mis maestros Victoria, Rene Miranda, Gabriel Arroyo
que han contribuido en mi formación profesional.

A todas aquellas personas que han convivido cada

Uno de mis días y que han hecho presente su afecto, comprensión y apoyo.

Gracias

CONTENIDO

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS
INDICE DE FIGURAS
INDICE DE ESPECTROS

1.-INTRODUCCIÓN.....	1
2.-GENERALIDADES.	
2.1.-TERPENOS.....	5
2.1.1.-CLASIFICACIÓN DE LOS TERPENOS.....	8
2.2.-FLAVONOIDES.....	10
2.2.1.-BIOGÉNESIS Y BIOSÍNTESIS	13
2.3.-PANORAMA QUIMIOTAXONÓMICO DEL GÉNERO <i>Neurolaena</i>	16
2.3.1.-USOS MEDICINALES DE LA <i>Neurolaena lobata</i>	20
3.-HIPÓTESIS.....	21
4.-OBJETIVOS.....	22
4.1.-GENERALES.	
4.2.-PARTICULARES.	
5.-PARTE EXPERIMENTAL	
5.1.-MATERIALES Y APARATOS.....	23
5.2.-MATERIAL VEGETAL.....	24
5.3.-EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN.....	26
5.3.1.- AISLAMIENTO DE 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).....	26
5.3.2.- OBTENCIÓN DE 7-(3,4,5,6 tetraacetoxi glucosil)-5,6,8,3',4'-penta acetoxi flavona (2).....	27
5.3.3.- OBTENCIÓN DE 5,6,7,8,3',4'- hexahidroxi flavona (3).....	28
5.3.4.- OBTENCIÓN DE 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).....	28
5.3.5.- OBTENCIÓN DE 7-(3,4,5,6 tetraacetoxi glucosil)-3,5,6,3',4'-penta acetoxi flavona (5).....	29
5.3.6.- OBTENCIÓN DE 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavona (6).....	30
5.3.7.- OBTENCIÓN DE 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavona (7).....	30
5.4.- METODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIEDEMATORA EN EL EDEMA INDUCIDO CON TPA.....	35
6.-DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
6.1.- HIERBA AMARGA (<i>Neurolaena lobata</i>).....	37
6.2.- AISLAMIENTO DE UN SEGUNDO COMPUESTO DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	55
6.3.- DISCUSIÓN ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	70
7.-CONCLUSIONES.....	72
8.-LITERATURA CITADA.....	73

ÍNDICE DE ESPECTROS.

Espectro No 1.	Infrarrojo de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).....	37
Espectro No 2.	RMN ¹ H de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).....	39
Espectro No 3.	Masas de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).....	38
Espectro No 4.	Infrarrojo de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).....	43
Espectro No 5.	RMN ¹ H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).....	44
Espectro No 6.	RMN ¹³ C de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).....	46
Espectro No 7.	Masas de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).....	48
Espectro No 8.	Infrarrojo de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3).....	51
Espectro No 9.	RMN ¹ H de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3).....	52
Espectro No 10.	Masas de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3).....	54
Espectro No 11.	Infrarrojo del 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).....	56
Espectro No 12.	Masas del 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).....	55
Espectro No 13.	Infrarrojo del 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavonol (5).....	58

Espectro No 14.	RMN ¹ H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentacetoxi flavonol (5).....	62
Espectro No 15.	Masas del 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavonol (5).....	54
Espectro No 16.	Infrarrojo de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).....	63
Espectro No 17.	RMN ¹ H de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).....	65
Espectro No 18.	Masas de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).....	66
Espectro No 19.	Infrarrojo de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol (7).....	67
Espectro No 20.	RMN ¹ H de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol (7).....	68
Espectro No 21.	Masas de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol (7).....	69

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Unidad monomérica de los terpenos (isopreno).....	6
Figura 2.	Ejemplos del esqueleto del carbono de los terpenos.....	7
Figura 3.	Ejemplo de uniones regulares.....	7
Figura 4.	Asignaciones posicónales en una flavona.....	12
Figura 5.	Biogénesis simplificada de flavonoides.....	13
Figura 6.	Ruta Biosintética de los flavonoides.....	15
Figura 7.	Estructura parcial del compuesto (1).....	40
Figura 8.	Estructura de la 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxiflavona (1).....	41
Figura 9.	Fragmentación tipo Retro Diels-Alder de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxiflavona (1).....	42
Figura 10.	Estructura propuesta para el peracetato (2).....	48
Figura 11.	Fragmentación del compuesto (2).....	50
Figura 12.	Estructura del compuesto 3 (5,6,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona).....	54
Figura 13.	Fragmentación tipo Retro Diels-Alder para la molécula (4).....	57
Figura 14.	Fragmentos del compuesto (5) 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxiflavonol.....	60
Figura 15.	Estructura de 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxiflavonol (5).....	62
Figura 16.	Estructura de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxiflavonol (6).....	66
Figura 17.	Estructura de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxiflavonol (7).....	70

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I.	Clasificación de la <i>Neurolaena lobata</i>	4
Tabla II.	Clasificación de los terpenos de acuerdo con la regla del isopreno.....	8
Tabla III.	Principales grupos estructurales de flavonoides.....	10
Tabla IV.	Compuestos aislados del género <i>Neurolaena</i>	16
Tabla V:	Resultados del porcentaje de inhibición para el compuesto (1).....	36
Tabla VI.	RMN ¹ H de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxiflavona (1).....	40
Tabla VII.	RMN ¹ H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).....	45
Tabla VIII.	Datos de RMN ¹³ C para la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'- pentaacetoxi flavona (2).....	47
Tabla IX.	Datos de RMN ¹ H de 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona 3.....	53
Tabla X.	Datos del espectro de RMN ¹ H del compuesto 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)- 3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavonol 5.....	61
Tabla XI.	RMN ¹ H de la hidrólisis de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxiflavonol (6).....	64
Tabla XII.	RMN ¹ H del producto acetilado de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxiflavonol (7).....	68
Tabla XIII.	Datos del porcentaje de inhibición de la Hierba Amarga (n=3 Ratón TPA).....	71

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

México es uno de los cinco países con mayor diversidad en flora a nivel mundial, ya que se tienen registradas más de 30 mil especies, lo cual ubica al país después de Brasil, Colombia, Perú y Venezuela. Así mismo, ocupa el segundo lugar en variedad de especies de uso medicinal, después de China la cual tiene identificadas más de 3 mil especies¹.

En nuestro país, el conocimiento y uso de la herbolaria como fuente de salud es una costumbre tan arraigada en nuestra sociedad que forma parte de nuestra idiosincrasia. Entre los numerosos ejemplos del uso ancestral de la herbolaria, podemos citar la utilización de diferentes tés, como la manzanilla, el anís estrella tan de uso común en nuestras familias, hasta el empleo de la valeriana, el toloache para filtros de amor o el zapoatle para inducir labores de parto o provocar abortos, a los cuales se ha recurrido desde épocas prehispánicas.

De esta manera nació la herbolaria, rama de la medicina tradicional encargada del estudio de las plantas con valor medicinal y que en nuestro país posee una enorme tradición como se comprueba en el Códice Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indionum Herbis*), el cual es un compendio de remedios tradicionales indígenas².

El primer estudio documentado de la herbolaria indígena es de Martín de la Cruz, quien en 1552 agrupó las plantas de acuerdo a su uso para las dolencias de diversas partes del cuerpo¹.

Por otro lado, Paracelso consideraba las enfermedades como desequilibrios químicos del organismo y utilizaba a las plantas para su curación, manifiesta que las plantas presentaban cierta actividad terapéutica, por la presencia de un principio activo que debía extraerse y utilizarse en lugar de toda la planta⁴.

En los últimos años la química de los productos naturales ha concentrado sus esfuerzos en la localización e identificación de compuestos farmacológicamente activos^{5,6,7}, que se encuentran en las plantas que tienen tradición como medicinales⁸, adquiriendo así valiosa información botánica, quimiotaxonómica⁹, biológica¹⁰, médica¹¹ y agrícola¹².

Los métodos instrumentales analíticos modernos: Espectrometría UV-Visible (UV), Espectrofotometría Infrarroja (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Cromatografía de Gases acoplada a Masas (CG-EM), Difracción de Rayos X (DRx), aplicados al estudio de sustancias aisladas en plantas medicinales usadas desde la época prehispánica, ha conducido a interesantes investigaciones como son el aislamiento y la determinación de la estructura de múltiples principios activos, lo cual ha facilitado la determinación estructural de éstos. Así por ejemplo, el alcanfor, una sustancia ampliamente conocida y usada desde la antigüedad fue estudiada durante 60 años para determinar su estructura correcta. En la actualidad bastarían unas horas para tener éxito ya que se cuenta con la ayuda de las diversas técnicas espectroscópicas.

En la actualidad se ha presentado un inusitado interés de los países más desarrollados en las plantas medicinales, este interés se muestra por la inesperada comercialización bajo el concepto de fitofármacos que son los extractos totales de las plantas con propiedades medicinales.

Sin embargo, es conveniente resaltar que en los países industrializados, el interés por la investigación de las plantas medicinales ha tenido sus altibajos durante las últimas décadas^{11,14}, en contraste con los países del tercer mundo donde continúan siendo fundamentales en los tratamientos médicos. Aproximadamente el 25 % de los medicamentos prescritos en la actualidad son sustancias extraídas de las plantas, por lo que varias compañías farmacéuticas han mostrado un renovado interés en las mismas como una fuente de nuevas estructuras para el desarrollo de fármacos. De las 250 000 a 500 000 especies de plantas existentes en el mundo, únicamente un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y la fracción estudiada con fines biológicos o farmacológicos es aun menor¹⁵. Sin embargo, cuando a un producto natural se le determina su actividad biológica, comúnmente se le modifica químicamente y se ensaya posteriormente con el objeto de obtener un compuesto más activo que produzca las acciones esperadas¹⁶, procurándose una disminución de los efectos no deseables. Sin embargo este proceso es muy largo ya que uno de cada 10 000 compuestos estudiados es modificado a un nuevo fármaco, se tardará un periodo de investigación de aproximadamente 10 años^{17,18} para lograr los efectos deseados.

Una de las familias más grandes en el reino vegetal son las Compuestas, la cual consta de aproximadamente 1310 géneros y 13000 especies, están divididas en trece tribus. Dentro de esta familia encontramos al género *Neurolaena*; y dentro de este género se clasifica la especie *Neurolaena lobata*^{19,20}, la cual ha sido usada como planta medicinal popular y estimulante, como se muestra en la tabla I.

Tabla I. Clasificación de *Neurolaena lobata*.

DISTRIBUCIÓN:	CUETZALÁN DEL PROGRESO (OXQUIHUI)
TIPO DE VEGETACIÓN:	POTRERO, ACAHUAL.
ABUNDANCIA:	REGULAR.
FORMA DE VIDA:	ARBUSTO.
ORIGEN:	SUR DE MÉXICO, COLOMBIA, PERÚ Y CARIBE.
DESTINO:	CONSUMO DOMÉSTICO.
GRADO DE MANEJO:	SILVESTRE.
MODO DE EMPLEO:	EN CUETZALÁN SE APLICA EN LOS SABAÑONES EL JUGO DE LA PLANTA.

La finalidad de este trabajo es la evaluación anti-inflamatoria de la *Neurolaena lobata* y aislar los posibles metabolitos secundarios responsables de la actividad antiflogística de esta especie.

GENERALIDADES

2.- GENERALIDADES

El estudio de los Productos Naturales no se reduce sólo al estudio de la flora con propósitos medicinales, sino también se emplea en la vida cotidiana con otros fines, por ejemplo en las industrias, textil, cosmética y alimenticia.

El término Producto Natural es entendido por los químicos como un sinónimo de metabolito secundario, usualmente de origen vegetal de estructura relativamente compleja, los cuales tienen una distribución restringida y que son elaborados a partir de los metabolitos primarios. Por otro lado, los productos del metabolismo primario de la planta comprenden sustancias simples de distribución universal, como por ejemplo los ácidos carboxílicos de peso molecular bajo provenientes del ciclo de Hans Krebs, los veinte aminoácidos que dan lugar a sus proteínas, las grasas y lípidos comunes, los azúcares y sus derivados. Estas sustancias son de materia prima para la elaboración de compuestos más complejos (metabolitos secundarios) producidos en reacciones específicas, genéticamente controladas y catalizadas enzimáticamente. Varias hipótesis se han propuesto para explicar la función que cumplen los metabolitos secundarios en el organismo que los sintetizan, una de ellas es considerar a estos compuestos como material de desecho²¹.

2.1.-TERPENOS.

Estos compuestos constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios que, se encuentran almacenados en grandes cantidades en ciertas plantas, esta abundancia ha despertado un cierto interés taxonómico²².

Algunos terpenos se encuentran unidos a otras sustancias como: azúcares, ésteres de ácidos orgánicos y en otros casos con algunas proteínas²³.

Los miembros más sencillos de ésta clase de entidades químicas (C_{10} y C_{15}), suelen ser obtenidos tanto en plantas frescas como secas por arrastre de vapor, mientras que los integrantes de mayor peso molecular son generalmente aislados por extracción con disolventes.

Los terpenoides son compuestos cíclicos y/o acíclicos cuyas formas moleculares son múltiplos de C_5H_8 . Generalmente se incluyen en esta clasificación a los alcoholes, aldehídos, cetonas y otros derivados, tanto naturales como sintéticos que posean el mismo esqueleto carbonado del hidrocarburo **terpénico** fundamental. Se ha propuesto que la unidad monomérica de los terpenos es el isopreno ó 2-metil-1,3-butadieno (figura 1).

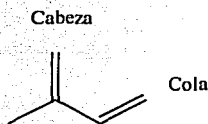


Figura 1.- Unidad monomérica de los terpenos (isopreno).

En la tabla II se indica la clasificación de los terpenos tomando en cuenta las unidades isoprenicas de las estructuras esta clasificación se conoce como la regla del isopreno que fue propuesta por Ruzicka²⁴.

Esta regla establece que el esqueleto del carbono de los terpenos está compuesto de unidades isoprenicas unidas en un arreglo regular y formado por uniones cabeza-cola ó cola-cabeza; también existen uniones irregulares como son las uniones cola-cola ó cabeza-cabeza.



Figura 2. Ejemplos del esqueleto del carbono de los terpenos.

Ejemplos de uniones regulares son el geraniol (C-10), farsenol (C-15) y geranilgeraniol (C-20).

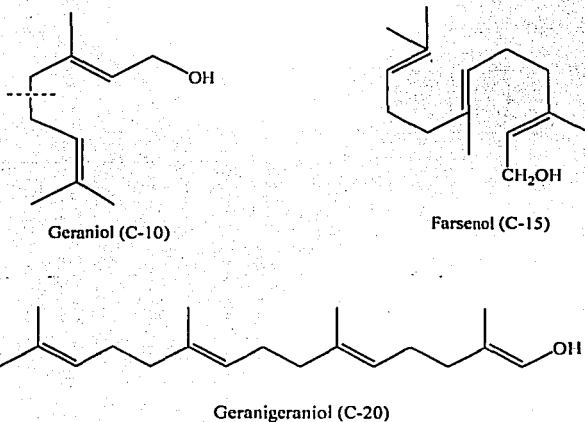
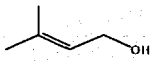
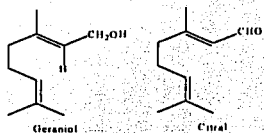
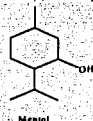

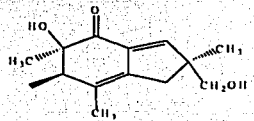
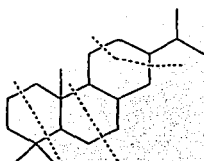
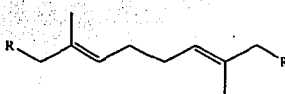
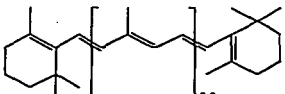
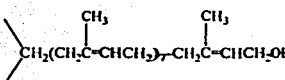


Figura 3.- Ejemplo de uniones regulares.

Tabla II.-Clasificación de los terpenos de acuerdo con la regla del isopreno .

NÚMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO (C)	NÚMERO DE UNIDADES ISOPRÉNICAS (U)	GRUPO.	FUENTE.
5	1	Hemiterpenos	Isopreno, 3,3-dimetil alil alcohol, isopenteno  3,3-dimetil-alcohol
10	2	Monoterpenos	Acíclicos, los más importantes son: Geraniol (es uno de los principales componentes del aceite de rosas) y Citral.  Geraniol Citral Monocíclico muy conocido es el (-)-mentol que se obtiene a partir del aceite de menta.  Mentol Bifcíclicos los más importantes son: Tujano, Pinano, Camfano y Fecano.  Tujano
15	3	Sesquiterpenos	Aquí se presenta uno de los sesquiterpenos:  Hudesin-S

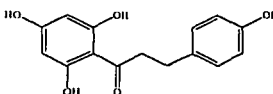
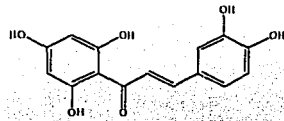
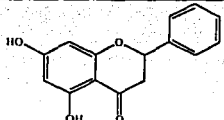
GENERALIDADES

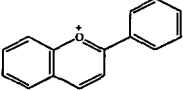
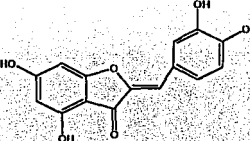
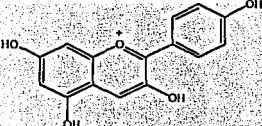
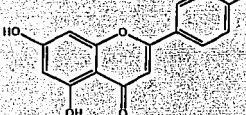
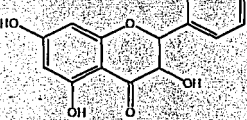
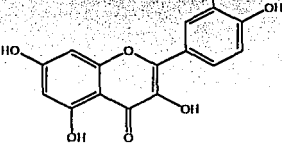
NÚMERO DE ATOMOS DE CARBONO (C)	NÚMERO DE UNIDADES ISOPRÉNICAS (UI)	GRUPO	FUENTE
20	4	Diterpenos	<p>En los diterpenos el esqueleto del ácido abietico es una excepción, por tener tres unidades de isopreno arregladas cabeza-cola como el farseno y su cuarta unidad isoprenica de forma irregular</p>  <p>Acido abietico Estructura irregular de diterpeno</p>
30	6	Triterpenos	<p>Escualeno, esteroides, triterpenos pentacíclicos.</p>  <p>Escualeno R'' Pirofosfato de geranilo (16)</p>
40	8	Tetraterpenos	<p>Carotenos (se obtienen de las zanahorias, poseen un gran número de dobles enlaces conjugados por lo que son sustancias coloreadas), Xantofilas.</p>  <p>Caroteno</p>
(5) _n	n>8	Politerpenos	<p>Solanesol, Ficaprenol, etc.</p>  <p>Solanesol</p>

2.2.- FLAVONOIDES.

Los flavonoides son metabolitos secundarios que ocupan una posición prominente entre los fenoles de las plantas superiores. Son compuestos de 15 átomos de carbono, que poseen compuestos de dos anillos fenólicos conectados por una unidad de tres carbonos (sistemas $C_6-C_3-C_6$ como estructura base), siendo en consecuencia el 1,3-difenil propano (1) su esqueleto fundamental. Se ha demostrado que los flavonoides provienen de la unión de las rutas del ácido shiquímico y del acetato del ácido mevalónico ó mevalonato de acetilo. La variación del estado de oxidación de la cadena de tres carbonos, determina las diversidades estructurales de cada uno de los componentes de esta familia de entidades químicas. Así de acuerdo con el grado de oxidación antes mencionado suelen generarse los diferentes miembros de esta familia²⁵ (clasificación de los flavonoides) como se muestra en la Tabla III.

Tabla III.-Principales grupos estructurales de flavonoides.

GRUPO ESTRUCTURAL	ESTRUCTURA GENERAL	GRADO DE OXIDACIÓN
Dihidrochalconas.		2
Chalconas.		4
Flavanonas.		3

GRUPO ESTRUCTURAL	ESTRUCTURA GENERAL	GRADO DE OXIDACIÓN
Sal Flavilium.		4
Aurona.		4
Antocianina.		4
Flavonas.		4
Dihidriflavonoles.		4
Flavonol.		5

En la serie anteriormente mencionada los núcleos aromáticos suelen encontrarse sustituidos comúnmente por: -OH, -OCH₃ u O-ósido. En los flavonoides, glicosídicos, las agliconas pueden ser: flavonas hidroxiladas, flavonoles, biflavonoles, auronas y chalconas, los cuales son muy polares y por lo tanto en general se obtienen desde la planta por extracción con acetona, alcohol, agua o una combinación de éstos. A continuación se presenta la numeración de las diferentes posiciones de las flavonas, incluyendo la designación de los diferentes anillos²⁶ (figura 4).

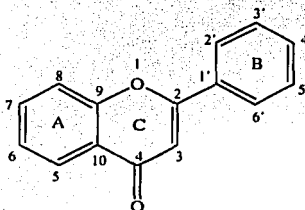


Figura 4.- Asignaciones posicionales en una flavona.

2.2.1.-BIOGÉNESIS Y BIOSÍNTESIS:

Los flavonoides se sintetizan por diversas plantas y excepcionalmente algunas flavonas se localizan en las alas de algunas mariposas. Los flavonoides se originan de unidades de acetato por intermediario fenil-propanoide derivado de la ruta del ácido shiquímico. Están formados por tres anillos, el anillo A está formado por la condensación cabeza-cola de tres unidades de acetato y el anillo B, formado del precursor fenil-propanoide (figura 5) como se muestra:

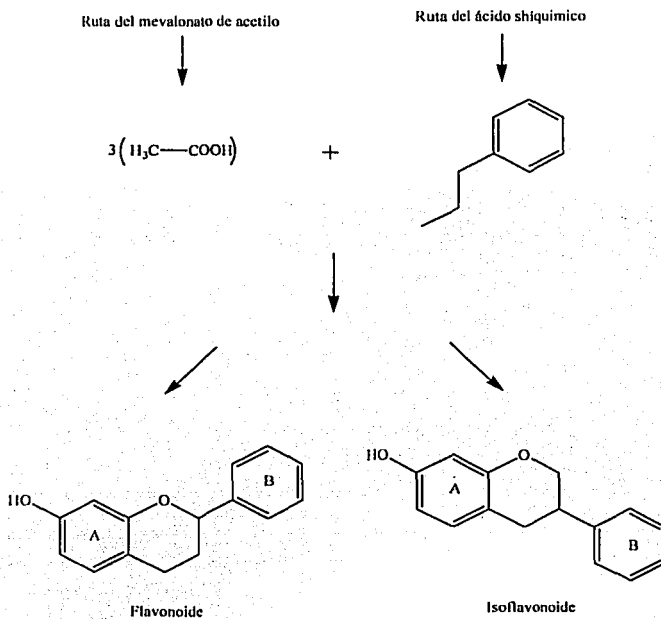
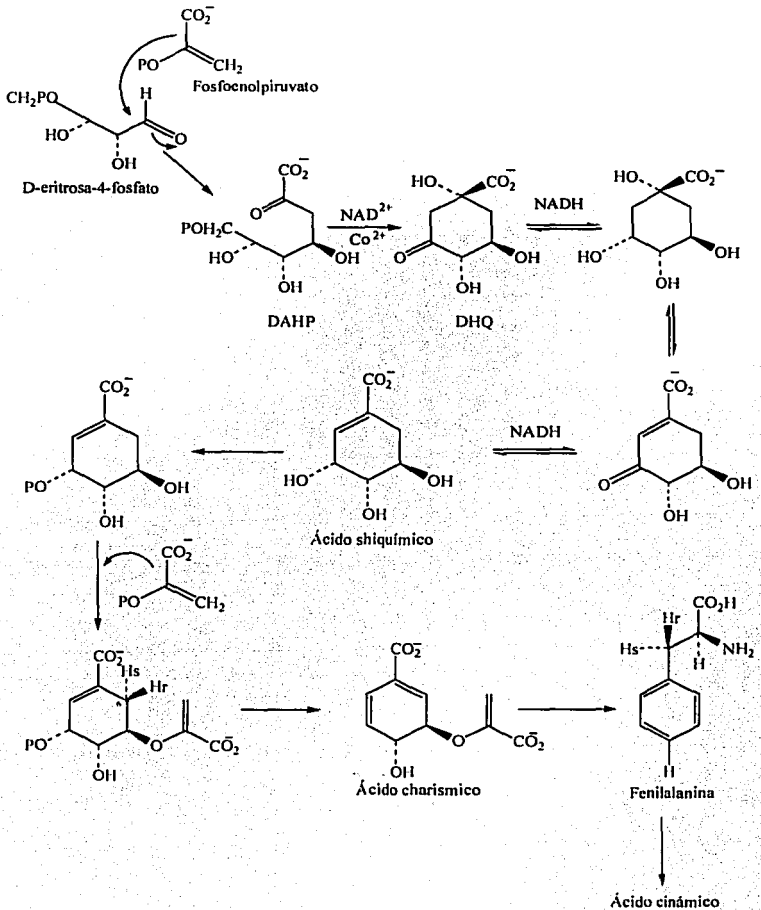


Figura 5.- Biogénesis simplificada de flavonoides.

En la figura 6 se desglosa con mayor detalle la ruta biosintética de los flavonoides a partir del fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa fosfato.



Continua.

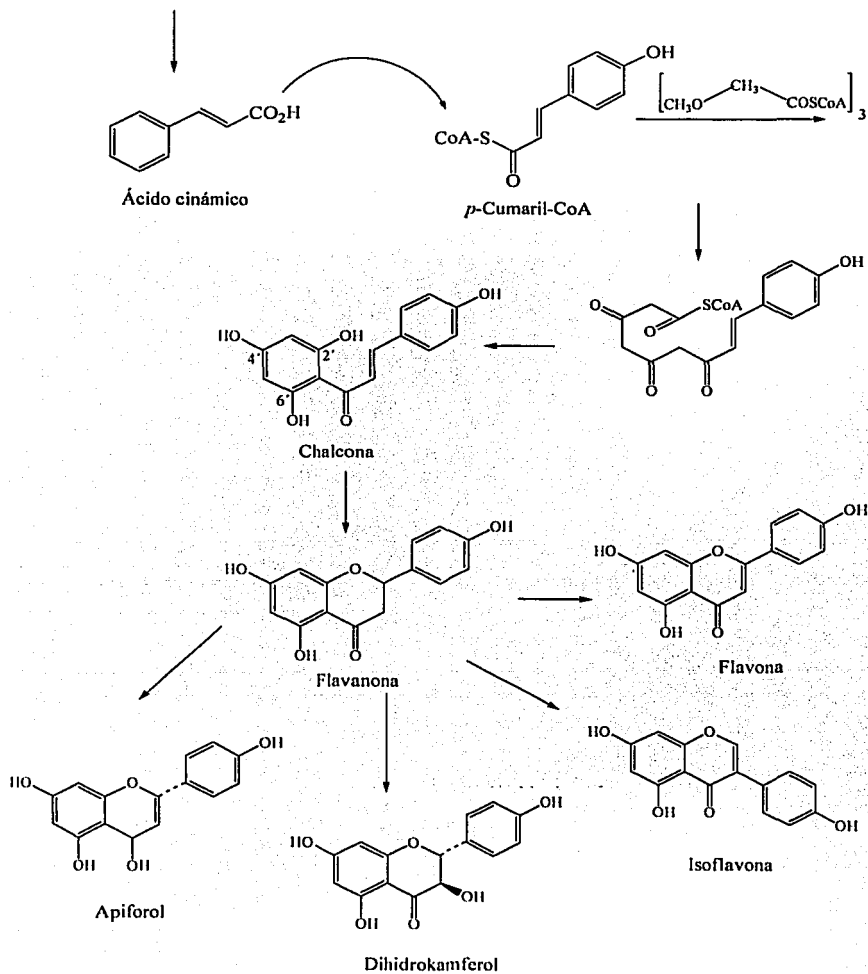
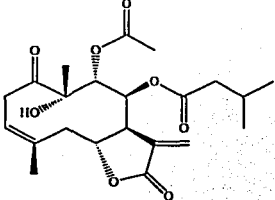
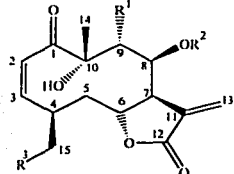
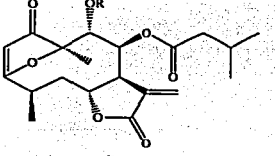
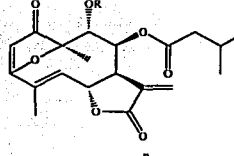


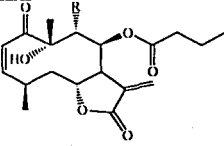
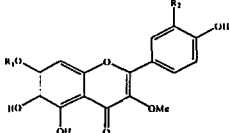
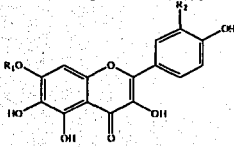
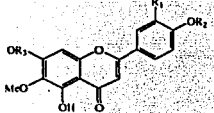
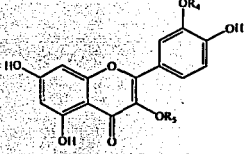
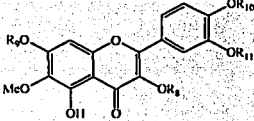
Figura 6.- Ruta Biosintética de los flavonoides.

2.3.-PANORAMA QUIMIOTAXONÓMICO DEL GÉNERO *Neurolaena*

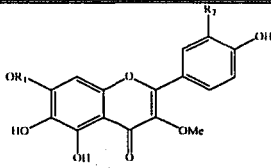
La *Neurolaena lobata* es una planta herbácea que se ubica desde el sureste de México hasta el Sur de América, incluyendo las islas del Caribe. Existen numerosos informes acerca de la composición química de diversas especies del género *Neurolaena*. En la tabla IV se muestra algunos, ejemplos de compuestos aislados en este género.

Tabla IV. Compuestos aislados del género *Neurolaena*.

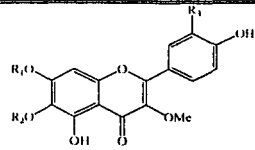
ESPECIE	COMPUESTOS AISLADOS																						
<p><i>Neurolaena lobata</i>^{27,28,33}</p>		 <table border="0" data-bbox="668 638 875 772"> <tr> <td>R¹</td> <td>R²</td> <td>R³</td> </tr> <tr> <td>1 H</td> <td>ival</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>2 OAc</td> <td>ival</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3 O ival</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>4 OH</td> <td>ival</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>5 OAc</td> <td>ival</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>6 OAc</td> <td>5-OH +</td> <td>ing H</td> </tr> </table>	R ¹	R ²	R ³	1 H	ival	H	2 OAc	ival	H	3 O ival	H	H	4 OH	ival	H	5 OAc	ival	H	6 OAc	5-OH +	ing H
	R ¹	R ²	R ³																				
1 H	ival	H																					
2 OAc	ival	H																					
3 O ival	H	H																					
4 OH	ival	H																					
5 OAc	ival	H																					
6 OAc	5-OH +	ing H																					
 <p>R H Ac</p>	 <p>R H Ac</p>																						

<p><i>Neurolaena lobata</i>^{27,28,33}</p>	 <p>R = H <i>Neurolina A</i> R = O-C(=O)-CH₂-CH₂-CH₂ <i>Neurolina B</i></p>	 <p>R₁ SO₃ R₂ OH Me OH</p>																																				
<p><i>Neurolaena macrocephala</i>²⁹</p>	 <p>R₁ Me R₂ OH quercetagenin 7-glucosido.</p> <p>Esta especie ha sido colectada en Atzalan, la Calavera, Veracruz, México en marzo de 1979.</p>																																					
<p><i>Neurolaena venturana</i>^{30,31}</p>	 <table border="1" data-bbox="383 806 533 866"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Pectolmargonia</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>Sabugomus</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>Lepidobea</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Cervantes</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>Epapanon</td> <td>OH</td> <td>Me</td> <td>Me</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	Pectolmargonia	H	H	Me	Sabugomus	H	Me	Me	Lepidobea	OH	H	H	Cervantes	OH	H	Me	Epapanon	OH	Me	Me	 <table border="1" data-bbox="678 840 890 893"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₄</th> <th>R₅</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Quercetin 3-Gal-Rha</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Ruzic</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Isohanmetin 3-Gal</td> <td>Me</td> <td>Me</td> </tr> </tbody> </table> <p>R₄ Gal-Rha R₅ Gal-Rha Me Gal</p>		R ₄	R ₅	Quercetin 3-Gal-Rha	H	H	Ruzic	H	H	Isohanmetin 3-Gal	Me	Me
	R ₁	R ₂	R ₃																																			
Pectolmargonia	H	H	Me																																			
Sabugomus	H	Me	Me																																			
Lepidobea	OH	H	H																																			
Cervantes	OH	H	Me																																			
Epapanon	OH	Me	Me																																			
	R ₄	R ₅																																				
Quercetin 3-Gal-Rha	H	H																																				
Ruzic	H	H																																				
Isohanmetin 3-Gal	Me	Me																																				
 <table border="1" data-bbox="461 1068 657 1108"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₇</th> <th>R₈</th> <th>R₉</th> <th>R₁₀</th> <th>R₁₁</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Casticin</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>Asmetin</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>Me</td> </tr> </tbody> </table>				R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁	Casticin	Me	Me	Me	Me	Me	Asmetin	Me	Me	Me	Me	Me																		
	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁																																	
Casticin	Me	Me	Me	Me	Me																																	
Asmetin	Me	Me	Me	Me	Me																																	

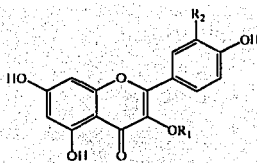
Neurolaena
*óaxacana*¹²



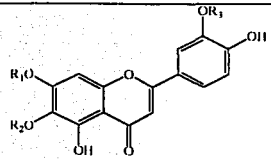
R ₁	R ₂
Me	H
H	OH
glc	H
glc	OH
SO ₃	H
	OH



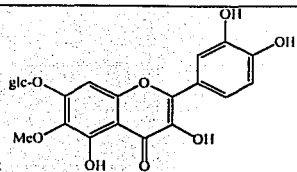
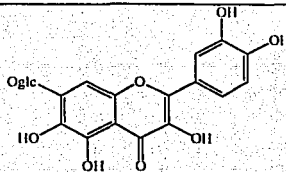
R ₁	R ₂	R ₃
H	Me	OH
Me	gal	OH
H	H	glc

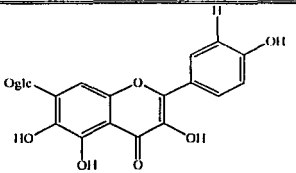
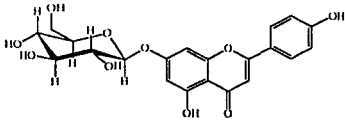
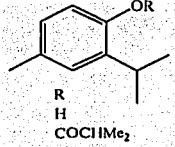
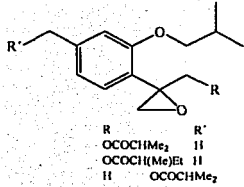
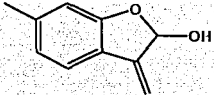
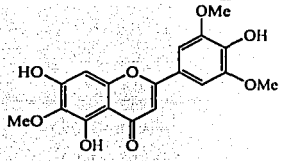
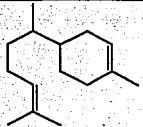
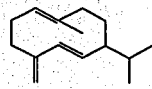


R ₁	R ₂
Me	OH
glc	H



R ₁	R ₂	R ₃
H	H	Me
glc	H	H



<p><i>Neurolaena macrophylla greenm¹⁴</i></p>		
<p><i>Neurolaena lobata^{15,16}</i></p>		
		
<p><i>Neurolaena kohlenwa- sserstoffe¹⁸</i></p>		
<p><i>Neurolaena spp.</i></p>	<p>HCCH₂CH=CH(C≡C)₂CH₂CH=CH(CH₂)₃CH=CH₂ HCCH₂CH₂CC(C≡C)₂CH₂CH=CH(CH₂)₃CH=CH₂</p>	

De acuerdo con estos resultados, es fácil deducir que el género *Neurolaena* se caracteriza por la presencia de lactonas sesquiterpénicas, flavonoides y timoles.

2.3.1.- USOS MEDICINALES DE LA *Neurolaena lobata*.

En América Central, el Sur de México y el norte de Sudamérica incluyendo las islas del Caribe la *Neurolaena lobata*, se ha utilizado de manera popular para la malaria, cáncer y disentería. Por otro lado en Guatemala y Costa Rica es conocida como repelente de insectos. Recientemente se ha publicado la acción antialimentaria de algunas lactonas sesquiterpénicas que produce esta especie⁴⁵, así como inhibitorias del factor de transcripción NF-KB, factor que está relacionado con procesos inflamatorios⁴⁶.

HIPÓTESIS

3.- HIPÓTESIS

Dado que la *Neurolaena lobata* tiene antecedentes etnobotánicos como planta medicinal y es usada como remedio contra inflamaciones, se espera aislar e identificar algunos metabolitos secundarios que sean responsables de esta actividad.

OBJETIVOS

4.- OBJETIVOS

4.1.-GENERAL:

AI SLAM I ENTO, DETERMINAC I ON ESTRUCTURAL Y ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS, DE *Neurolaena lobata* POSIBLES RESPONSABLES DE LA ACC I ON ANTI FLOG I STICA DE ESTA ESPECIE.

4.2.-PARTICULARES:

1. EVALUAC I ON DE LA ACTIVIDAD ANTI FLOG I STICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA PARTE A EREA DE LA *Neurolaena lobata*.
2. AI SLAM I ENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS POSIBLES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA.
3. DETERMINAC I ON ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE LAS T E CNICAS ESPECTROSCOPICAS USUALES COMO IR, RMN ¹H, RMN ¹³C Y EM.
4. EVALUAC I ON DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS COMO AGENTES ANTI-INFLAMATORIOS.

**PARTE
EXPERIMENTAL**

5.- PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- MATERIALES Y APARATOS.

La separación y purificación de los productos (metabolitos secundarios) y el seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) con sílica gel Merck F-24; y cromatografía en columna (CC) con sílica gel 60 Merck (70-230 Mesh ASTM) utilizando como reveladores: disolución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N, vapores de yodo y/6 luz ultravioleta. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns; y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Mod. 337 en solución cloroformica o en suspensión con nujol. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13 (RMN ^1H y RMN ^{13}C) se realizaron en dos espectrómetros FT-80 Varian, y HA-300 Varian respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) de manera interna. Los patrones de acoplamiento se expresaron de la manera siguiente: (s) señal simple, (d) señal doble, (dd) señal doble de doble, (t) señal triple, (q) señal cuádruple, (m) señal múltiple y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz.

Los espectros de masas (EM) fueron determinados en un espectrómetro Hewlett Packard 598-5B con un sistema GC/EM, mediante la técnica de fragmentación de impacto electrónico a 70 eV.

5.2.- MATERIAL VEGETAL.

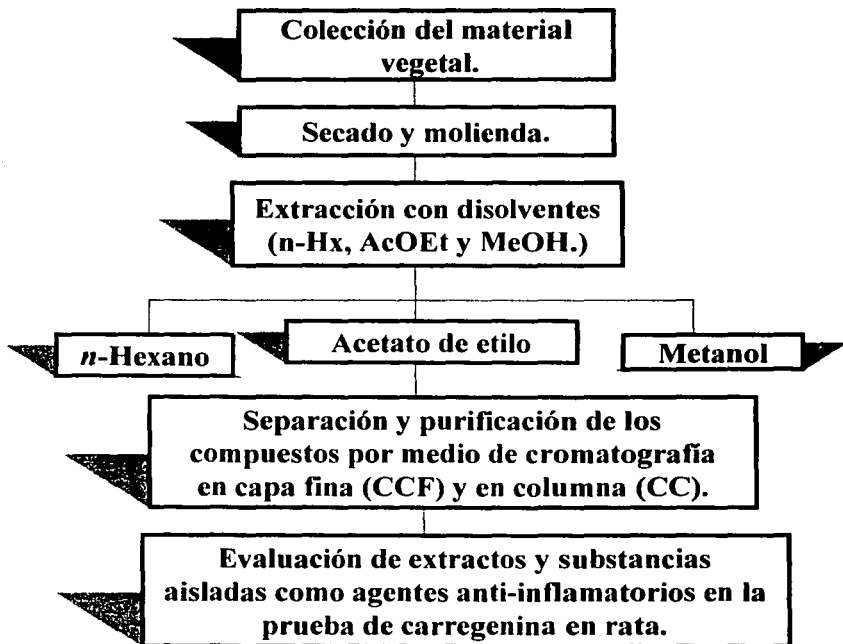
La parte aérea de la *Neuroleena lobata* fue colectada entre los municipios de Tepetitán y Cuetzalan, así como en los alrededores del poblado de San Pablito, todos ubicados en la Sierra Norte del Estado de Puebla. Un espécimen de herbario (FB 1667) fue depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El material vegetal se sometió a extracciones sucesivas con tres disolventes de polaridad ascendente (*n*-hexano, AcOEt, MeOH) a temperatura ambiente y los extractos fueron concentrados a presión reducida, trabajándose por separado para el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la planta.

5.3.- EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN.

La metodología usada para la extracción de los metabolitos secundarios está representada en el siguiente diagrama de flujo.

DIAGRAMA DE FLUJO.



La parte aérea de la planta *Neurolaena lobata*, seca y molida (502 g), se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 Lt y se realizaron extracciones a temperatura ambiente, empleando sucesivamente disolventes de polaridad ascendente, primero se utilizó *n*-hexano (Hx), posteriormente acetato de etilo (AcOEt), y por último metanol (MeOH).

El extracto metanólico se cromatografió en una columna abierta empacada con gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de Hx / AcOEt de polaridad creciente hasta AcOEt 100%. Posteriormente se eluyó con mezclas AcOEt / MeOH hasta MeOH 100%.

5.3.1.- Aislamiento de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).

De las fracciones eluidas con Hx / AcOEt (3: 1), se aisló un producto amorfo de color verde el cual se purificó mediante cristalización con una mezcla de Hx / AcOEt (1:1) lográndose aislar 6.47 g del compuesto 1 con un punto de fusión 205-210 °C y un valor de rotación específica $[\alpha]_D^{25} = -4.6^\circ$. Los datos espectroscópicos para este producto son los siguientes:

IR (Película KBr) ν máx: 3365.62 cm^{-1} (banda ancha OH); 1662 cm^{-1} (C=O); 1604 y 1568 cm^{-1} (C=C Ar.); 1074 cm^{-1} (C-O), (ESPECTRO 1).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): 5-3 ppm (señales de un residuo de azúcar), 7.71 ppm (d, $J=2.4$ Hz) 7.54 ppm (dd, $J=2.4$ y 8.5 Hz), 6.90 ppm (d, $J=8.5$ Hz), 6.53 ppm (s), 5.22 ppm (d, $J=3.3$ Hz), (ESPECTRO 2).

EM m/z (% ar.): FAB $^+$: 519 [M + K] $^+$, 345(14); 192(100); 154(40); 39(60), (ESPECTRO 3).

El producto 1 resultó una estructura novedosa.

5.3.2.- Obtención de 7-(3,4,5,6 tetraacetoxi glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).

A 150 mg del compuesto 1 se le adicionó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético dejándose reaccionar por 24 hrs con agitación constante. Transcurrido este tiempo se le adicionó agua a la mezcla de reacción y se procedió a realizar tres extracciones porciones de 10 mL de AcOEt, las cuales posteriormente se reunieron. La fracción orgánica se lavó primero con ácido clorhídrico al 10 % (3x10 mL) para eliminar el exceso de piridina y posteriormente con una solución saturada de bicarbonato de sodio al 10 % (3 x 10 mL), en seguida se lavó con agua (3x10 mL), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida, obteniéndose un producto aceitoso. El producto de reacción se separó mediante cromatografía en columna empacada con gel de sílice empleando inicialmente como eluyente una mezcla Hx / AcOEt (9:1) en polaridad ascendente donde se obtuvo un producto sólido de color grisáceo amorfo y que se recrystalizó con Hx / CH₂Cl₂. De esta forma se obtuvo el peracétato del compuesto 2 esperado; con punto de fusión 214-218 °C. Los datos espectroscópicos son los siguientes:

IR (CDCl₃) ν máx.: 2920.79 cm⁻¹ (C-H); 1753.91 cm⁻¹ (C=O); 1639 cm⁻¹ (C=C Ar.); 1039.2 cm⁻¹ (C-O-C), (ESPECTRO 4).

RMN ¹H (300 MHz) : 7.66 ppm (dd, J=1.8 y 8.4 Hz), 7.62 ppm (d, J=1.8 Hz), 7.35 ppm (d, J=8.4 Hz), 7.02 ppm (s), 5.32 ppm (d, J=3.3 Hz), 5.3 a 2.0 ppm (residuos de azúcar acetilada), (ESPECTRO 5).

EM m/z (% ar.): FAB⁺ 881 [M⁺ + Na]; 859 [M⁺ + H]; 487(33); 331(50); 211(24); 169(100); 109(52); 55(48); 43(49), (ESPECTRO 7).

5.3.3.- Obtención de 5,6,7,8,3',4'- hexahidroxi flavona (3).

Se disolvieron 50 mg del compuesto 2 en 20 mL de MeOH y 10 mL de H₂SO₄ 4 N. La mezcla resultante se dejó a reflujo durante 24 hrs. con agitación constante. Transcurrido este tiempo, a la mezcla de reacción se le realizó una extracción con AcOEt. La fracción orgánica se lavó (3x10 mL) con una solución de bicarbonato de sodio al 10 %, agua y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente fue eliminado a presión reducida obteniéndose así un sólido amarillo el cual se recrystalizó empleando una mezcla de Hx / CH₂Cl₂ el producto obtenido 3 presentó un punto de fusión de 180-182 °C. Los datos espectroscópicos para este producto son los siguientes:

IR (CH₂Cl₂) ν máx.: 33490 cm⁻¹(OH); 2924.292 cm⁻¹(-CH₂); 2957.074 cm⁻¹(-CH₃); 1661.826 cm⁻¹(C=O); 1028.224 cm⁻¹(C-O), (ESPECTRO 8).

RMN ¹H (300 MHz): 7.74 ppm (d, J=2.1 Hz), 7.59 ppm (dd, J=8.7 y 2.1 Hz), 6.90 ppm (d, J=8.7 Hz), 6.48 ppm (s), (ESPECTRO 9).

EM m/z (ab. rel.) 318 M⁺; 302(33); 289(20); 154(5); 137(100); 109(32); 83(57); 66(48); 43(75); 41(32), (ESPECTRO 10).

5.3.4.- Obtención de 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).

En las fracciones de la columna abierta empacada con silica gel, eluida con MeOH 100% se obtuvo un producto el cual fue purificado mediante cristalización en una mezcla Hx / AcOEt obteniéndose así 5.24 g del compuesto 4 presentando un punto de fusión de 207-210°C. Los datos espectroscópicos para este producto son los siguientes:

IR (pastilla KBr) ν máx.: 3322.1 cm⁻¹(banda ancha de OH); 1665.0 cm⁻¹(C=O); 1492.7 cm⁻¹(C=C Ar); 1074.3 cm⁻¹(C-O), (ESPECTRO 11).

EM m/z (% ar): FAB⁺: 480 [M⁺], (331) 95; (257) 9; (211) 35; (150) 100; (127) 15; (109) 30, (ESPECTRO 12).

5.3.5.- Obtención de 7-(3,4,5,6 tetraacetoxi glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavona (5).

A 100 mg del compuesto 4 se le adicionó 1mL de piridina y 1mL de anhídrido acético dejándose reaccionar por 24 hrs. con agitación constante. Transcurrido este tiempo se le adicionó agua y se procedió a extraer con tres porciones de 10 mL de acetato de etilo, las cuales se reunieron al final. La fracción orgánica se lavó en tres ocasiones con porciones de 10 mL de ácido clorhídrico al 10 % para eliminar el exceso de piridina y posteriormente con una solución saturada de bicarbonato de sodio al 10 % (3 veces). Enseguida se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida.

El producto de la reacción se separó mediante una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice empleando como eluyente una mezcla Hx / AcOEt (9:1), obteniéndose un sólido de color blanco amorfo que se cristalizó con Hx / CH₂Cl₂. De esta forma se obtuvo el peracetato del compuesto 5 -esperado; con punto de fusión 222-230°C. Cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

IR (CDCl₃) ν máx.: 3394.5 cm⁻¹ (banda de OH), 1759.0 cm⁻¹ (C=O), 1643.4 cm⁻¹ (C=C), 1371.0 cm⁻¹ (-COOH), 1176.2 cm⁻¹ (C-O), (ESPECTRO 13).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): 7.023 ppm (s), 7.65 ppm (dd, J=2.1, 8.4 Hz), 7.62 ppm (d, J=2.1 Hz), 7.34 ppm (d, J=8.4 Hz), 2.42 al 2.021 ppm (Protones del acetato), (ESPECTRO 14).

EM m/z (% ar): FAB 859 [M+ H]⁺; (529) 9; (487) 32; (445) 18; (331) 35; (289) 20; (154) 100, (ESPECTRO 15).

5.3.6.- Obtención de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxiflavona (6).

Se disolvieron 50 mg. del compuesto 5 en 20 mL de metanol y 10 mL de ácido sulfúrico 4 N. La solución resultante se mantuvo en reflujo durante 24 hrs. con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se procedió a extraer la mezcla de reacción empleando una mezcla de acetato de etilo; la fracción orgánica se lavó con bicarbonato de sodio al 10 % y con agua en tres ocasiones, posteriormente se secó con NaSO₄ anhidro y se concentró a presión reducida.

Se obtuvo un sólido amarillo el cual se cristalizó con Hx / CH₂Cl₂, obteniéndose así el compuesto 6 que presentó un punto de fusión de 230-234 °C.

IR.(KBr), v. máx. 3391.175 cm⁻¹ (banda -OH), 1661.239 cm⁻¹ (C=O), 1602.426 cm⁻¹ (C=C ar), 1032.015 cm⁻¹ (C-O), (ESPECTRO 16).

RMN ¹H (300 MHz, CCl₄); 6.40 ppm (s), 6.87 ppm (d, J=8.4 Hz), 7.52 ppm (dd, J=2.1,8.4 Hz), 7.65 ppm (d, J=2.1 Hz), (ESPECTRO 17).

IE m/z (ar. Rel.) 318 (100) M⁺; (302) 18; (273) 8; (245) 7; (169) 6; (123) 4, (ESPECTRO 18).

5.3.7.- Obtención de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxiflavona (7).

A 40 mg. del compuesto 6, se le adicionó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, dejándose reaccionar durante 24 hrs. con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se le adicionó agua y se procedió a extraer con tres porciones de 10 mL de acetato de etilo, las cuales se reunieron al final. La fracción orgánica se lavó en tres ocasiones con porciones de 10 mL de ácido clorhídrico al 10 %, se secó con sulfato de sodio anhidro concentrándose posteriormente a presión reducida.

Al producto obtenido se le realizó una cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice empleando como eluyente una mezcla de Hx / AcOEt de polaridad ascendente iniciando la elusión con una mezcla (9:1) obteniéndose un producto sólido de color amarillo claro amorfo que se cristalizó en una mezcla de Hx /CH₂Cl₂.

De esta forma se obtuvo el esperado peracetato del compuesto **7**, con punto de fusión 196-199 °C. Cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

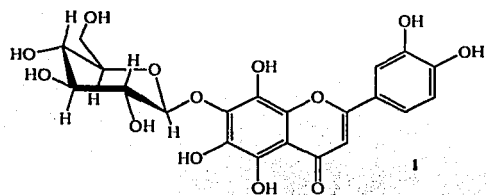
IR (pastilla KBr) ν máx.: 1780.7 cm⁻¹ (C=O); 1654.7 cm⁻¹ (ar. C=O); 1010.5 cm⁻¹ (C-O), (ESPECTRO 19).

RMN ¹H (300 MHz CCl₄), 7.46 ppm (s), 7.70 ppm (d, *J*=2.1 Hz), 7.67 ppm (dd, *J*=2.1 Hz y *J*=8.4 Hz); 7.33 ppm (d, *J*=8.4 Hz), (ESPECTRO 20).

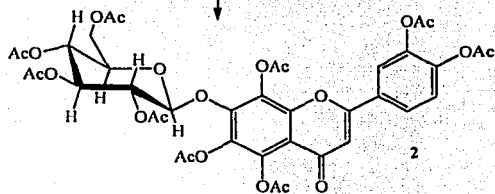
IE m/z (ar. Rel.) M⁺ 570 (3), 528 (47), 486 (78), 444 (100), 402 (55), 360 (38), 318 (32), 43 (22), (ESPECTRO 21).

Partiendo de las reacciones que se le realizaron al compuesto **1** se obtuvieron los siguientes compuestos como se muestra a continuación:

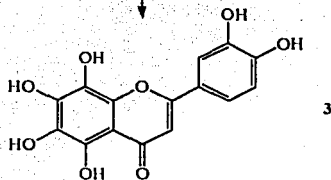
Reacciones del 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (**1**)



Anh. acético/piridina

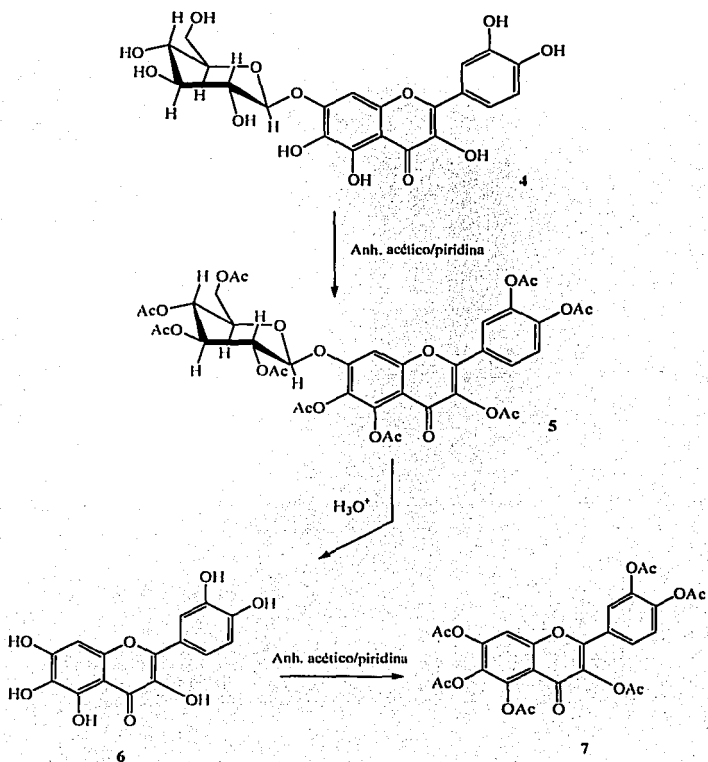


H₃O⁺

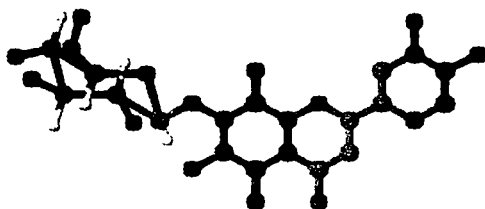


Partiendo de las reacciones que se le realizaron al compuesto **4** se obtuvieron los siguientes compuestos como se muestra a continuación:

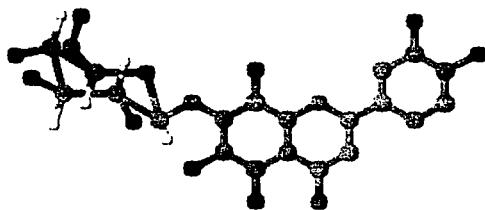
Reacciones del 7-glucosil-5,6,3',4'-pentahidroxi flavona (**4**)



Principales estructuras de los compuestos aislados 1 y 4 de la *Neurolaena lobata*.



Estructura de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).



Estructura del 7-glucosil-5,6,3',4'-pentahidroxi flavona (4).

5.4.-MÉTODO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIEDEMATORA EN EL EDEMA INDUCIDO CON TPA.

El ensayo del edema en la oreja de ratón inducido con TPA fue realizado tomando en cuenta el método de Tubaro y Gómez^{41,42}. En este estudio se trabajaron con grupos de cinco ratones machos CD-1 (25-30 g) los cuales fueron anestesiados con Imalgen ®. Una disolución de 13-acetato-12-O-tetradecil forbol (TPA 2.5 µg) en etanol 10 µl fue típicamente aplicada a la superficie interna y externa de la oreja derecha por medio de una microjeringa. La oreja izquierda recibió solamente 10 µL de etanol.

El extracto y los productos se administraron por vía intraperitoneal 30 minutos antes de aplicar tópicamente el TPA. Las concentraciones a probar fueron de 1, 3.1, 10, 31 y 100 mg/Kg de peso. Los grupos controles recibieron solamente metil celulosa (20 µL) y el grupo testigo recibió indometacino disuelto en la dosis especificadas anteriormente, cuatro horas después los animales fueron tomadas con un sacabocados y posteriormente pesados, lo diferencia en peso de esta porción central tomando como una medida de la respuesta anti-edematosa.

El porcentaje de inhibición se calcula por medio de la ecuación 1.

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Edema A} - \text{Edema B}}{\text{Edema A}} \times 100$$

Ecuación 1.

Edema A.

Edema (mg) = Peso de la oreja tratada con TPA - Peso de la oreja sin TPA.

Edema A = Edema del grupo control.

Edema B = Edema del grupo tratado con los compuestos.

Tabla V.- Resultados del porcentaje de inhibición para el compuesto 1.

<i>COMPUESTO 1 (mg)</i>	<i>% INHIBICIÓN</i>
1	8.14
3.1	12.29
10	34.28
31	34.28
100	41.59

El extracto de MeOH a una dosis única de 100 mg/kg mostró una inhibición del edema del 60%.

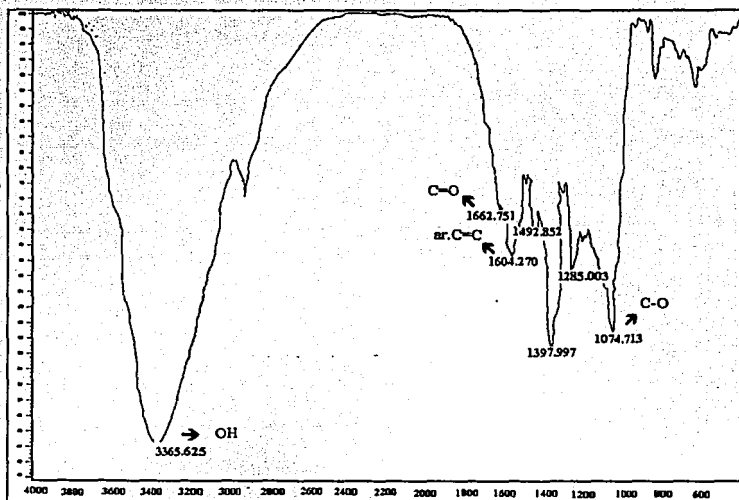
**DISCUSION
Y
ANALISIS DE
RESULTADOS**

6.- DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1.- HIERBA AMARGA (*Neurolaena lobata*).

La parte aérea de la *Neurolaena lobata* fue colectada entre los municipios de Tepetitán y Cuetzalan, así como en los alrededores del poblado de San Pablito, todos ubicados en la Sierra Norte del Estado de Puebla.

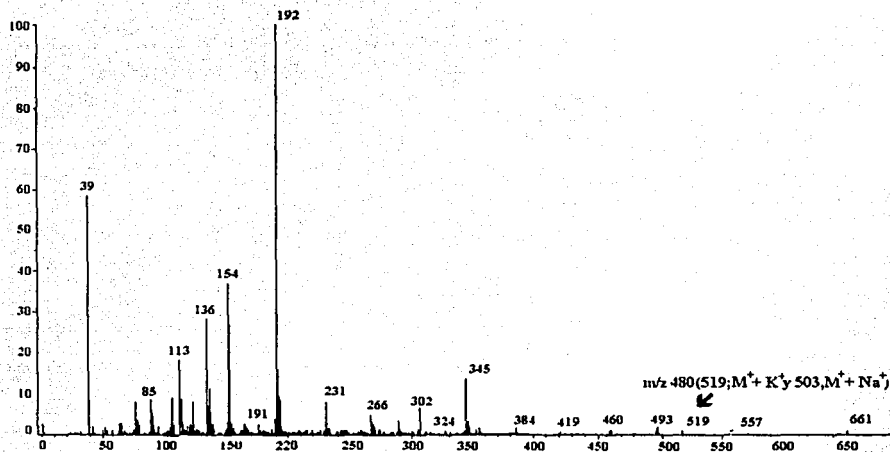
Del extracto de MeOH se obtuvo mediante técnicas cromatográficas un producto, el cual fue purificado por cristalización de una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo. Este producto purificado presentó un punto de fusión de 205-210 °C.



Espectro No 1.-Infrarrojo de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

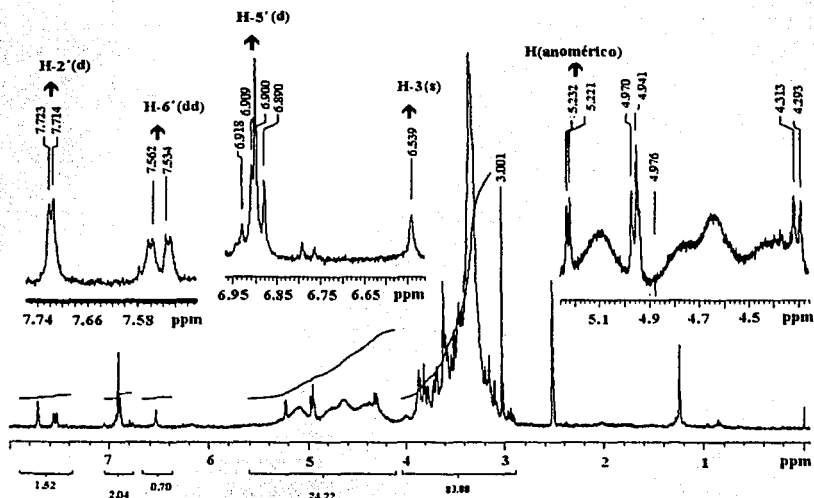
El espectro de infrarrojo de este compuesto (Espectro 1) muestra la absorción característica de grupos hidroxilos en la región de $3450-3240\text{ cm}^{-1}$; a su vez en 1662 cm^{-1} se observa una banda asignada a un grupo carbonilo α, β insaturado. Así mismo, se observa una banda para sistemas aromáticos a 1604 cm^{-1} .



Espectro No 3.-Masas de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).

El espectro de masas FAB⁺ reveló un ión molecular a m/z 480 [$M^+ + K^+$] y 503, [$M^+ + Na^+$] para una fórmula condensada de $C_{21}H_{20}O_5$. Este dato aunado a las bandas de aromaticidad en el espectro de IR sugieren una estructura flavonoide para el compuesto 1.

Esta proposición fue confirmada al observar el espectro de RMN ^1H donde además de las señales de los protones aromáticos se observa señales complejas entre 5 y 3 ppm, indicativo que este compuesto es de naturaleza glicosídica.



Espectro No 2.-RMN ^1H de 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona.

Un análisis detallado del espectro de RMN ^1H reveló un sistema aromático del tipo ABX, donde el protón A se ubica en 7.71 ppm como una señal doble con $J=2.7$ Hz para una interacción meta (*m*), el protón B se ubica en 7.54 ppm como una señal doble de doble con $J=2.7$ y 8.4 Hz para interaccionar meta (*m*) y orto (*o*); finalmente el protón X se localiza en 6.90 ppm como señal doble con $J=8.4$ Hz para una interacción orto (*o*).

Así mismo se observa una señal simple en 6.52 ppm, característica para un protón vinílico α a un grupo carbonilo como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla VI.-RMN ^1H de 7-glicosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona.

Protón	Desplazamiento (ppm)	Constante de acoplamiento J (Hz)
H-3	6.53 (s)	—
H-2'	7.71 (d)	2.7
H-5'	6.90 (d)	8.4
H-6'	7.54 (dd)	2.7, 8.4
Anomérico	5.22 (d)	3.3
Glicosido	5.3 (m)	—

Con estos resultados se propone una estructura parcial flavonoide para el compuesto 1, donde las señales del sistema ABX se ubica en el anillo B y la de la señal simple en 6.52 ppm es asignada a la posición 3 de la estructura flavonoide como se ilustra (figura 7).

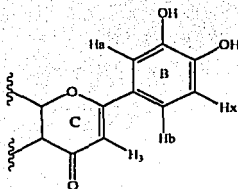


Figura 7.- Estructura parcial del compuesto 1.

Al adicionar D_2O durante el experimento de RMN 1H , se observó una señal doble a 5.22 ppm, $J= 3.3$ Hz, el cual fue asignado al protón anomérico del residuo de azúcar de **1**.

Así mismo en este espectro se observaron las señales a campo bajo, indicando un intercambio con D_2O de los protones de los grupos hidroxilos, lo cual permitió postular la presencia de alcoholes por lo menos en la posiciones 5 y 6 del anillo A.

Tomando en cuenta tanto la fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_5$, así como los datos espectroscópicos, es apropiado sugerir como la estructura para la sustancia **1** a la indicada en la figura 8.

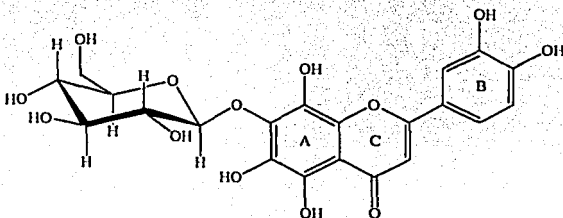


Figura 8.- Estructura de la 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (**1**).

Esta proposición está apoyada por el resultado de un análisis detallado del correspondiente espectro de masas, donde se observa una fragmentación tipo retro Diels-Alder común en los flavonoides figura 9.

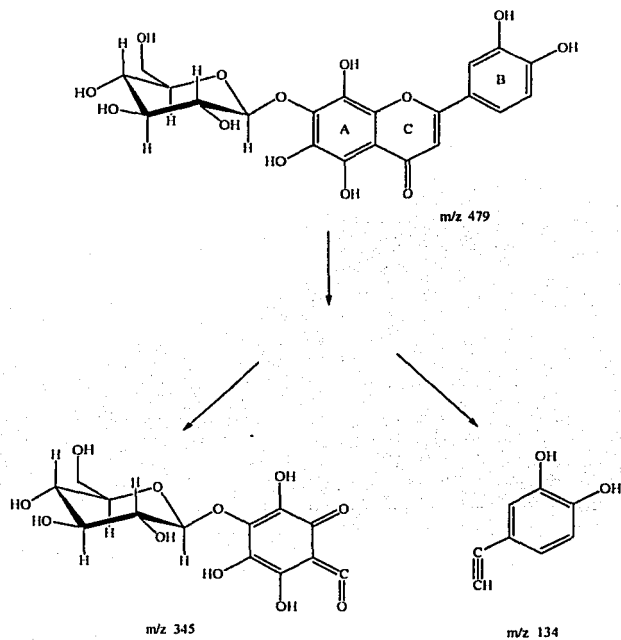
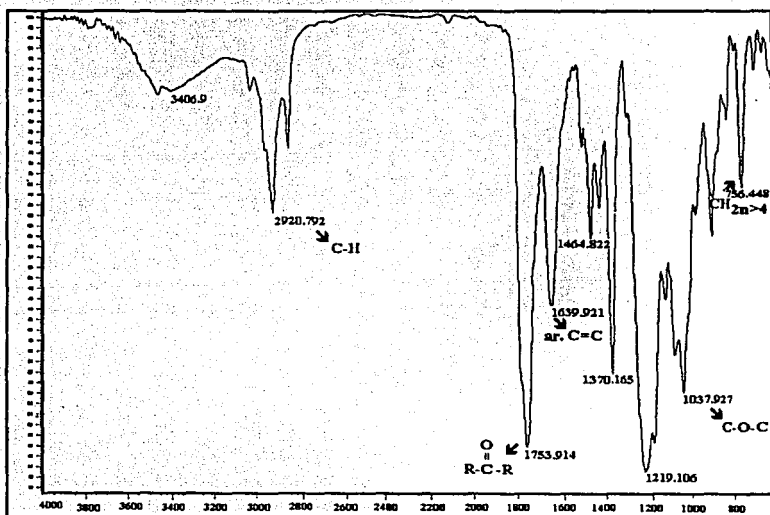


Figura 9.- Fragmentación tipo Retro Diels-Alder de la 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1).

Una exhaustiva revisión bibliográfica⁽¹⁻⁴⁶⁾ revela que el compuesto 1 (7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona) es una molécula nueva. Como pruebas adicionales para confirmar la estructura de 1, éste se sometió a reacciones de acetilación y de hidrólisis.

Así, el producto I se sometió a una reacción de acetilación con anhídrido acético y piridina condiciones usuales, el correspondiente producto de reacción se obtuvo de acuerdo con lo descrito en la parte experimental.

El espectro de infrarrojo respectivo presentó bandas características de la acetilación la cual nos muestra la absorción 1753.91 cm^{-1} una banda asignada a grupos carbonilo de los grupos acetatos formados. Así mismo se observa la disminución de la banda asignada a grupos hidroxilos y la permanencia de la banda de aromaticidad.

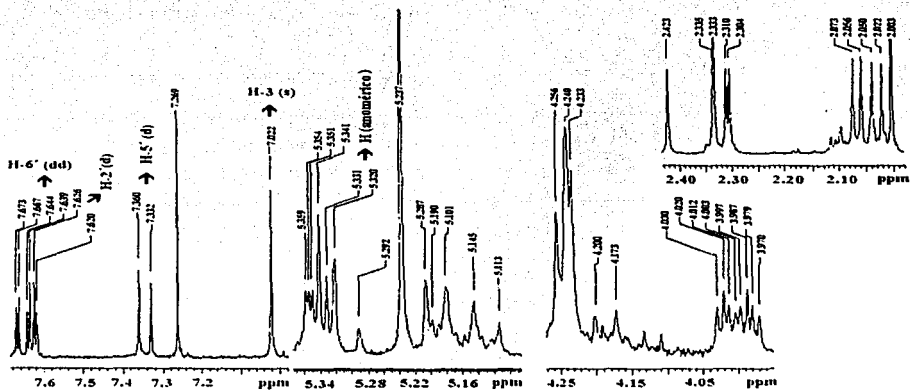


Espectro No 4. -Infrarrojo de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glicosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el espectro de RMN ^1H del producto de acetilación se observaron las mismas interacciones de los protones aromáticos del sistema ABX consignados en **1** pero con diferente desplazamiento así en 7.62 ppm se observó el protón A con una constante de acoplamiento $J= 2.1$ Hz para una interacción meta (*m*), el protón B se ubica en 7.66 ppm como una señal doble de doble con $J=2.1$ y 8.5 Hz para una interacción en meta (*m*) y orto (*o*); finalmente el protón X se localiza en 7.35 ppm como señal doble con $J= 8.4$ Hz para una interacción en orto (*o*).

Por otro lado la señal asignada al protón H-3 en el compuesto **1** se desplazó a campos bajos, situándose en 7.02 ppm (Espectro 5). Con respecto al protón anomérico, éste se observó casi con el mismo desplazamiento que en **1**.



Espectro No 5.-RMN ^1H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona

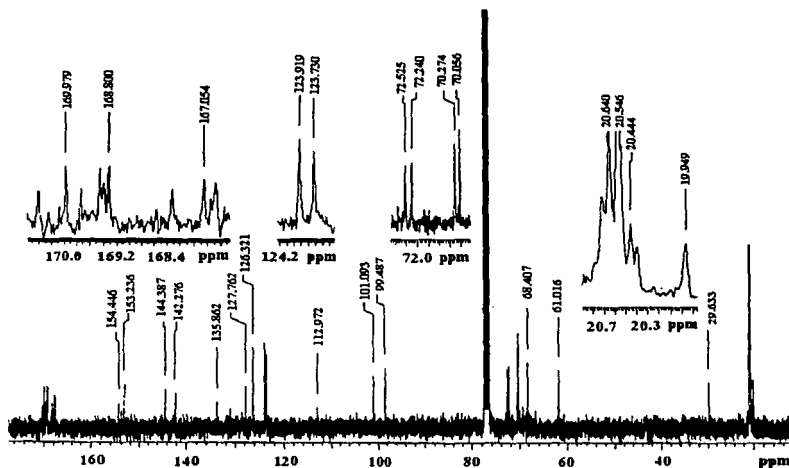
(2).

En la tabla VII, se muestran las asignaciones de RMN ¹H para el peracetato correspondiente.

Tabla VII.-RMN ¹H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-penta-acetoxi flavona (2).

Protón	Desplazamiento químico (ppm)	Constante de acoplamiento <i>J</i> (Hz)
H-3	7.02 (s)	
H-6'	7.65 (dd)	2.1, 8.5
H-5'	7.34 (d)	8.5
H-2'	7.62 (d)	2.1
Anomérico	5.32 (d)	3.3
Acetatos	2.00, 2.02, 2.04, 2.06, 2.07, 2.09, 2.30, 2.31, 2.33.	

En el espectro No 6 se observan las señales del compuesto 2 las cuales apoyan la estructura propuesta para este compuesto.



Espectro No 6. - RMN ^{13}C de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxy-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxy flavona (2).

En la tabla VII, se muestran los valores de los desplazamientos de los carbonos del peracetato (compuesto 2), con estos datos corroboramos en que posición está localizado cada carbono de esta estructura.

Tabla VIII.-Datos de RMN ^{13}C para la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-pentaacetoxi flavona (2).

Carbono	Desplazamiento químico (ppm)
C-2	168.8
C-3	101.09
C-5	142.27
C-6	127.76
C-7	154.44
C-8	127.76
C-9	144.38
C-10	101.09
C-1'	135.8
C-2'	123.9
C-3'	153.2
C-4'	153.2
C-5'	123.7
C-6'	126.32
Carbonos del azúcar C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6	99.48, 72.52, 70.05, 70.27, 68.40, 61.01 respectivamente

Analizando el espectro de masas No. 7, FAB⁺ se observa un ión molecular a m/z 858 (859; M⁺), para una fórmula condensada $\text{C}_{39}\text{H}_{38}\text{O}_{22}$ del peracetato (1), lo cual apoya la estructura propuesta en la figura 10 para este compuesto.

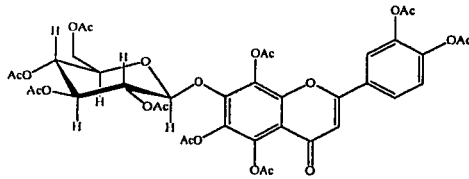
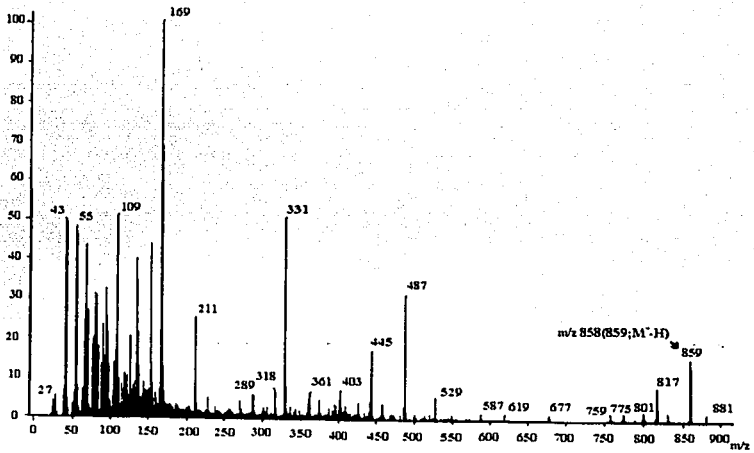


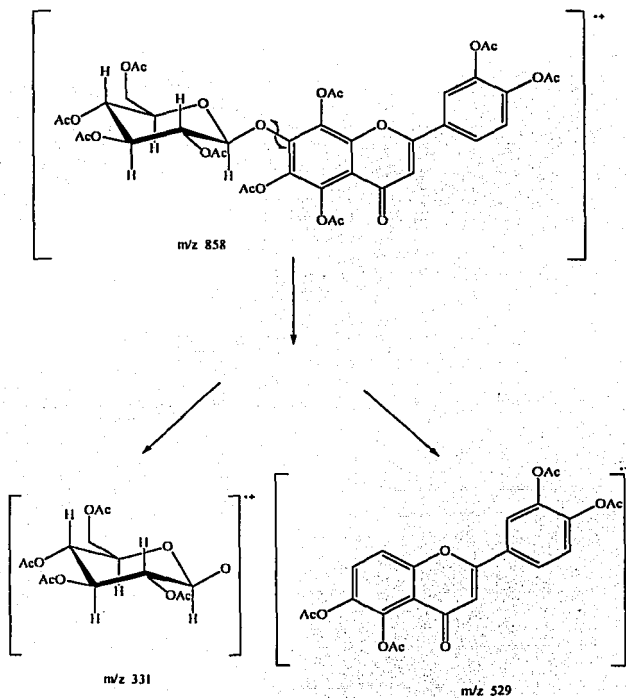
Figura 10.- Estructura propuesta para el peracetato (2).



Espectro No 7.-Espectro de masas de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxy-glucosil)-5,6,8,3',4'-penta acetoxy flavona (2).

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Un dato adicional que proporciona el espectro de masas es la fragmentación de 2, para producir fragmentos correspondientes a la glucosa acetilada y de la aglicona respectivamente (figura 11).



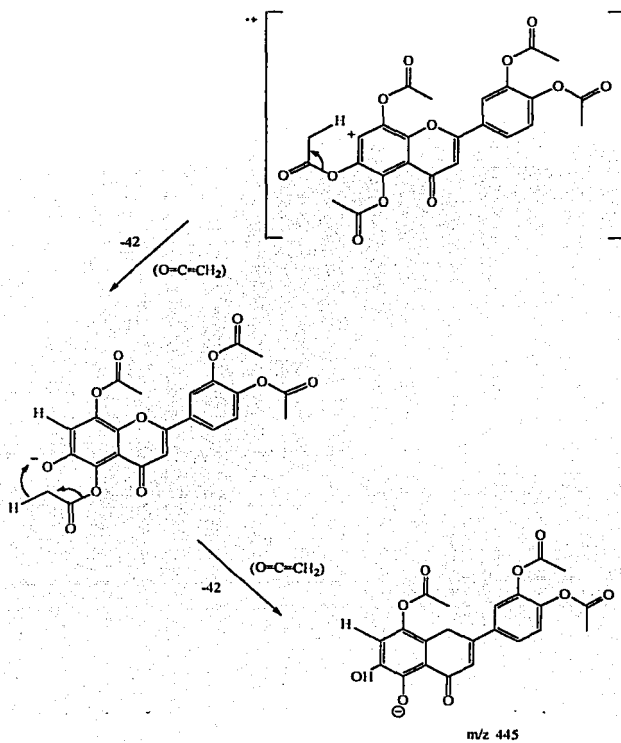
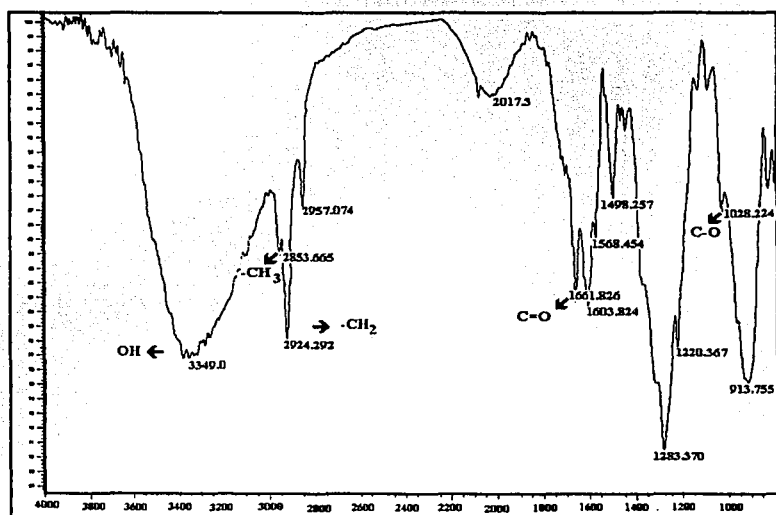


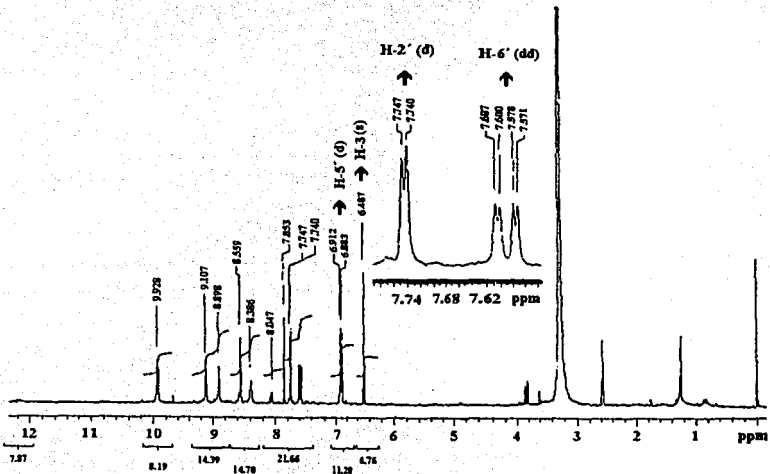
Figura 11. Fragmentación del compuesto 2.

Cuando se sometió el producto 2 a una reacción de hidrólisis con ácido sulfúrico y metanol se obtuvo el producto esperado 3 con un pf de 180-182 °C. El espectro de IR de 3 mostró la banda característica de los grupos OH en 3349 cm⁻¹, así mismo otra banda característica para una cetona α,β insaturada en 1661.826 cm⁻¹, como se muestra en el espectro No 8.



Espectro No 8. -Infrarrojo de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxiflavona (3).

El espectro de RMN ^1H del compuesto **3** presentó una señal simple en 6.48 ppm que es característico para un protón vinílico α a un grupo carbonilo. Así mismo se observó el sistema aromático del tipo ABX, donde el protón A se ubica en 7.74 ppm que muestra una señal doble, con una constante de acoplamiento $J = 2.1$ Hz para una interacción meta (m), el protón B se ubica en 7.59 ppm como una señal doble de doble con una constante de acoplamiento $J = 2.1$ y 8.7 Hz para una interacción meta (m) y orto (o); finalmente el protón X se localiza en 6.90 ppm como una señal doble con constante de acoplamiento $J = 8.7$ Hz para una interacción orto (o).



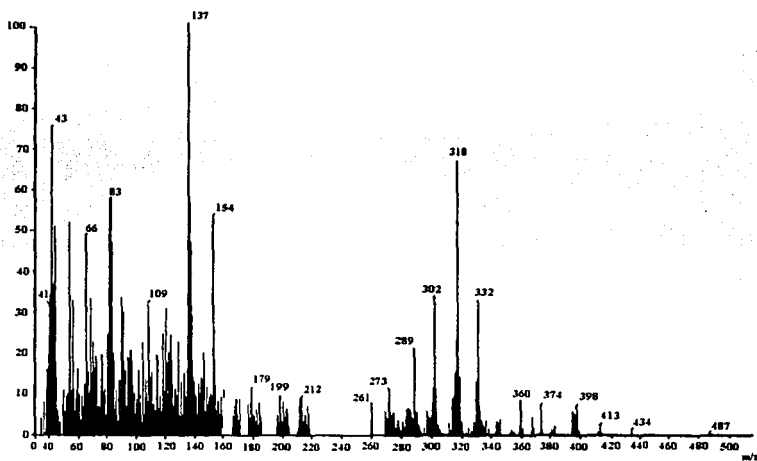
Espectro No 9. -RMN ^1H de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3).

En la tabla IX se muestra un resumen de los correspondiente datos de RMN ^1H (espectro No 9) para el compuesto 3:

Tabla IX.-Datos de RMN ^1H de 5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexahidroxi flavona (3).

Protón	Desplazamiento químico (ppm)	Constante de acoplamiento J (Hz)
H-3	6.48(s)	---
H-2'	7.74 (d)	2.1
H-5'	6.89(d)	8.7
H-6'	7.58(dd)	2.1, 8.7

Los datos espectroscópicos de IR y RMN ^1H , así como la fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$, proporcionada por espectrometría de masas (espectro No.10) del compuesto 3, corresponde a la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (figura 12).



Espectro No 10.-Masas de la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3).

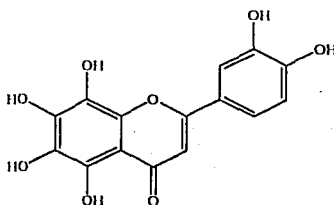
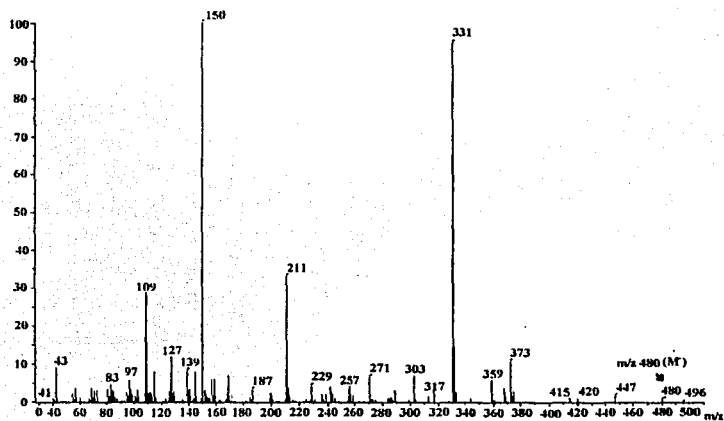


Figura 12.- El compuesto 3 corresponde a la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona.

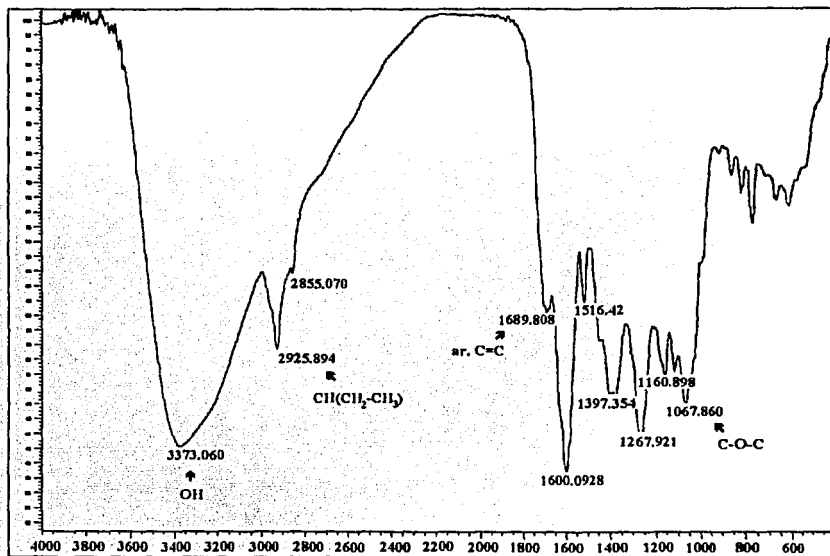
6.2.- Aislamiento de un segundo compuesto del extracto metanólico.

Del extracto metanólico se encontró otro producto, que mediante el espectro de masas FAB⁺ presentó un ión molecular en m/z 480 consistente con fórmula condensada de C₂₁H₂₀O₁₃.



Espectro No 12.-Masas del 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).

Los datos del espectro de IR sugieren una estructura tipo flavonoide para el compuesto 4, ya que la banda ancha en 3322.1cm⁻¹ corresponde a un grupo hidroxilo y otra banda característica en 1665.0 cm⁻¹ pertenece al grupo carbonilo.



Espectro No 11.-Infrarrojo del 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).

El espectro de RMN ¹H comprobó la naturaleza del glicosídico de flavonoide para el compuesto 4. Sin embargo debido a la poca solubilidad del compuesto aún en DMSO, no se logró un análisis apropiado del espectro.

Como información adicional en el espectro de masas se observaron los fragmentos de una ruptura retro Diels-Alder, lo cual permitió postular a la 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol como estructura probable para el compuesto **4** (figura 13). Para comprobar esta propuesta, se sometió a reacciones de acetilación e hidrólisis al compuesto de interés (**4**).

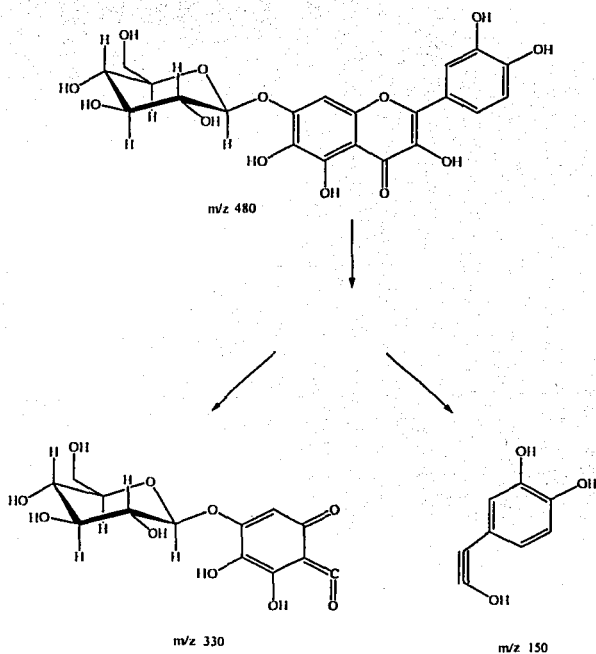
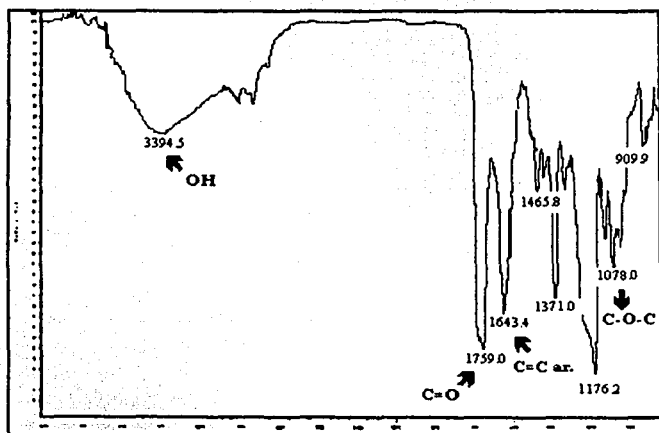


Figura 13.-Fragmentación tipo Retro Diels-Alder para la molécula (**4**).

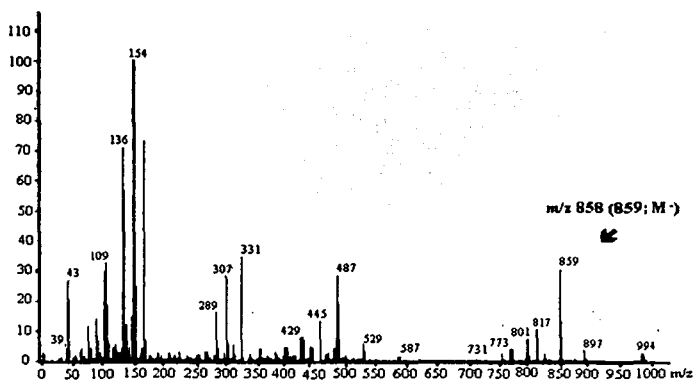
El producto 4 se sometió a una reacción de acetilación con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente. El producto de acetilación se obtuvo de acuerdo con lo descrito en la parte experimental.

En el espectro de IR del producto acetilado 5 se observan tres bandas importantes: en 3394.5 cm^{-1} absorción de la banda de grupos OH, a 1759.0 cm^{-1} la banda característica de los grupos carbonilos de éster a 1643.4 cm^{-1} de los aromáticos (C=C).



Espectro No 13.- Infrarrojo del 7-(3,4,5,6-tetraacetoxy-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxy flavonol (5).

El espectro de masas FAB⁺ nos reveló un ión molecular en m/z 858, para una fórmula condensada C₃₉H₃₈O₂₂.



Espectro No 15.-Masas del 7-(3,4,5,6-tetraacetoxy-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxy flavonol (5).

En el cual se lograron observar los fragmentos de una fragmentación de tipo retro Diels-Alder, lo cual indica que la molécula corresponde al producto peracetilado de 5.

En la figura 14 se señala la fragmentación para el compuesto 5.

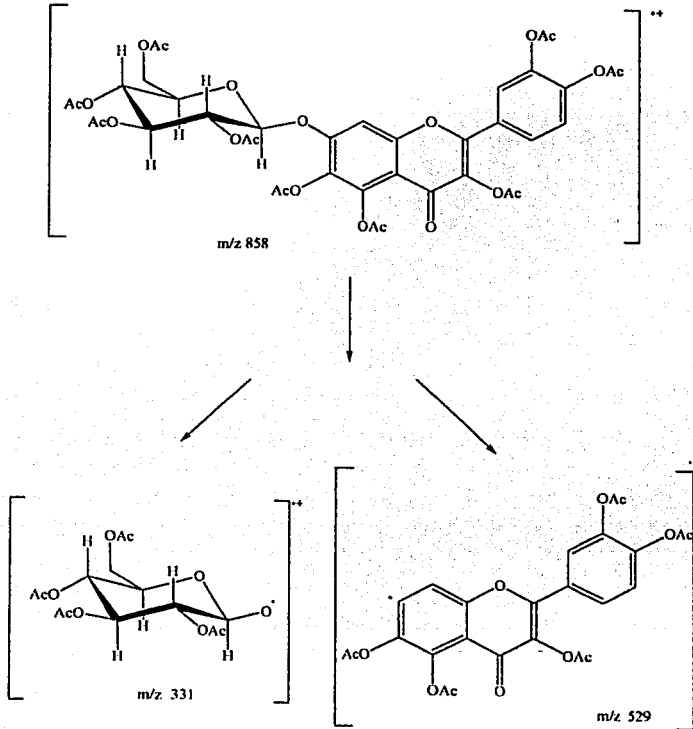


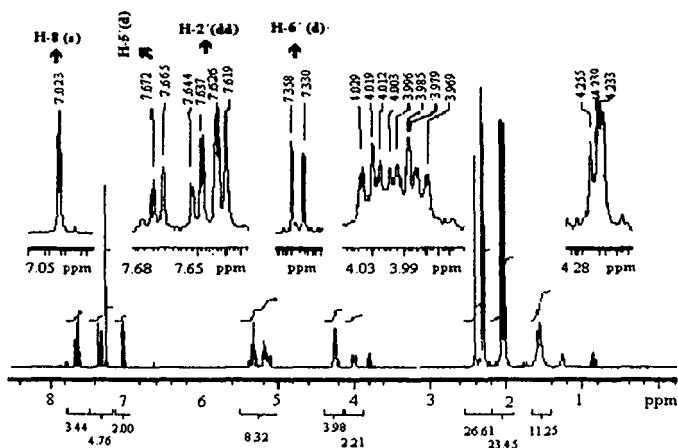
Figura 14.- Fragmentación de 7-(3,4,5,6-tetraacetoxy-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxy flavonol (5).

En la siguiente tabla se describen las señales de RMN ¹H del compuesto peracetilado 5.

Tabla X.-Datos del espectro de RMN ¹H del compuesto 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-penta-acetoxi flavonol (5).

Protón	Desplazamiento químico (ppm)	Constante de acoplamiento <i>J</i> (Hz)
H-8	7.023 (s)	—
H-2'	7.65 (dd)	2.1, 8.4
H-5'	7.62 (d)	2.1
H-6'	7.34 (d)	8.4.
Acetatos	2.02, 2.04, 2.06, 2.08, 2.30, 2.33, 2.42 respectivamente	—

El protón A se ubica en 7.65 ppm como una señal doble de doble con una constante de acoplamiento *J*= 2.1 y 8.4 Hz para una interacción meta (*m*) y orto (*o*), el protón B se ubica en 7.34 ppm como una señal doble con una constante de acoplamiento *J*=8.4 Hz para interaccionar en meta (*m*) y por último, el protón Y tiene un desplazamiento en 7.62 como una señal doble para una interacción para (*p*) con una constante de acoplamiento *J*= 2.1 Hz. Como señal adicional se observa en 7.02 ppm la cual fue asignada al protón H-8, como se observa en el espectro No 14, lo cual confirma la estructura del peracetato (5) como la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-penta-acetoxi flavonol.



Espectro No 14.-RMN ^1H de la 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavonol (5).

Así llegamos a elucidar la siguiente estructura flavonoide acetilado 5,

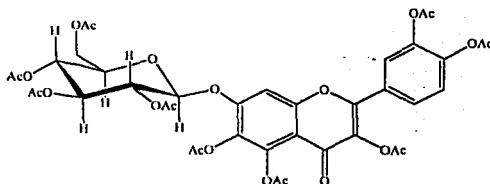
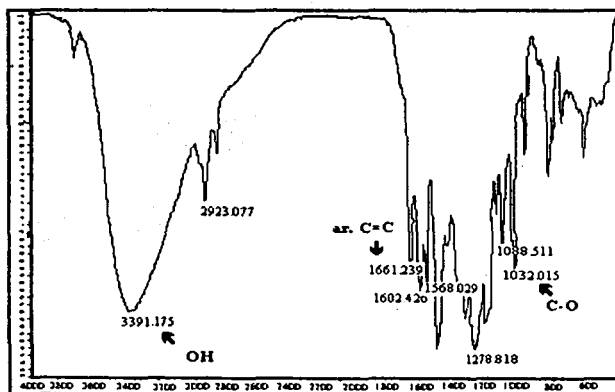


Figura 15.- Estructura de 7-(3,4,5,6-tetraacetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-pentaacetoxi flavonol (5).

El producto **5** fue sometido a una reacción de hidrólisis con ácido sulfúrico 4 N como se mencionó anteriormente en la parte experimental, obteniéndose el 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (**6**).

En el espectro No 16 de IR se observa la banda característica del grupo OH en 3391.175 cm^{-1} , a 1661.239 cm^{-1} se observa el grupo carbonilo C=O; a 1505.60 cm^{-1} se observa la señal típica del grupo C=C del grupo aromáticos.



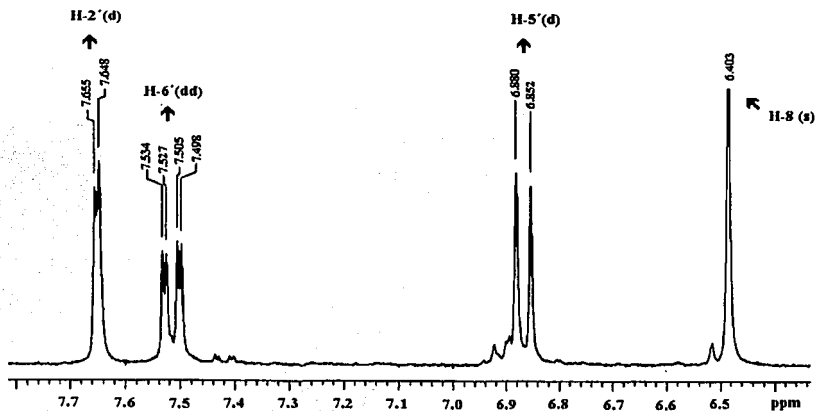
Espectro No 16.-Infrarrojo de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (**6**).

En la tabla XI se describe un resumen de los parámetros de RMN ¹ H para el compuesto 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).

Tabla XI.-RMN ¹H de la hidrólisis de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).

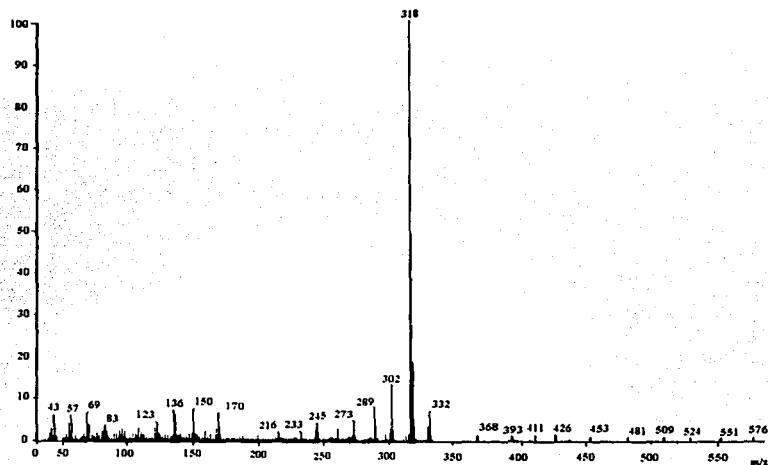
Protón	Desplazamiento químico (ppm)	Constante de acoplamiento J (Hz)
H-8	6.40(s)	—
H-2'	7.65 (d)	2.1
H-5'	6.87(d)	8.4
H-6'	7.52(dd)	2.1; 8.4

Como se puede apreciar el sistema aromático del tipo ABY se conserva. El protón A se ubica en 7.65 ppm como un señal doble con $J = 2.1$ Hz para una interacción meta (m), el protón B se ubica en 7.52 ppm como un señal doble de doble con $J = 2.1$ y 8.4 Hz para una interacción meta (m) y orto (o); finalmente el protón Y se ubica en 6.87 ppm como una señal doble con $J = 8.4$ Hz para una interacción orto (o). La señal asignada al protón 11-8 ahora se ubica a 6.40 ppm como un señal simple.



Espectro No 17. $\text{RMN } ^1\text{H}$ de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).

Conociendo la fórmula condensada $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$, se llega a la conclusión que el producto 6 corresponde a 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol.



Espectro No 18.-Masas de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).

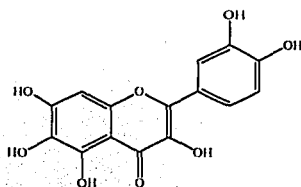
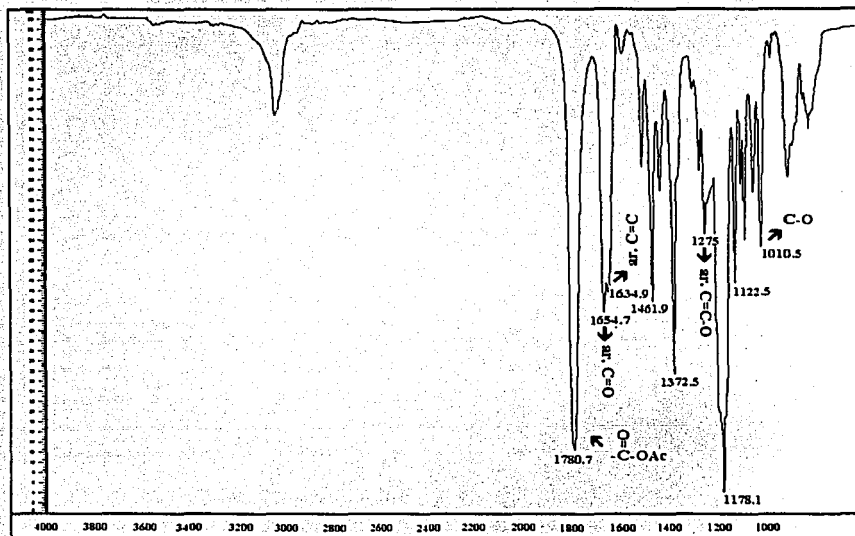


Figura 16. Estructura de 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6).

Por último se obtuvo el producto peracetilado de 6, mediante una reacción de acetilación con anhídrido acético en piridina, lo cual produjo un compuesto cuyas bandas en IR a 1780 cm^{-1} y 1654 cm^{-1} corroboran la presencia de grupos acetatos en este producto.

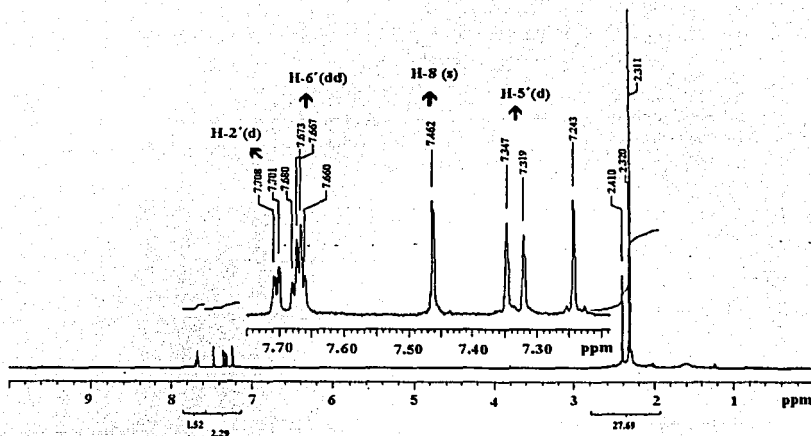


Espectro No 19. Infrarrojo de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxy flavonol (7).

Los datos espectroscópicos de RMN ^1H nos dio la siguiente información:

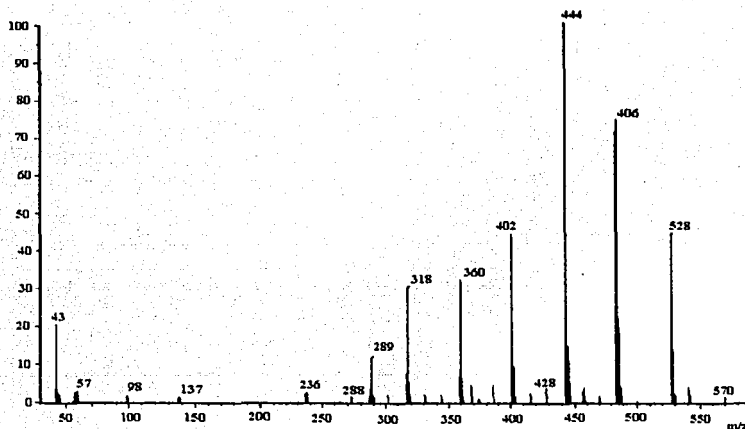
Tabla XII.-RMN ^1H del producto acetilado de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol (7).

Protón	Desplazamiento químico (ppm)	Constante de acoplamiento J (Hz)
H-8	7.46 (s)	—
H-2'	7.70 (d)	2.1
H-5'	7.73 (d)	8.4
H-6'	7.67 (dd)	2.1, 8.4



Espectro No 20.- RMN ^1H de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol (7)

lo cual apoya totalmente la detección del peracetato del compuesto 6. Aún más el espectro de masas indica el ión molecular M^+ a m/z 570 para una fórmula mínima de $C_{27}H_{22}O_{14}$.



Espectro No 21.-Masas de 3,5,6,7,3',4'-hexa acetoxi flavonol (7).

Lo cual comprueba que el producto de acetilación (7) corresponde a 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxi flavonol como se muestra en la figura 17.

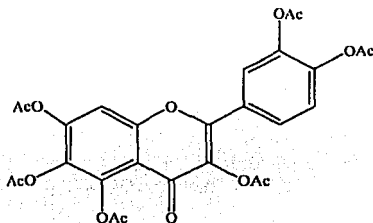


Figura 17.- Estructura de 3,5,6,7,3',4'-hexaacetoxy flavonol (7).

6.3.- DISCUSIÓN ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Se conoce que el TPA como agente edematoso, involucra varias rutas biológicas. Entre los principales se pueden citar la cascada del ácido araquidónico donde las enzimas ciclo oxigenasas I y II (COX) tienen un papel importante. Así mismo es conocido que también involucran las lipooxigenasas; debido a lo anterior se dice que el TPA tiene un mecanismo de acción inespecífico. Sin embargo debido a su repetibilidad y la cantidad pequeña de muestra a probar, se ha empleado de manera regular como prueba de escrutinio preliminar de fármacos o sustancias con propiedades anti-inflamatorias. La aplicación tópica del agente edematoso, es de la manera tradicional. Sin embargo debido a la poca solubilidad del extracto y del compuesto I se ensayó una forma alterna de aplicación; éstas, consistió en preparar soluciones del extracto y del compuestos con bicarbonato de sodio al 10 %.

Las concentraciones de pruebas fueron de 100 mg/Kg. para el extracto y 1, 3.1, 10, 31 y 100 mg/Kg. para el compuesto **1**, los resultados indican que existe una actividad anti-inflamatoria dependiente de la dosis para **1**. Como ya se mencionó el TPA es una agente edematoso inespecífico y por lo tanto no es posible asegurar una forma de acción de **1**.

Sin embargo debido a la estructura flavonoide de **1**, es posible suponer que su acción anti-inflamatoria se deba a su capacidad de atrapar radicales libres y posiblemente bajo esta vía inhibir a las COX I y II, así como a las lipooxigenasas.

En tabla XII se muestra los resultados del porcentaje de inhibición.

Tabla XIII.-Datos del porcentaje de inhibición de la Hierba Amarga (n=3 Ratón TPA).

DOSIS mg	% INHIBICIÓN
1	8.14
3.1	12.29
31	34.28
100	41.59

CONCLUSIONES

7.- CONCLUSIONES

1.- El estudio fitoquímico de la especie *Neurolaena lobata* proporcionó los glicósidos: 7-glucosil-5,6,8,3',4'-pentahidroxi flavona (1) y 7-glucosil-3,5,6,3',4'-pentahidroxi flavonol (4).

2.- La caracterización de 1 y 4 se logró por métodos químicos y espectroscópicos. Así la acetilación de 1 proporcionó la 7-(3,4,5,6-tetra-acetoxi-glucosil)-5,6,8,3',4'-penta-acetoxi-flavona (2) mientras que la 5,6,7,8,3',4'-hexahidroxi flavona (3) se obtuvo de la hidrólisis de 1.

Por otro lado, la acetilación de 4 proporcionó el 7-(3,4,5,6-tetra-acetoxi-glucosil)-3,5,6,3',4'-penta-acetoxi flavonol (5). El 3,5,6,7,3',4'-hexahidroxi flavonol (6) se obtuvo de la hidrólisis de 4. La reacción de acetilación de 6 produjo el 3,5,6,7,3',4'-hexa-acetoxi flavonol (7).

3.- La estructura del glicósido 1 resultó novedosa y por lo tanto se evaluaron sus propiedades anti-inflamatorias en el modelo del TPA en oreja de ratón. Los resultados obtenidos demuestran que este compuesto presenta una actividad dosis dependiente.

LITERATURA CITADA

8.- LITERATURA CITADA

1. Harbone, J.B. and T.J. Mabry., *The Flavonoides: Advances in Research*, Chapman and Hall. New York., 2, 303-311, (1988).
2. Silverman, R., *The Organic Chemistry of Drug Design and Action*, Academic Press, USA, 1-20, (1992).
3. Grenlanch, A.V.; *Las plantas, "Introducción a la Botánica Moderna"*; México-Buenos Aires, 26, (1970).
4. Haynes, L.J., *Quartely Reviews II*, 46, (1978).
5. Rodríguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J. C., *Phytochemistry*, 15, 1573, (1976).
6. Romo de Vivar, A., Rodríguez, E., *Revista Latinoamericana de Química*, 6, 56, (1977).
7. Romo de Vivar, A., *Estado Actual del Conocimiento de Plantas Medicinales Mexicanas; Lactonas Sesquiterpénicas, Clasificación, Actividad y Biogénesis*, IMEPLAM, 151, (1976).
8. Herout, V., *Chemotaxonomie of Familie Compositae in Pharmacogrosy and Phytochemistry*, Sprier Verlag N.Y. (1971).
9. Kupchan, S. M. *Fed Proc*, 288, (1974).
10. Geissman, T. A.; *The Chemistry of Flavonoid Compounds*, Macmillan, New York., 166, (1962).
11. Toscano, L., Grisanti, G., Floriello, C., Barlotti, L., Biannetti, A. and Riva, M., *Journal Medicinal Chemistry*, 20, 213, (1977).
12. Testa, B., Kyburs, E., Fuhner, W. and Giger, R., *Perspectives in Medicinal Chemistry, "Search for new lead compounds of natural origin"*, Verlay Helvetica Chimica Acta, Basel, Suiza, 477-88, (1993).
13. Litter, M., *Farmacología Experimental y Clínica, El Manual Moderno*, Argentina, 34, (1989).
14. Hernández, F., Castillo, R., *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 24, 25, (1993).

15. Martínez, M., *Las Plantas Medicinales de México*, 5a. Ed. Batas, México, (1969).
16. Neiss, E. S., Boy, T. A., *Pharmacogenology: The Industrial New Drug Development Process. The Clinical Research Process in the Pharmaceutical Industry*. Gary M. Mioren. Marcel Dekker, U.S.A., 1-3, (1984).
17. Geissman, T.A. and Crout, D.H., "*Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*", Freeman, Cooper and Company, 25,35 y 235, (1969).
18. Instituto de Biología UNAM, Miguel Angel Martínez Alfaro Virginia. *Cuadernos IPUNAM 271 Plantas Útiles de la Sierra Norte de Puebla/Mtz* (1995).
19. Cagnin, M. A. H., C-M.R. Gomes, O.R. Gottlieb, M.C. Marx., et.al., *Plant Systems Evolution*, Supl.1, 53, (1977).
20. Romo, J., A.Romo de Vivar, R. Treviño., J. Nathan, E. Díaz, *Phytochemistry*, **9**, 1615, (1970).
21. Shaurggin, *J.Applied Chem.*,(U.S.S.R.), **12**, 1201, (1939).
22. Ruzicka, L., *Experientia*, **9**,357, (1953).
23. Markham, K.R., *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press London., New York., 1-8, 53-65, (1982).
24. Herbert, R.B., *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman Et Hall., New York., (1981).
25. Harbone, J.B. and T.J. Mabry., *The Flavonoides: Advances in Research*, Chapman and Hall. New York., 27-37. (1982).
26. Passreiter Claus M., Detlef Wendisch and Daniel Gondol., *Phytochemistry*, **39**, 133, (1995).
27. Percys, Manchand and John F. Blount. *Journal Organic Chemistry*, **43**, 4352-4354, (1978).
28. Kerr, K. M., T.J. Mabry and S. Yoser., *Phytochemistry*, **20**, 791-794, (1981).
29. Ulubelen Ayhan, Barbara N.Timmermann and Tom J. Mabry., *Phytochemistry*, **19**, 905-908, (1980).
30. Ulubelen Ayhan, Barbara N.Timmermann and Tom J. Mabry., *Phytochemistry*, **19**, 1761-1766, (1980).

31. Bohlmann Ferdinand., Arvid A. Natu and Kathleen Kerr, *Phytochemistry* 18, 489-490, (1979).
32. Ulubelen Ayhan, et al., *Journal of Natural Products*, 44, 457-458, (1980).
33. Redaelli Claudio, Lina Formentini and Enzo Santaniello., *Phytochemistry*, 19, 985-986, (1980).
34. Van Den Broucke C.O., et al., *Phytochemistry*, 21, 2581-2583, (1982).
35. Bacon John D, et al., *Phytochemistry*, 17, 1939-1943, (1978).
36. Harborne Jeffrey B, et al., *Phytochemistry*, 34, 219-226, (1993).
37. Harbone, J.B. and T.J. Mabry., *The Flavonoides: Advances in Research, Chapman and Hall*. New York., 2, 303-311, (1988).
38. Manguro Lawrence O. A., Kavaka W. Mukonyi, and Joseph K. Githiomi., *Natural Product Letters*. 7, 163-167, (1995).
39. Merlos M, Gómez L.A.; Giral M. Vericat M.L. Garcia-Rafncl J. Form., *J. Br.J. Pharmacol* 104, 990-994, (1991).
40. Tubaro A., Dri P. Delbello. G. Zill., Della Loggica R.C. , *Agents Actions* 17, 347-349, (1985).
41. Ken Yasakawa, Toshiro Akihisa, Harotoshi Oinuma, et al., *Oncology*, 153, 341-344, (1996).
42. Goodman and Gilman. *Las Bases Farmacologicas de la terapeutica* 9ª Ed. McGrawHill- Interamericana, 643-660, (1996).
43. Martínez V. Mariano, Héctor M. Vázquez García y Georgina Espinosa Perez. *Journal of Natural Products* 56, 1410-1413, (1993).
44. Korolkovas, A. J., *Medicinal Chemistry*, 2nd. Ed.; Wiley Interscience, U.S.A., 67, (1988).
45. Claus M. Passreiter and Murray B. Isman *Biochemical Systematics and Ecology* 25, 371-377, (1997).
46. Peter M. Bork, M. Lieuhard Schmitz, Michaela Kuhnt, Claudia Escher, Michael Heinrich *FEBS Letters* 402, 85-90, (1997).